

Tesis Doctoral

Interacción entre el metabolismo del calcio y el metabolismo energético en ratas normales y en animales espontáneamente obesos

Marotte, Clarisa

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Marotte, Clarisa. (2012). Interacción entre el metabolismo del calcio y el metabolismo energético en ratas normales y en animales espontáneamente obesos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Marotte, Clarisa. "Interacción entre el metabolismo del calcio y el metabolismo energético en ratas normales y en animales espontáneamente obesos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Interacción entre el metabolismo del calcio y el
metabolismo energético en ratas normales y en
animales espontáneamente obesos.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Química Biológica.

Clarisa Marotte

Director de Tesis: Prof. Dra. Susana Noemí Zeni

Consejero de Estudios: Prof. Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Óseas, Instituto de
Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM), CONICET-UBA.

Buenos Aires, 2012

Interacción entre el metabolismo del calcio y el metabolismo energético en ratas normales y en animales espontáneamente obesos.

RESUMEN

El objetivo fue comparar absorción y retención de Ca, y cambios en la composición corporal y en diferentes parámetros del metabolismo energético durante el crecimiento. Ratas espontáneamente obesas (IIMb/ β) (O) y ratas Wistar (W), fueron apareadas; las madres se alimentaron con una dieta isocalórica con diferentes concentraciones de Ca: Alto (ACa: 0.9%), Normal (NCa: 0.5%) y Bajo (BCa: 0.2%). Las crías macho continuaron recibiendo la misma dieta materna hasta los 60 días de edad (ACa, NCa y BCa).

En O, el PC fue inverso al contenido dietario de Ca sin diferencias en % de agua; OBCa presentó el menor % corporal de proteínas ($p < 0.01$). El %ACa fue inverso al contenido de Ca de la dieta y el %A grasas no se modificó. OBCa presentó los mayores niveles de TGL, glucosa, insulina en ayunas, y HOMA-IR ($p < 0.01$) y el menor valor de Ca y P corporal, CMO del esqueleto total y DMO de tibia y columna ($p < 0.01$). OACa presento similar %Ca corporal pero CMO del esqueleto total y DMO de tibia proximal y columna fueron menores que ONCa ($p < 0.01$).

En W, AWCa presentó mayor % de grasa que los otros dos grupos ($p < 0.01$). WBCa y WACa presentaron % de proteínas y cenizas menores a WNCa ($p < 0.01$). WACa presentó los mayores niveles de TGL, glucosa, insulina y HOMA-IR ($p < 0.01$) y WBCa mayores que WNCa ($p < 0.01$).

Al comparar O con W se observó en O mayor depósito grasa y menor % de proteínas para una misma dieta experimental, menor niveles de marcadores bioquímicos y mayores niveles de glucosa, insulina, TGL y HOMA-IR. La BGP guardó una relación inversa con dichos parámetros y directa con CTX.

Conclusiones: Durante el período de crecimiento, la baja ICa o relación Ca/P dietaria modularía el PC, induciendo cambios en la composición corporal. La masa grasa no sería beneficiosa para la salud ósea. La BGP se asocia negativamente a la glucosa en ayunas y resistencia a la insulina; la deficiente ingesta de Ca induce cambios más negativos.

Palabras clave: Ratas Obesas, Ratas Wistar, Calcio, Grasa, Osteocalcina.

Interactions between calcium and energetic metabolisms in normal and spontaneously obese rats.

ABSTRACT

The aim of the present study was to compare absorption and retention of Ca, changes in body composition and in different parameters of energetic metabolism during growth. Spontaneously obese (IIMb/ β) (O) and Wistar (W) rats were mated; the dams fed an isocaloric diet with different Ca concentrations: High (ACa: 0.9%), Normal (NCa: 0.5%) and Low (BCa: 0.2%). Male pups continued receiving mother's diet until 60 years of age (ACa, NCa and BCa).

Body weight of O groups was inversely related to dietary Ca content, with no differences in water %; body protein % was lower in OBCa ($p < 0.01$). The ACa% was inversely related to dietary Ca content, while fat % did not change. OBCa presented the highest triglycerides and fasting glucose and insulin levels, and HOMA-IR ($p < 0.01$), the lowest body Ca and P content, total body BMC and, tibial and spinal BMD ($p < 0.01$). OACa showed similar body Ca% but lower total body BMC and, tibial and spinal BMD than ONCa ($p < 0.01$).

AWCa showed the highest fat% ($p < 0.01$). WBCa and WACa presented lower protein and ashes % than WNCa ($p < 0.01$). WACa showed the highest levels of triglycerides, glucose, insulin and HOMA-IR ($p < 0.01$).

Comparing O and W, the O groups showed a higher fat store and a lower protein %, a lower bone turnover and higher glucose, insulin and HOMA-IR levels for a same experimental diet. BGP levels presented an inverse relationship with these biochemical parameters, and a direct relationship with CTX.

Conclusions: During the growth period, the low Ca intake or dietary Ca/P relationship could modulate the body weight, inducing changes in body composition. The fat mass would not be beneficial for bone health. BGP levels are negatively associated to glucose and insulin resistance levels and the low Ca intake increase this negative effect.

Key Words: Obese Rats, Wistar Rats, Calcium, Fat, Osteocalcin.

Agradecimientos

A mi directora, la Dra. Susana Zeni, por estar siempre presente y dispuesta para guiarme en el desarrollo de mi trabajo, por su compromiso con este proyecto, por transmitirme sus conocimientos y por sus consejos.

A la Dra. María Luz Portela, por aportar sus conocimientos para la realización de este trabajo de tesis.

A la Dra. Beatriz Oliveri, por ofrecerme la oportunidad de formar parte de este grupo de trabajo.

A la Dra. Adriana Weisstaub, a Ricardo Orzuza, a Julia Somoza y a Gabriel Bryk, por su colaboración durante las experiencias y la realización de las determinaciones bioquímicas.

A mis compañeras Laura, Graciela, Silvina, Macarena, Gretel y Olga, por acompañarme durante este proceso y por los momentos compartidos.

A los integrantes de la Cátedra de Bromatología y Nutrición de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario (UNR), con especial mención a la Dra. María Catalina Olguin.

A los integrantes de las Cátedras de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) y de Bioquímica General y Bucal de la Facultad de Odontología (UBA), por facilitar los espacios para el desarrollo de las experiencias.

Dedicatoria

A mi familia

PUBLICACIONES RELACIONADAS AL TRABAJO DE TESIS

Artículos en revistas de circulación periódica

- **Clarisa Marotte**, Adriana Weisstaub, Gabriel Bryk, Maria C Olguin, Marta Posadas, Diego M Lucero, Laura Schreier, Maria L Pita Martin de Portela, Susana N Zeni. **Dietary Calcium (Ca) and body composition and Ca metabolism during growth, in genetically obese (β) male rats.** EurJNutr. 2012 Mar 29 [*Epub ahead of print*].

Publicaciones como resúmenes

Resúmenes Publicados en Revistas con Referato

- **Marotte C**, Weisstaub A, Hernández E, Gonzales Chaves MMS, Pellegrini GG, Portela ML, Zeni SN. Body composition and bone markers in wistar and obese (β) growing rats, fed the recommended dietary calcium content. 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR). Denver, EEUU, septiembre de 2009 (abstract AO9002762). J Bone Miner Res 24 (Suppl 1). Available at: <http://www.asbmr.org/Meetings/AnnualMeeting/Abstract>. Accessed September 17, 2009.
- Weisstaub A, Hernández E, Gonzales Chaves MMS, Pellegrini GG, **Marotte C**, Portela ML, Zeni SN. Influencia del contenido de calcio de la dieta sobre el metabolismo óseo en ratas genéticamente obesas durante el crecimiento. XV Congreso Latinoamericano de Nutrición. XVI Jornadas de la Sociedad Chilena de Nutrición. Santiago de Chile, Chile, noviembre de 2009. Rev Chil Nutr Vol 36 (Supl I) (abstract 1064), 2009.
- **Marotte C**, Weisstaub A, Hernández E, Pellegrini GG, de Portela ML, Gonzales Chaves M, Zeni SN. Dietary calcium content influences body composition and bone markers of obese (beta o) growing rats. 37th European Calcified Tissue Symposium (ECTS). Glasgow, Escocia, junio de 2010. Bone 47(Suppl 1): S191 (abstract 198), 2010.
- **Marotte C**, Weisstaub A, Gonzales Chaves MMS, Bryk G, Olguin M, Lucero DM, Schreier L, Portela ML, Zeni SN. Body composition, bone metabolism and insulin resistance interrelationship in spontaneously obese rats feeding different calcium content. 38th European Calcified Tissue Symposium. Atenas, Grecia, mayo de 2011. Bone 48(2):325, 2011.

- **Marotte C**, Bryk G, Olguin M, Lucero DM, Schreier L, Friedman SM, Portela ML, Zeni SN. Calcium intake affects body composition, bone metabolism and insulin resistance in spontaneously obese rats. 33rd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR). San Diego, California, EEUU, septiembre de 2011. J Bone Miner Res 25 (Suppl 1):1-631, (abstract no 430), 2011.
- **C Marotte**, A. Weisstaub, J. Somoza, ML Portela, SN Zeni. Comparative bone turnover in Wistar (W) and obese (ob) growing rats, fed different dietary calcium content. 39th Annual Congress of the European Calcified Tissue Society (ECTS). Estocolmo, Suecia, mayo de 2012. Bone 51 (4): S144-145.

PREMIOS RECIBIDOS

- La vitamina D3 es más efectiva que la D2 para elevar los niveles de 25OHD cuando se la administra oralmente según las recomendaciones nutricionales. MMS Gonzales Chaves, **C Marotte**, GG Pellegrini, SM Friedman, SN Zeni. 13^o Congreso Internacional de Medicina Interna del Hospital de Clínicas. Buenos Aires, agosto de 2010. *Premio al mejor trabajo de presentación oral.*

ABREVIATURAS

1.25(OH)₂D: 1.25 dihidroxivitamina D

1αOHLasa: 1αhidroxilasa

25OHD: 25 hidroxivitamina D

A: Absorción

aa: Aminoácidos

ACa: Alto contenido de calcio

AC-II: Anhidrasa Carbónica Osteoclástica

AGCC: Ácidos Grasos de Cadena Corta

AGL: Ácidos Grasos Libres

AIN: American Institute of Nutrition

ANOVA: Análisis de varianza

AOAC: Association of Officials Analytical Chemists

AP: Anteroposterior

APC: Adenomatous Polyposis Coli

Arg: Arginina

Asp: Asparagina

B: Balance

BCa: Bajo contenido de calcio

BFR/BV-BF/BS: Tasa de formación ósea

BGP: Osteocalcina

BGPnc: Osteocalcina no carboxilada

BMPs: Proteínas morfogenéticas óseas

BV/TV: Volumen Óseo/Volumen Total de Tejido

C/EBPs: Factores de transcripción CCAAT/Enhancer Binding Proteins

C-: Extremo carboxilo terminal

Ca: Calcio

Ca⁺⁺: Ion calcio

[Ca⁺⁺]_i: Concentración intracelular de calcio

CaBP: Calbindina

CaCO₃: Carbonato de calcio

CART: Transcripto regulado por cocaína-anfetamina

CaSR: Receptor sensor de calcio

CATK: Catepsina K

CB 28KD: Calbindina 28KD

CB 9KD: Calbindina 9KD

Cbfa1: Factor de transcripción Runx2

CC: Composición Corporal

Cd: Cadmio

CK1: Caseína Kinasa 1

CL: Columna Lumbar

Cl⁻: Ion cloruro

ClH: Ácido clorhídrico

ClNa: Cloruro de sodio

cm: Centímetros

cm²: Centímetros cuadrados

CMO: Contenido Mineral Óseo

CO₂: Dióxido de carbono

Col: Colesterol

Col1: Gen que codifica para colágeno tipo I

CT: Calcitonina

CTR: Receptores de calcitonina

CTX: Telopéptido C del colágeno tipo I

CV: Coeficiente de Variación

DEA: Dietanolamina

d: Día

dl: Decilitros

DMO: Densidad Mineral Ósea

DMOcol: DMO de columna lumbar

DMOtp: DMO de tibia proximal

D-Pir: Deoxipiridinolina

DBP: Vitamin D-Binding Protein

DXA: Absorciometría dual de rayos X

EAA: Espectrofotometría de Absorción Atómica

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico
ELISA: Inmunoensayo
ES/BS: Superficie de erosión
ES: Error estándar
F: Eliminación fecal
FA: Fosfatasa Ácida
FAL: Fosfatasa Alcalina Total
FAO: Fosfatasa Alcalina Ósea
FGF-23: Factor de crecimiento fibroblástico 23
FGFs: Factores de crecimiento fibroblástico
Fz: Receptor Frizzled
g: Gramos
h: Horas
GH: Hormona de crecimiento
GIP: Péptido Inhibitorio Gástrico
Gla: Ácido ϵ -carboxiglutámico/Residuo glutamil carboxílico
GLP1: Péptido glucagon-símil 1
GLP2: Péptido glucagon-símil 2
Glu: Ácido glutámico
Gly: Glicina
GSK3: Glucógeno Sintetasa Kinasa 1
H⁺: Ion hidrógeno
H⁺-ATPasa: Bomba de protones
H₂CO₃⁻: Bicarbonato
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
HBA: Ácido hidroxibenzoico
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
HDL-Col: Colesterol HDL
Hhs: Hedgehogs
His: Histidina
HPO₄²⁻: Fosfato monoácido
HPT2º: Hperparatiroidismo secundario
I: Ingesta
I¹²⁵: Iodo radioactivo isótopo 125

ICa: Ingesta de calcio
IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia
IGF-1: Factor de crecimiento insulinosímil-1
IL-1: Interleuquina 1
IL-6: Interleuquina 6
IMC: Índice de Masa Corporal
INF- γ : Interferón gamma
Ip: Intraperitoneal
K: Potasio
K⁺: Ion potasio
Kcal: Kilocalorías
Kev: Kiloelectronvoltio
Kj: kilojoules
Km: Constante de afinidad
L: Litros
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LEC: Líquido Extracelular
LPL: Lipoproteínlipasa
LRP5/6: Proteína relacionada con el receptor de LDL 5 y 6
Lys: Lisina
M: Molar
M-CSF: Factor estimulante de colonias macrofágicas
MEC: Matriz Extracelular
mEq: Miliequivalentes
Mg: Magnesio
mg: Miligramos
MIt: Tiempo de mineralización
ml: Mililitros
mm: Milímetros
mM: Milimolar
mmol: Milimoles
MMPs: Metaloproteasas de la matriz
mRNA: RNA mensajero
MSCs: Stem cells mesenquimáticas

N-: Extremo amino terminal
N: Nitrógeno
Na: Sodio
Na⁺: Ion sodio
NCa: Contenido normal de calcio
NCX1: Intercambiador antiporte 2Na⁺/Ca⁺⁺
ng: Nanogramos
NK: Natural Killer
nM: Nanomolar
nmol: Nanomoles
NTX: Telopéptido N del colágeno tipo I
O.Th: Ancho osteoide
O: Oxígeno
Ob.S/BS: Superficie osteoblástica
Oc.S/BS: Superficie osteoclástica
ON: Osteonectina
OPG: Osteoprotegerina
OPN: Osteopontina
OS/BS: Superficie osteoide
OST-PTP: Tirosina fosfatasa
Osx: Osterix
P: Fósforo
PINP: Propéptido amino terminal
Pb: Plomo
PC: Peso Corporal
PDM-1: Proteína Dentinaria de la Matriz
PGM: Proteína Gla de la matriz
Phex: Phosphate-Regulating Neutral Endopeptidase on Chromosome X
PIPC: Propéptido carboxilo terminal
Pir: Piridinolina
PM: Peso Molecular
pM: Picomolar
PMCA: Bomba de intercambio Ca⁺⁺-ATPasa
PNC: Proteínas No Colágenas

p-NFF: p-nitrofenilfosfato

PPAR γ : Factores de transcripción Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ

PTH: Parathormona

PTHr1: Receptor específico 1 para PTH

PTHrp: Péptido relacionado a la parathormona

Q: Quilomicrones

QCT: Tomografía cuantitativa computarizada

RANK: Receptor-Activador del Factor Nuclear kB

RANKL: Ligando del Receptor-Activador del Factor Nuclear kB

RE: Retículo Endoplasmático

REL: Retículo Endoplasmático Liso

RER: Retículo Endoplasmático Rugoso

RGD: Arginina-Glicina-Aspártico

RIA: Radioinmunoanálisis

RTK: Receptor tirosina quinasa

Rx: Rayos X

SIBLING: Small Integrin-Binding Ligand, N-Glicosilated Protein

SNC: Sistema Nervioso Central

SO₄H₂: Ácido sulfúrico

SPD: Densitometría fotónica simple

SPO: Sialoproteína Ósea

SREBP-1: Factor de transcripción Sterol-Regulatory Element-Binding 1

Tb.N: Número de trabéculas por milímetro

Tb.Sp: Separación trabecular

Tb.Th: Grosor trabecular

TF: Tiempo Final

TGF- β : Factor de crecimiento tumoral beta

TGL: Triglicéridos

TMB: Tetrametilbenzidina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TP: Tíbia Proximal

TRAP: Fosfatasa ácido tartrato resistente

TRC: Transporte Reverso de Colesterol

TRP: Receptor potencial transiente

TRPC: Receptor potencial transiente subfamilia canónica
TRPM: Receptor potencial transiente subfamilia melastásica
TRPV: Receptor potencial Transiente subfamilia vaniloide
U: Eliminación urinaria
UCP: Proteína desacoplante
UI: Unidades Internacionales
UROs: Unidades de Remodelamiento Óseo
UV-B: Radiación ultravioleta B
VDR: Vitamin D Receptor
Vit. D: Vitamina D
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad
VO: Volumen Óseo
Wnt: Wingless proteins
W.Th: Espesor trabecular
Zn: Zinc
µm: Micrómetros

ÍNDICE GENERAL

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
TEJIDO ÓSEO	1
-Generalidades	1
-Composición	3
-Minerales	3
-Materia orgánica	4
-Células óseas	8
-Osteoblastos	8
-Osteocitos	12
-Osteoclastos	15
REMODELAMIENTO ÓSEO	18
-Regulación	21
-Evaluación	21
-Histología	22
-Bioquímica	23
-Densitometría ósea	26
METABOLISMO DEL CALCIO	27
-Ingesta	28
-Absorción	30
-Mecanismos de absorción de calcio	31
-Mecanismo transcelular	32
-Entrada a través del ribete en cepillo	32
-Trasporte intracelular	33
-Pasaje al LEC	33
-Mecanismo paracelular	34
-Excreción	34

-Vía fecal	34
-Vía urinaria	34
-Otras vías	35
CALCIO COMO COMPONENTE DE LOS TEJIDOS BLANDOS	35
-Calcio del líquido intracelular	35
-Calcio del líquido extracelular	36
REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS CÁLCICA	37
-Parathormona	37
-Acción homeostática de la parathormona	38
-Péptido PTH similar	39
-Vitamina D	40
-Otras hormonas	45
-Hormona de crecimiento	45
-Calcitonina	45
-Insulina	46
-Amilina	48
-Leptina	48
-Adiponectina	49
-Ghrelina	50
-Hormonas entéricas	50
METABOLISMO DEL FÓSFORO	51
-Absorción	52
-Excreción renal	53
-Regulación hormonal	53
GENERALIDADES DEL METABOLISMO LIPÍDICO	54
-Metabolismo del tejido graso	55
-Ingesta	55
-Adipogénesis	57

TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO SECRETOR	59
-Citoquinas	60
-Leptina	60
-Resistina	61
-Adiponectina	62
<u>HIPÓTESIS</u>	63
<u>OBJETIVOS</u>	64
OBJETIVOS GENERALES	64
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	65
-Animales	65
-Dietas experimentales	65
-Drogas utilizadas	66
DISEÑO EXPERIMENTAL	67
METODOLOGÍA	68
-Ingesta dietaria	68
-Peso corporal	68
-Absorción aparente y balance	68
-Determinaciones bioquímicas séricas	69
-Determinación urinaria de calcio	73
-Determinación de grasa en heces	73
-Determinaciones del contenido mineral en dieta y heces	74
-Composición corporal	74
-Determinaciones densitométricas	75

-Métodos estadísticos	75
<u>RESULTADOS</u>	77
RESULTADOS EN RATAS OBESAS	77
-Características clínicas	77
-Ingesta y peso corporal	77
-Composición corporal	79
-Parámetros relacionados al metabolismo lipídico	84
-Parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa	85
-Absorción y balance de calcio	86
-Retención corporal de calcio y fósforo	87
-Parámetros densitométricos	89
-Parámetros relacionados al metabolismo fosfocálcico y óseo	90
RESULTADOS EN RATAS WISTAR	91
-Características clínicas	91
-Peso corporal e ingesta	91
-Composición corporal	92
-Parámetros relacionados al metabolismo lipídico	97
-Parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa	99
-Absorción y balance de calcio	100
-Retención corporal de calcio y fósforo	101
-Parámetros densitométricos	103
-Parámetros relacionados al metabolismo fosfocálcico y óseo	103
COMPARACIÓN ENTRE RATAS OBESAS Y WISTAR	104
-Composición corporal	104
-Absorción y retención de calcio	106
-Interrelación entre metabolismo óseo e indicadores del metabolismo energético	108

<u>DISCUSIÓN</u>	113
RATAS OBESAS	113
-Impacto sobre la composición corporal	113
-Impacto de los metabolismos de calcio y óseo	118
RATAS WISTAR	119
-Impacto sobre la composición corporal	120
-Impacto de los metabolismos de calcio y óseo	121
COMPARACIÓN ENTRE ANIMALES OBESOS Y WISTAR	121
<u>CONCLUSIONES</u>	125
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	126

INTRODUCCIÓN

TEJIDO ÓSEO

Generalidades

El hueso es un tejido conectivo especializado que se encuentra vascularizado e innervado y, a diferencia de otros tejidos conectivos, su matriz extracelular (MEC) está mineralizada. Tal mineralización le suministra al hueso una marcada rigidez y fuerza manteniendo, al mismo tiempo, cierto grado de elasticidad. Este hecho le confiere funciones de soporte y protección de órganos internos, pero además la participación activa en el mantenimiento de la homeostasis corporal de calcio (Ca) y fósforo (P).

La MEC del hueso se encuentra constituida en un 95% por colágeno tipo I; el 5% restante está compuesto por proteoglicanos y numerosas proteínas no colágenas (PNC). La sal cristalina es un fosfato de Ca complejo denominado *hidroxiapatita*, que se deposita sobre la matriz orgánica bajo un estricto control celular (*Marks SC y col., 1996*).

La MEC ósea es única en el sentido de que se regenera a lo largo de la vida como consecuencia del proceso de *remodelamiento óseo*. Por ello, el hueso es un tejido dinámico que se renueva constantemente, con lo cual el hueso viejo es reemplazado por hueso nuevo (*Robey PG y col., 2008*).

Anatómicamente se pueden distinguir dos tipos de hueso:

- **planos** como el cráneo, la escápula y la mandíbula
- **largos** como la tibia, el fémur y el húmero

La histogénesis de ambos tipos de hueso es diferente: en el primer caso es intramembranosa mientras que en el segundo es endocondral; sin embargo, en el desarrollo y crecimiento de los huesos largos se observa una mezcla de ambos tipos de hueso (*Baron R, 1999*).

Morfológicamente se diferencian dos formas de hueso: cortical o compacto y trabecular o esponjoso. En el hueso cortical, las fibras de colágeno densamente empaquetadas forman láminas concéntricas, mientras que las de las láminas adyacentes se disponen en planos perpendiculares. En el hueso trabecular existe una matriz porosa menos organizada en la cual las trabéculas forman una red de interconexión entre ellas. Las diferencias entre ambos tipos de

hueso son tanto estructurales como funcionales ya que, mientras el cortical posee funciones mecánicas y protectoras, el trabecular posee funciones fundamentalmente metabólicas (*Marks SC y col., 1996*).

El hueso cortical constituye el 80% del total del esqueleto y se encuentra altamente mineralizado. El trabecular constituye el 20% restante y sólo se encuentra calcificado en un 30%; el resto está ocupado por médula ósea, vasos sanguíneos y tejido conectivo. Este hecho es el que determina que presenten una funcionalidad diferente.

El remodelamiento óseo es el resultado de la acción de las células óseas. A nivel del hueso trabecular dichas células se encuentran cercanas a la médula ósea, asegurando un gran aporte de progenitores celulares y factores proteicos y una regulación principalmente de naturaleza local. El hueso cortical, más denso, está alejado de la médula pero es atravesado por capilares, arterias y venas, por lo cual su control es realizado principalmente por factores sistémicos (*Mundy GR, 1996*).

La distribución corporal de ambos tipos de hueso no es uniforme. A nivel de columna lumbar el hueso trabecular constituye un 60% del área total; en la zona intratrocantérica del fémur existe un 50% de ambos tipos de hueso; en el cuello de fémur el hueso cortical constituye un 75% y aumenta hasta alcanzar un 95% a nivel del radio medio. Por ende, el diferente comportamiento de estas áreas frente a la pérdida de hueso y al riesgo de fracturas se debe a la diferente proporción de ambos tipos de hueso.

Los huesos largos presentan dos extremidades (epífisis) y una parte media cilíndrica (diáfisis) hallándose entre ambas zonas la metáfisis, responsable del crecimiento en largo del hueso. En este sentido, durante el crecimiento la metáfisis y la epífisis están separadas por un espacio denominado cartílago de crecimiento (*Figura 1*).

La parte externa del hueso está cubierta por una fina y densa capa de hueso compacto que, a nivel de la diáfisis, contiene a la cavidad medular donde se aloja la médula ósea. La cortical se afina hacia la metáfisis y las epífisis; ambas se encuentran recubiertas en su interior por hueso trabecular conteniendo médula ósea entre sus trabéculas. Por lo tanto, el hueso se contacta con los tejidos blandos tanto a nivel de la superficie externa o periostio como de la superficie interna o endosteo.

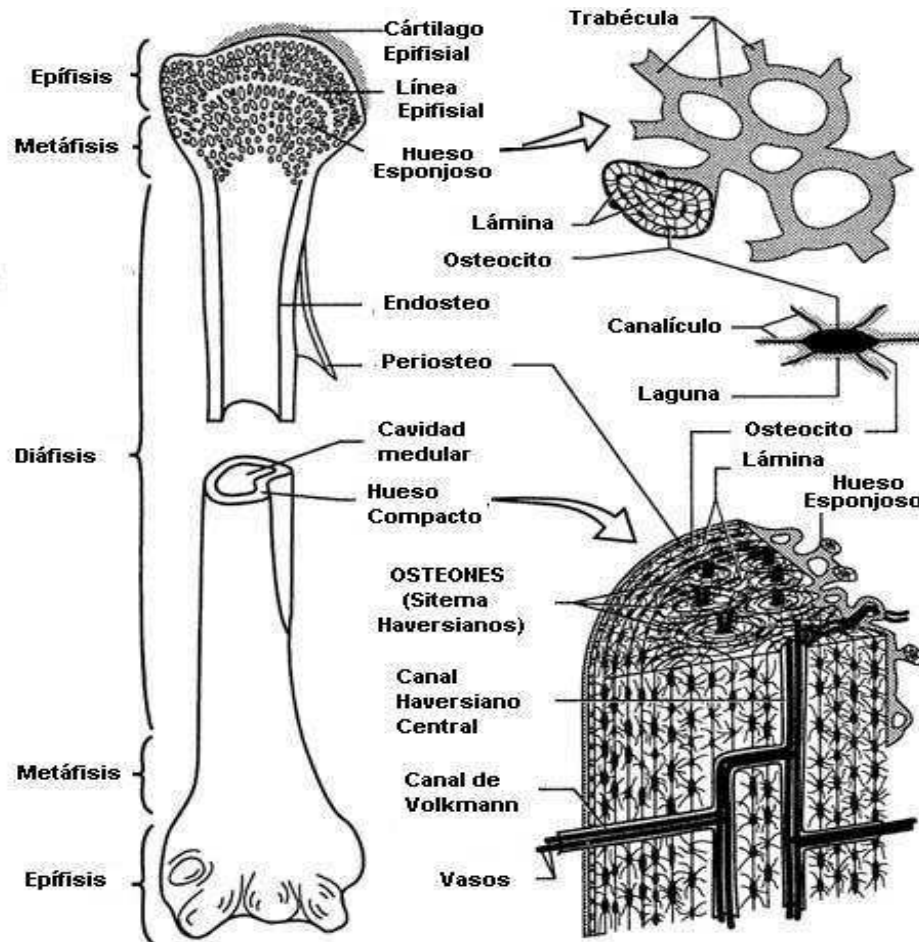


Figura 1.- Estructura ósea de un hueso largo: hueso cortical y hueso trabecular.

Composición del hueso

La MEC ósea está compuesta por hidroxapatita, colágeno tipo I, agua, PNC y lípidos, en proporción decreciente. Estos componentes presentan propiedades tanto mecánicas como metabólicas (Robey PG y col., 2008). Asimismo, el hueso contiene elementos celulares propios como *osteoblastos*, *osteocitos* y *osteoclastos*, que se comunican entre ellos y con otras células presentes en el microambiente óseo por contacto directo o a través de moléculas de señalización.

Minerales

El mineral óseo representa las dos terceras partes del volumen óseo y está constituido principalmente por Ca (99%) y P (85%), los que se asocian formando el cristal de hidroxapatita. A medida que el cristal crece y madura se impurifica con otros minerales como sodio (Na) (35%) y

potasio (K) (25%) así como con minerales menos abundantes [plomo (Pb), zinc (Zn) y cadmio (Cd)]. En el espacio mineral se encuentra el 60% de magnesio (Mg) del organismo, aunque sin formar parte de la estructura cristalina. Además de dichos cationes, en el cristal de hidroxiapatita se adsorben aniones como hidroxilo, carbonato, fluoruro y citrato. Por lo tanto, el cristal óseo constituye un fosfato de Ca complejo que se caracteriza por su pequeño tamaño (200-400nm de largo, 20-40nm de ancho y 10-20nm de grosor) y por su asimetría física y electrostática. Estas características son las responsables de que posea una gran superficie por unidad de peso, favoreciendo el depósito de agua e iones en el interior.

Las funciones del mineral son las de fortalecer al componente colagenoso suministrándole mayor resistencia mecánica al tejido y, al mismo tiempo, al ser depósito de diferentes iones participa en el mantenimiento de la homeostasis mineral.

Materia orgánica

Matriz orgánica

La matriz orgánica corresponde al 35% del peso seco del hueso y está formada por proteínas fibrosas, fundamentalmente colágeno tipo I (90%) aunque puede encontrarse colágeno tipo III, principalmente durante el crecimiento. Las fibras de colágeno tipo I se encuentran inmersas en una sustancia fundamental amorfa compuesta por glicoproteínas y proteoglicanos. Estos complejos aniónicos presentan una elevada capacidad de unión a cationes, por lo que juegan un rol importante en el proceso de calcificación y en la fijación de los cristales a las fibras de colágeno.

Además del colágeno, otras proteínas se encuentran en la matriz orgánica. La mayor parte de dichas proteínas y factores proteicos son producidos en el microambiente óseo por las células óseas; un cuarto de ellas son exógenas, fundamentalmente proteínas séricas como albúmina.

Cada uno de los componentes de la matriz orgánica del hueso influye en el mecanismo de deposición mineral; algunos promueven la mineralización, otros inhiben la formación y/o el crecimiento del cristal, y hasta pueden ser multifuncionales, promoviendo en ciertos casos e inhibiendo en otros.

Colágeno tipo I

Esta proteína está constituida por una triple hélice que contiene dos cadenas peptídicas $\alpha 1(I)$ idénticas y una cadena $\alpha 2(I)$, estructuralmente similar pero genéticamente diferente. Dichas cadenas se caracterizan por poseer un triplete Gly-X-Y repetitivo (donde X es generalmente prolina, e Y es a menudo hidroxiprolina).

El colágeno es producido por las células osteoformadoras, que durante el período de proliferación sintetizan las cadenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$ como precursores, los que presentan grandes extensiones amino (N-) y carboxilo (C-) terminales llamadas propéptidos PINP y PICP, respectivamente (Manolagas S, 2000). Una vez formados, ambos propéptidos sufren varias modificaciones postraduccionales:

- (1) hidroxilación de ciertos residuos de lisina y prolina. La hidroxilación de la prolina a hidroxiprolina es crítica para la estabilización de la molécula. La hidroxilación de lisina a hidroxilisina es indispensable para la modificación que se produzca la glicosilación;
- (2) glicosilación de hidroxilisina con residuos de glucosa, galactosa o ambos;
- (3) adición de un oligosacárido rico en manosa a los propéptidos terminales y
- (4) formación de uniones (puentes) covalentes intra e intermoleculares (Robey PG y col., 2008).

El agregado del oligosacárido es seguido por la asociación de las fracciones propeptídicas C-terminales. En dicho proceso dos pro $\alpha 1$ y un pro $\alpha 2$ se asocian formando uniones disulfuro intra e intercatenarias, ensamblando así las tres cadenas propeptídicas desde la fracción C-terminal hacia la N-terminal.

Tan pronto los tres propéptidos forman la triple hélice son transportados desde el retículo endoplasmático (RE) hacia las vesículas del aparato de Golgi para ser secretadas a la MEC. Allí, ambas fracciones propeptídicas serán removidas por enzimas proteolíticas dejando libre al colágeno maduro (Figura 2).

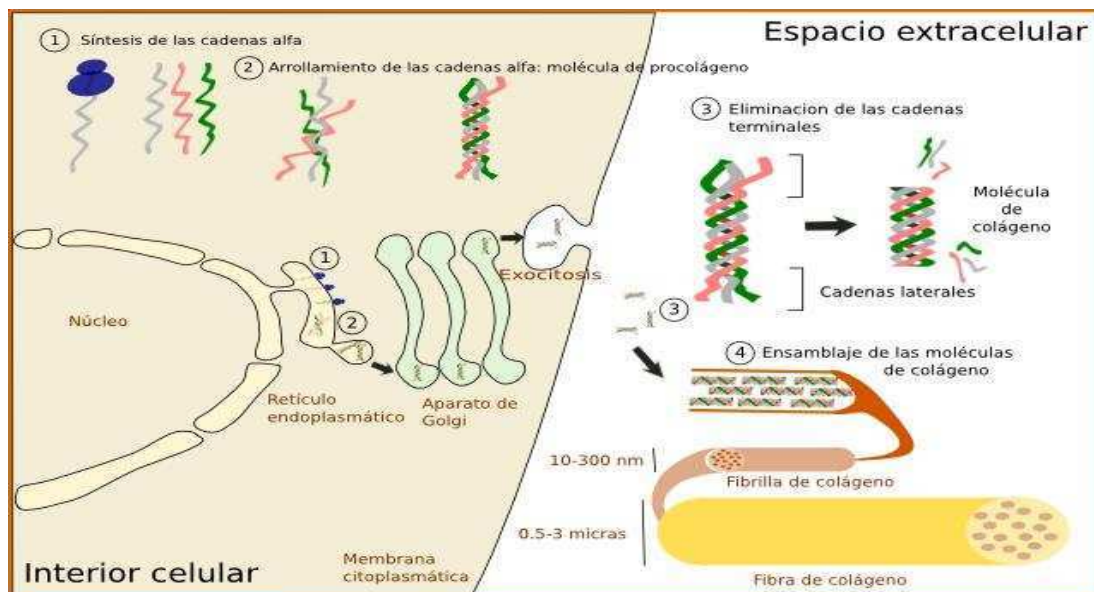


Figura 2.- Etapas de formación del colágeno maduro. Figura extraída de Internet. <http://www.biologiacelular-arlett.blogspot.com>.

La pérdida de estas fracciones propeptídicas hace que descienda dramáticamente la solubilidad de la molécula de colágeno. Las fracciones liberadas asistirían en la formación y crecimiento de las fibras quedando eventualmente inmersas en la matriz, aunque parte de ellas escaparían al suero, donde pueden ser determinadas bioquímicamente. La determinación sérica del PINP es utilizada clínicamente para evaluar el proceso de formación ósea (*Reynaga Montecinos B y col., 2009 (Figura 3)*).

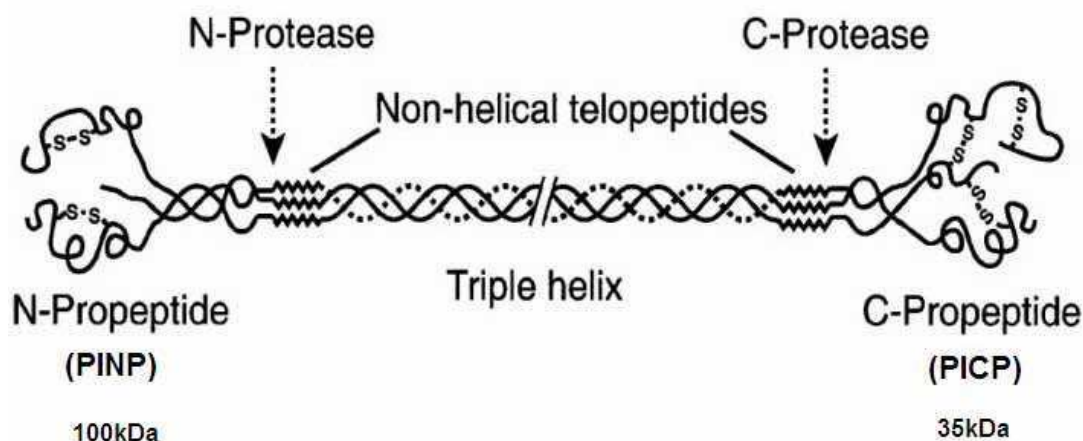


Figura 3.- Fracciones propeptídicas del colágeno tipo I. Figura extraída de internet. <http://www.scielo.org.ar>.

Proteínas no colágenas

Las PNC constituyen entre el 10 y el 15% del contenido total de proteínas del hueso; participan en la organización de la MEC, coordinando las interacciones célula-matriz y mineral-matriz y regulan el proceso de mineralización (*Robey PG y col., 2008*).

Proteínas derivadas del suero:

Esta fracción está formada por albúmina y α 2-HS-glicoproteína, que al ser ácidas se unen a la matriz ósea debido a su afinidad por la hidroxapatita. Aunque no son sintetizadas en el microambiente óseo, estas proteínas ejercen efectos sobre la mineralización de la matriz y la proliferación de las células óseas. El resto de la fracción proteica exógena está compuesto por factores de crecimiento y una gran variedad de otras moléculas presentes en el orden de trazas, que influirán en la actividad local de las células óseas.

Proteínas derivadas de las células óseas:

Estas moléculas pueden clasificarse en cuatro grupos:

(1) Proteoglicanos, implicados en la regulación de la organización de la matriz, fibrillogénesis y señalización celular.

(2) Glicoproteínas.

Las principales glicoproteínas son:

- **Fosfatasa alcalina (FAL):** esta enzima glicoproteica es fundamental en el proceso de mineralización ya que hidroliza al pirofosfato, inhibidor de deposición mineral, aumentando la concentración local de fosfatos.
- **Osteonectina (ON):** esta glicoproteína fosforilada representa, en muchas especies animales, cerca del 2% del total de PNC del hueso en desarrollo. Sus funciones son múltiples, asociándose al crecimiento y/o la proliferación de osteoblastos y a la mineralización de la matriz. Asimismo, regula la organización del colágeno, se une a factores de crecimiento y mediaría en la deposición de hidroxiapatita.

(3) Proteínas glicosiladas con potencial actividad de unión celular.

Todas las células de los tejidos conectivos interactúan con su MEC en respuesta a diferentes estímulos que dirigen y/o coordinan funciones celulares específicas como migración, proliferación y diferenciación. Estas interacciones, mediadas por receptores de superficie, involucran la unión celular a través de adhesiones focales transientes o estables a macromoléculas extracelulares que subsecuentemente transducen señales intracelulares. Las células óseas sintetizan al menos doce proteínas glicosiladas que median las uniones celulares. Todas ellas son miembros de la familia SIBLING (“Small Integrin-Binding Ligand, N-Glycosylated Protein”). Entre ellas se encuentran la *osteopontina* (OPN), la *sialoproteína ósea* (SPO), la *proteína dentinaria de la matriz-1* (PDM-1), la *sialofosfoproteína de la dentina*, la *fosfoproteína de la matriz extracelular*, la *fibronectina* y la *trombospondina*. Muchas de dichas proteínas se encuentran fosforiladas o sulfatadas y contienen la secuencia aminoacídica de unión celular RGD (arginina-glicina-aspartico) que reconoce moléculas de superficie celular de la clase integrina aunque, en algunos casos, la unión sería independiente de esta secuencia.

Cada proteína SIBLING regula la formación de hidroxiapatita en solución. A modo de ejemplo, la SPO es un nucleador de la hidroxiapatita; tanto la OPN como la SPO anclan los osteoclastos al hueso a través de secuencias poliácidas RGD de aminoácidos y unen el Ca^{++} con alta afinidad.

(4) Proteínas gla γ -carboxiladas.

Las proteínas con residuos de ácido glutámico (Glu) como la *proteína gla de la matriz* (PGM), la *osteocalcina* (“Bone Gla-Protein”, BGP) ambas de síntesis endógena, y la *proteína S* (sintetizada principalmente en hígado, pero también por células osteogénicas) son modificadas

postraduccionalmente por la acción de γ -carboxilasas dependientes de vitamina K. Los residuos glutamyl dicarboxílicos (gla) incrementan la unión de Ca^{++} (Robey PG y col., 2008).

Otros componentes

Además de los antes mencionados, existen componentes menores que afectan las propiedades de la MEC. Por ejemplo, existen numerosas enzimas importantes para el procesamiento de los componentes de la misma; algunas de ellas se asocian a células y otras se encuentran libres en la matriz.

Agua

El agua representa alrededor del 10% del peso del hueso, dependiendo de la especie y de la edad. Es importante para la nutrición de las células y de la matriz, para el control del flujo iónico y para mantener la estructura colágena, dado que esta proteína retiene el mayor porcentaje del agua de la MEC.

Células óseas

Las células óseas provienen de dos progenies diferentes: osteoblastos, osteocitos y células en reposo o "lining cells" que se originan de células osteoprogenitoras locales, y las células resortivas u osteoclastos que surgen a partir de la fusión de precursores mononucleares originados en el tejido hematopoyético (Marks SC y col., 1996).

Las células osteoprogenitoras residen en la médula ósea previo a su diferenciación en osteoblastos turgentes y poligonales, los cuales se encuentran presentes sobre la superficie ósea. Por un mecanismo desconocido, algunas de dichas células están destinadas a convertirse en osteocitos mientras otras se transforman en "lining cells", y otras sufren apoptosis. Las "lining cells" son células planas, alargadas e inactivas que cubren las superficies en reposo.

Osteoblastos

Los osteoblastos constituyen entre el 4% y el 6% del total de las células óseas y son los responsables de la producción de matriz ósea.

Los osteoblastos derivan de células pluripotenciales mesenquimáticas o "stem cells" (MSCs) que se localizan en médula ósea, músculo y grasa y pueden diferenciarse a una variedad de tejidos incluyendo hueso, cartílago, músculo y grasa (Marks SC y col., 1996). El osteoblasto y el condrocito se diferencian a partir de un precursor mesenquimal común denominado precursor osteo-condrogénico. La diferenciación hacia los distintos linajes está controlada por una multitud de citoquinas que regulan la expresión de factores de transcripción linaje-específicos (Figura 4).

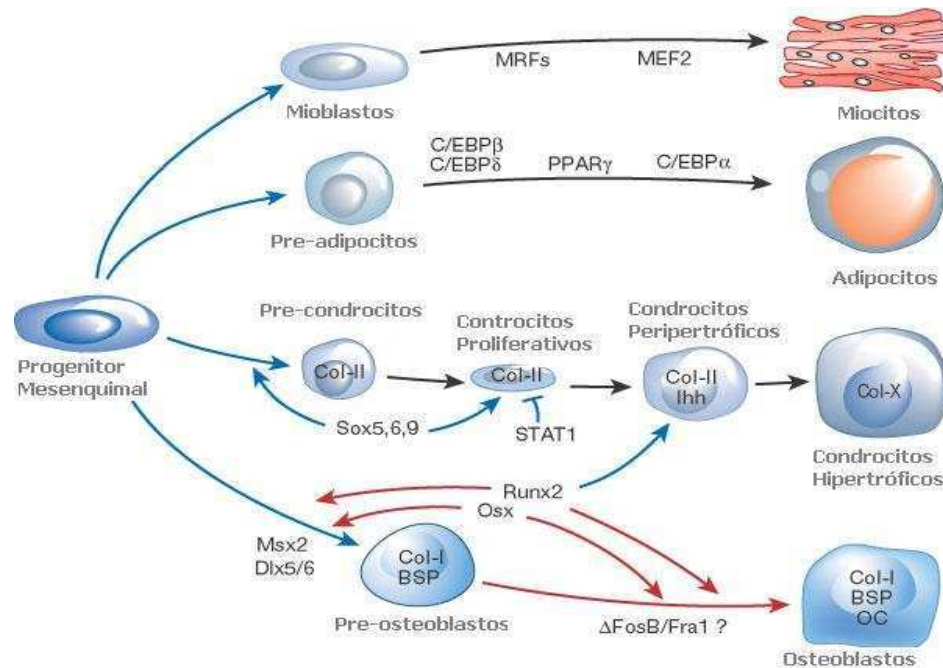


Figura 4.- Diferenciación de la progenie mesenquimal hacia osteoblastos, condrocitos, adipocitos o miocitos.

Un evento esencial en la diferenciación osteoblástica, y punto de convergencia de muchas vías de transducción de señales involucradas, es la activación del factor de transcripción Runx2 (Cbfa1) (Figura 3). Este factor puede regular, positiva o negativamente, la expresión de una gran variedad de genes que codifican para marcadores de la progenie osteoblástica mediante su interacción con otros activadores y represores transcripcionales, y otras proteínas regulatorias. Entre estos genes se encuentran los que codifican para la FAL (marcador temprano), el colágeno tipo I (Col1), la SPO, la OPN, la ON y la BGP (marcador tardío).

Runx2 también regula la expresión de otro factor transcripcional, Osterix (Osx), esencial para la transformación de progenitores pluripotentes en preosteoblastos, ya que regula la expresión de genes responsables de la síntesis de BGP, OPN, ON y Col1 (Krause C y col., 2008) (Figuras 4 y 6).

Entre las citoquinas involucradas en la diferenciación osteoblástica se encuentran los "Hedgehogs" (Hhs), las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), el péptido relacionado a la parathormona (PTHrp) y la vía de las Wnts ("Wingless proteins").

Las BMPs que se expresan en tejido esquelético son necesarias para su desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis del hueso. Dichas proteínas pertenecen a la supefamilia del

TGF- β y poseen a las proteínas Smad como mediadores intracelulares de las vías de señalización. Las BMPs se pegan a receptores de tipo quinasa que fosforilan los extremos C-terminales de las proteínas Smad (Smad1; 5 y 8); se asocian a Smad4 y se translocan al núcleo donde, junto con otros factores de transcripción, se unen a promotores de genes relacionados a la diferenciación osteoblástica como Runx2. Se cree que BMP2 induce la expresión de Osx.

El TGF- β está implicado en el control de proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de muchos tipos celulares. Es una de las citoquinas más abundantes de la matriz ósea y participa en el desarrollo y mantenimiento del esqueleto, afectando tanto el desarrollo del cartílago como el del hueso. Puede tener efectos positivos o negativos, dependiendo del contexto y la concentración. Las vías de transducción de señales de TGF- β son similares a las de BMPs.

Las Wnts son glicoproteínas solubles que transducen sus señales a través de receptores transmembrana de la familia Frizzled (Fz) y de correceptores LRP5 y 6 ("Low-density Lipoprotein Receptor-related Proteins 5 and 6"). En ausencia del ligando Wnt, se forma un complejo denominado proteasoma entre Adenomatous Polyposis Coli (APC), Axina, Glucógeno Sintetasa Kinasa 3 (GSK3) y Caseína-Kinasa 1 (CK1). Este complejo facilita la fosforilación y degradación proteasomal de la β -catenina. La unión del ligando Wnt permite anclar a la membrana a la molécula de axina, con lo cual no puede formarse el complejo que fosforila a la β -catenina. Esto provoca la disociación del proteasoma; la β -catenina se acumula y se transloca al núcleo donde inicia la transcripción de genes blanco a través de la formación de un complejo con los factores de transcripción TCF/Lef1 (Figura 5).

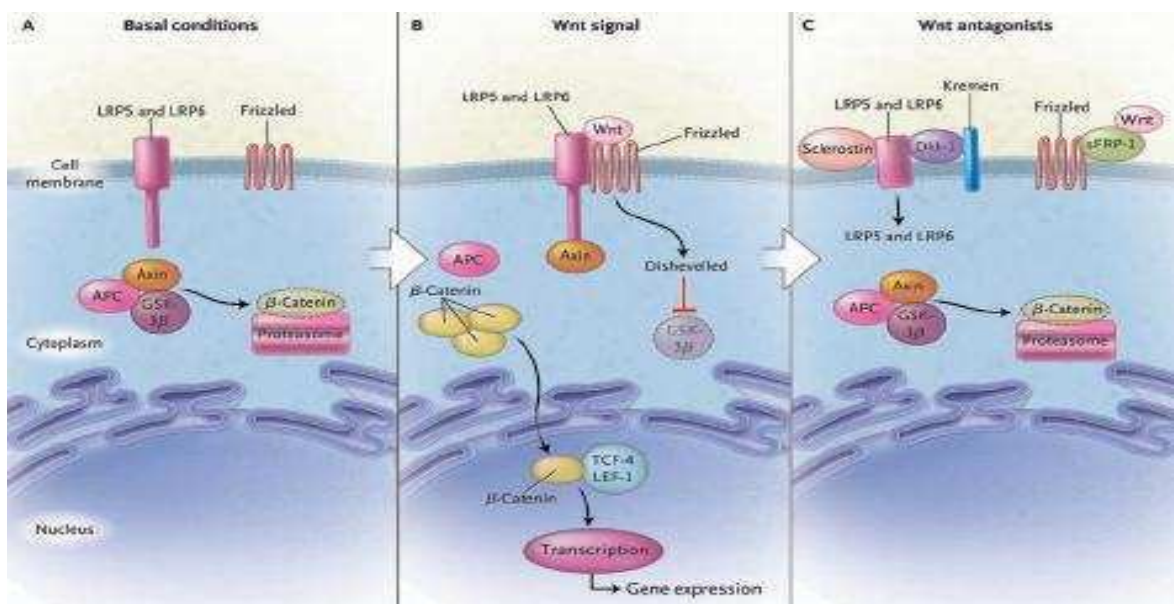


Figura 5.- Vía de transducción de señales Wnt para la diferenciación osteoblástica. (Canalis E. y col., 2007).

La señal Wnt conduce a la diferenciación de células osteo-condrogénicas progenitoras hacia el linaje osteoblástico (Krause C y col., 2008).

El factor de crecimiento insulino-símil (IGF-1) es secretado, entre otras, por las células esqueléticas. Este factor proteico es considerado un regulador auto-parácrino de la función osteoblástica que estimula la diferenciación de las células osteoprogenitoras.

El proceso de diferenciación osteoblástica puede dividirse en varias etapas que incluyen la proliferación, el depósito de MEC, la maduración de la matriz y la mineralización (Krause C y col., 2008).

La correcta estimulación de los precursores y progenitores osteoblásticos dará lugar a la proliferación y diferenciación mesenquimal a preosteoblastos (Figura 6); dichas células se ubican en la superficie ósea, en las proximidades de los osteoblastos maduros, y se las reconoce por su actividad de FAL, uno de los marcadores tempranos del fenotipo osteoblástico.

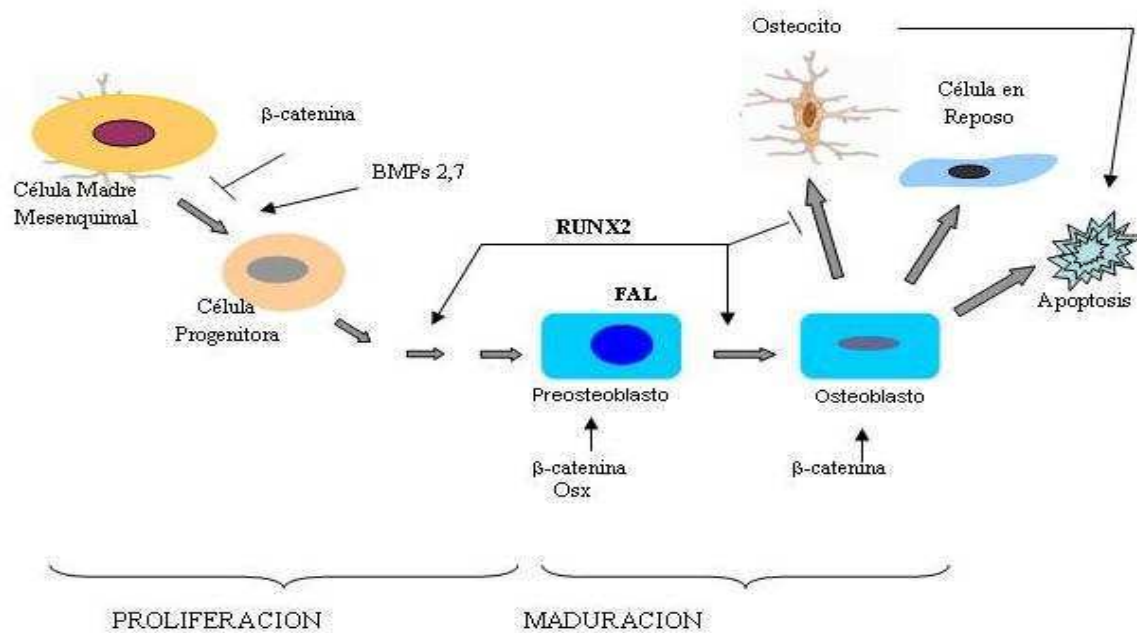


Figura 6.- Diferenciación osteoblástica.

En la superficie inactiva del hueso se ubican los osteoblastos en reposo o "lining cells". Estas células forman el endosteo, separando el hueso de la médula ósea, o bien recubren el periostio directamente sobre la superficie mineralizada. Los osteoblastos maduros y en reposo se encuentran en íntimo contacto entre sí mediante uniones adherentes formadas por proteínas transmembrana dependientes de Ca denominadas *cadherinas*.

Los osteoblastos no se encuentran aislados, sino en agrupaciones de células cuboides; presentan un RE y un aparato de Golgi prominentes, característicos de las células secretoras de proteínas. Los osteoblastos se ubican siempre sobre una capa de matriz orgánica u *osteoide* que ellos mismos están produciendo. Este tejido no mineralizado es el resultado del espacio de tiempo que se extiende entre la formación de la matriz y su subsiguiente calcificación, que es de alrededor de 10 días, denominado maduración del osteoide.

Hacia el final del período secretante el osteoblasto puede seguir varios caminos, transformándose en una célula plana, en un osteocito o muriendo por apoptosis (*Figura 6*). Se considera que sólo el 20% de las células muere, mientras que el mayor porcentaje se transforma en osteocitos.

Los osteoblastos, además de sintetizar colágeno tipo I y varias PNC, liberan al microambiente óseo una amplia variedad de factores de crecimiento y citoquinas como el IGF-1, el *ligando del receptor-activador para el factor nuclear $\kappa\beta$* (RANKL), la *osteoprotegerina* (OPG), alguno de las cuales participan en su propia regulación. La membrana del osteoblasto es rica en FAL, cuya concentración en suero es utilizada como índice de formación ósea. El osteoblasto presenta receptores para *parathormona* (PTH) y PTHrp, *vitamina D* (vit. D), glucocorticoides y estrógenos (Eo), pero no para calcitonina (CT) (*Marks SC y col., 1996*).

RANKL y OPG son dos citoquinas secretadas por los osteoblastos que regulan la diferenciación y la actividad de los osteoclastos.

A través de los receptores para PTH y PTHrp, estas hormonas pueden tener efectos tanto anabólicos como catabólicos sobre el hueso, induciendo la liberación de distintos factores osteoblásticos. Mientras que la administración intermitente de ambas estimula la formación, el tratamiento continuo lleva a la pérdida ósea. Este hecho es consecuencia de que con la unión de estos ligandos a su receptor específico 1 (PTHr1), acoplado a una proteína G, se pueden activar diversas vías intracelulares. Se han sugerido diferentes mecanismos para explicar dichos efectos anabólicos y catabólicos, los que a su vez dependerían del contexto, como estadio de diferenciación, dosis y tiempo de exposición (*Krause C y col., 2008*).

Osteocitos

Los osteocitos corresponden a la última etapa de diferenciación osteoblástica, ya que en un estadio previo de diferenciación fueron osteoblastos, que al quedar atrapados en la matriz mineralizada que ellos mismos produjeron, se transformaron en osteocitos. Dicha diferenciación ocurre en alrededor de tres días, en los cuales el osteoblasto sintetiza un volumen de MEC tres veces superior a su propio volumen celular. En ese proceso el osteoblasto reduce su tamaño

aproximadamente en un 30% y comienza a formar prolongaciones celulares de conexión (*Marks SC y col., 1996 y Bonewald LF, 2008*) (*Figura 7*).

En el esqueleto adulto los osteocitos son las células mayoritarias, ya que representan entre el 90% y el 95% del total de células que lo componen. Están dispersos de manera regular a lo largo de la matriz mineralizada y se encuentran conectados entre sí, con células en reposo y con osteoblastos de la superficie ósea mediante prolongaciones dendríticas denominadas “gap junctions” (*Figura 7*). Las prolongaciones dendríticas, que generalmente irradian hacia la superficie y hacia el flujo sanguíneo, viajan por el hueso dentro de pequeños canales denominados canalículos, mientras que el cuerpo celular queda encerrado en el interior de una pequeña laguna osteocítica. Esas prolongaciones citoplasmáticas forman un sincitio funcional que responde a diversos estímulos hormonales y mecánicos; asimismo, como recorren enteramente la matriz mineralizada, adquieren especial importancia en el tránsito metabólico, en el intercambio de sustancias y en la nutrición celular (*Bozal C, 2006*).

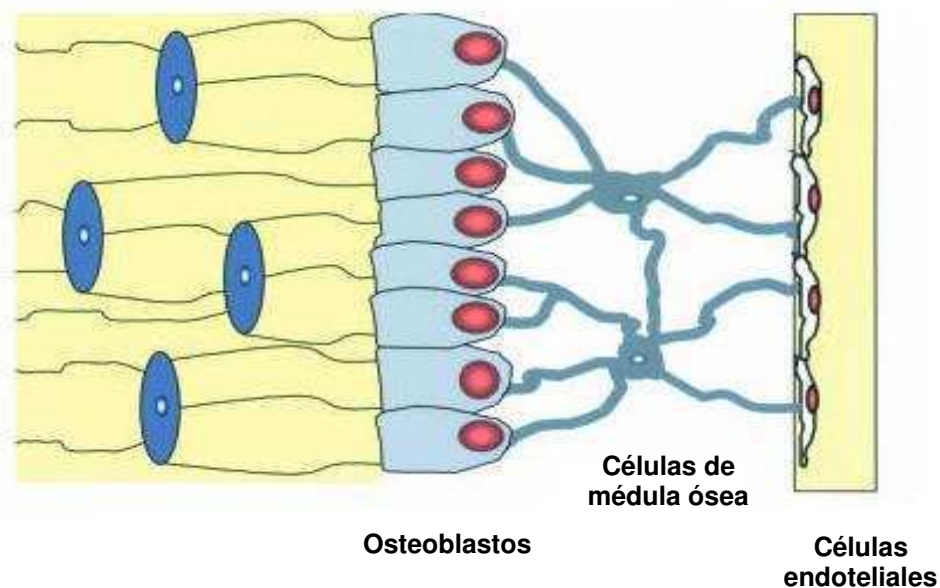


Figura 7.- Esquema del sincitio funcional formado por osteocitos, osteoblastos, células del estroma y células endoteliales. Tomado y modificado de Plotkin LI y col., 1999.

Entre la membrana plasmática del osteocito y la matriz ósea se encuentra un pequeño espacio periosteocítico bañado por líquido extracelular (LEC) cuya característica es presentar una concentración de calcio iónico (Ca^{++}) menor al plasmático (0.5 vs.1.5mM), sugiriendo un flujo continuo del ion hacia el exterior del hueso. Aparentemente, el mecanismo implicado involucraría

a la membrana osteocítica, quien bombearía al Ca^{++} desde el líquido óseo al LEC creando la diferencia de concentración que existe entre ambos.

La morfología del osteocito varía de acuerdo a la edad de la célula y a su actividad funcional. El osteocito joven presenta la mayoría de las características ultraestructurales del osteoblasto, excepto por una disminución en el volumen celular y en la cantidad de organelas involucradas en la síntesis proteica (RE y aparato de Golgi). Un osteocito maduro, localizado en las profundidades del hueso calcificado, presenta más acentuadamente dichas disminuciones y posee acumulación de glucógeno en su citoplasma.

En la actualidad se ha determinado que los osteocitos juegan un rol fundamental en el control del recambio óseo, ya que funcionan como una red laguno-canalicular de células sensoras que median los efectos de la carga mecánica. Estas células no sólo se conectan entre sí y con células de la superficie ósea, sino que sus prolongaciones dendríticas se extienden más allá de la superficie ósea dentro de la médula, respondiendo a fuerzas mecánicas e iniciando el remodelamiento. Recientemente se ha demostrado que los osteocitos regulan la homeostasis del P, por lo cual la red de osteocitos funcionaría además como una glándula endócrina (*Bonewald LF, 2008*). Los osteocitos controlan el remodelamiento óseo y el metabolismo del P mediante la expresión de PDM-1 y *esclerostina* (*Khosla S, 2008*).

Hasta la actualidad se han identificado unos pocos marcadores osteocíticos; entre ellos Phex ("Phosphate-Regulating Neutral Endopeptidase on Chromosome X"), PDM-1, *esclerostina* y el factor fosfatúrico FGF-23 (Factor de crecimiento fibroblástico 23). Mientras la *esclerostina* se expresa en etapas tardías de diferenciación, el resto lo hace en etapas tempranas. Mediante la expresión de Phex y PDM-1 los osteocitos serían los principales reguladores del proceso mineralización (*Bonewald LF, 2008*).

Los osteocitos controlan tanto la resorción como la formación ósea. Respecto de la resorción, participan de la activación osteoclástica mediante la apoptosis osteocítica que ocurre en los sitios de microfracturas. En este sentido, los cuerpos apoptóticos secretan señales de resorción que son captadas por precursores osteoclásticos que se diferencian a osteoclastos maduros, los que inician la resorción y la remoción de los osteoblastos apoptóticos. Este hecho ocurre en un área que se extiende por alrededor de 1mm; más allá del sitio de fractura se secretan moléculas antiapoptóticas para proteger de la muerte celular programada al resto de los osteocitos (*Bonewald LF, 2008*).

Los osteocitos controlan el proceso de formación ósea negativamente, a través de la *esclerostina*. Dicha proteína es un inhibidor de la vía de Wnt, por el cual la β -catenina puede fosforilarse frenando así la diferenciación osteoblástica (*Figuras 5 y 6*).

Osteoclastos

Los osteoclastos activos son células multinucleadas gigantes con actividad resortiva de tejidos mineralizados (Marks SC y col., 1996). Proviene de la médula ósea y son miembros de la familia monocito/macrofágica. Dos citoquinas secretadas por los osteoblastos son esenciales y suficientes para la osteoclastogénesis basal. La primera es el *factor estimulante de colonias macrofágicas* (M-CSF), también llamado CSF-1, y la segunda es el RANKL (Figura 8). Estos dos factores existen tanto en forma unida a membrana como soluble; mientras la primera forma es secretada por células T activadas, la forma soluble es producida por células madre estromales y sus osteoblastos derivados. Por lo tanto, el reclutamiento fisiológico de los osteoclastos a partir de sus precursores mononucleares requiere de la presencia de estas células no hematopoyéticas. Mientras que el M-CSF contribuye a la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de precursores osteoclásticos, el RANKL es la citoquina osteoclastogénica clave para la diferenciación y supervivencia celular (Ross FP, 2008).

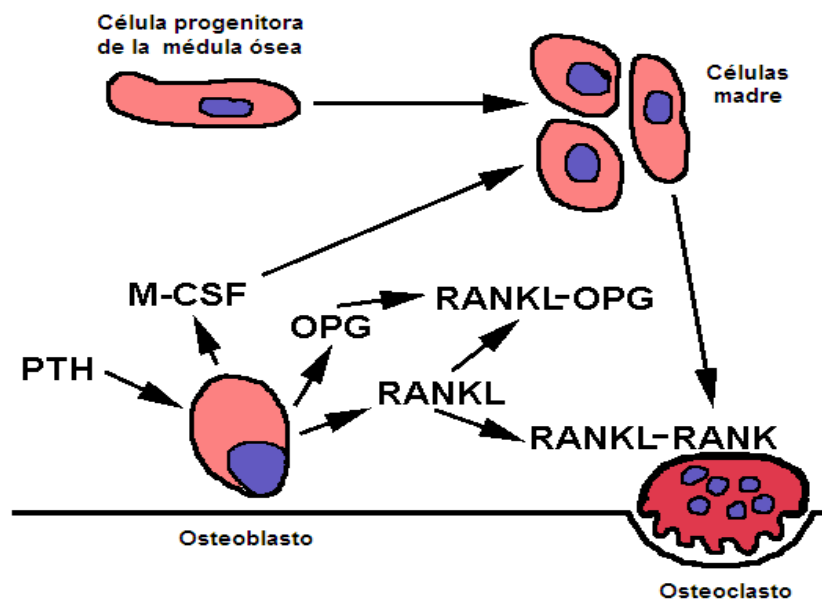


Figura 8.- Rol de las citoquinas en la formación osteoclástica. Figura extraída de Internet.
<http://www.library.med.utah.edu>.

Los factores M-CSF y RANKL regulan el proceso resortivo mediante la unión a receptores específicos que llevan a la activación de los factores transcripcionales c-Fms y NF κ B respectivamente, implicados en la proliferación y diferenciación osteoclástica. En dicho proceso precursores osteoclásticos se transforman en preosteoclastos que expresan *fosfatasa ácido tartrato resistente* (TRAP) 5a y 5b, *catepsina K* (CATK), *metaloproteasas de la matriz* (MMPs), *receptores de calcitonina* (CTR) e *integrina $\alpha_v\beta_3$* (Figura 9).

Los preosteoclastos contienen un solo núcleo y pueden pasar al microambiente óseo por diapédesis, adheriéndose a las células endoteliales mediante una proteína de membrana denominada anexina II, perteneciente a la familia de las cadherinas.

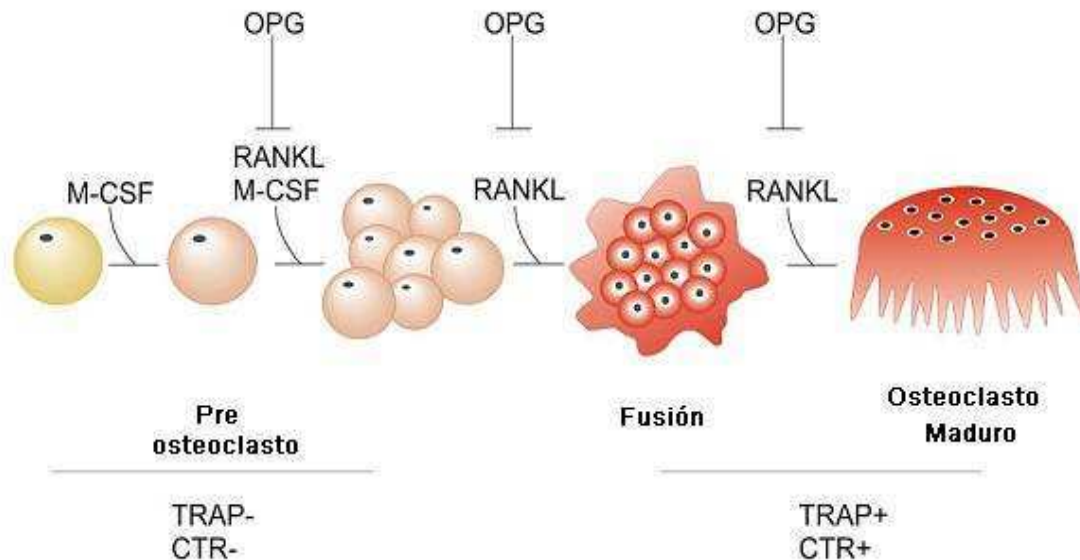


Figura 9.- Osteoclastogénesis y factores involucrados.

El proceso de resorción osteoclástica depende de la conexión física entre el osteoclasto y la matriz; este hecho es posible por la acción de moléculas de adhesión expresadas en sus membranas, pertenecientes a la familia de las *integrinas*. Las integrinas son heterodímeros $\alpha\beta$, con dominios extracelulares largos y dominios transmembrana cortos simples que median el reconocimiento osteoclasto/hueso. En el osteoclasto se encuentran diversos miembros de la familia de integrinas β_1 , que reconocen al colágeno tipo I. Si bien se encuentran la integrina $\alpha_2\beta_1$, la fibronectina y la laminina, la principal integrina mediadora de la resorción es la integrina $\alpha_v\beta_3$. Este heterodímero reconoce secuencias aminoacídicas RGD, las cuales se encuentran presentes en una variedad de proteínas residentes en hueso como OPN y SPO (Ross FP, 2008). Por ello los osteoclastos, al reconocer y adherirse al hueso, delimitan una zona por debajo de la célula donde se generará el *ribete en cepillo* (Kitaura H y col., 2005).

Una vez reconocida el área a resorber, los preosteoclastos se fusionan unos con otros para formar osteoclastos multinucleados inmaduros. Diversas citoquinas inducen cambios estructurales internos que producen su maduración, preparando a la célula para resorber hueso. El RANKL es la principal citoquina osteoblástica involucrada en este proceso que, mediante su unión al receptor RANK presente en la membrana del osteoclasto, induce la polarización de la célula. Este hecho

consiste en el reacomodamiento del citoesqueleto de actina formando una “zona de sellado” y un ribete en cepillo. Dicha organela presenta una serie de vellosidades producto de la fusión de vesículas lisosomales transportadas a la membrana que se apoya en el hueso donde se fusionan, probablemente a través de microtúbulos de actina. Allí se encuentra presente la maquinaria transportadora de protones (H^+), que creará un microambiente acidificado y enzimas líticas como CATK y diversas MMPs, principalmente MMP9, que se liberarán por exocitosis (Figura 10). Además de la formación del ribete en cepillo, el contacto con el hueso promueve la polarización de la actina fibrilar formando, una estructura circular llamada *anillo de actina*. Esta zona de sellado rodea y aísla el microambiente resortivo acidificado de la célula activa, pero se desconoce su composición. Al igual que el ribete en cepillo, el anillo de actina indica la capacidad resortiva del osteoclasto, ya que cuando el proceso se encuentra inhibido se observan anomalías en cualquiera de ambas formaciones (Ross FP, 2008).

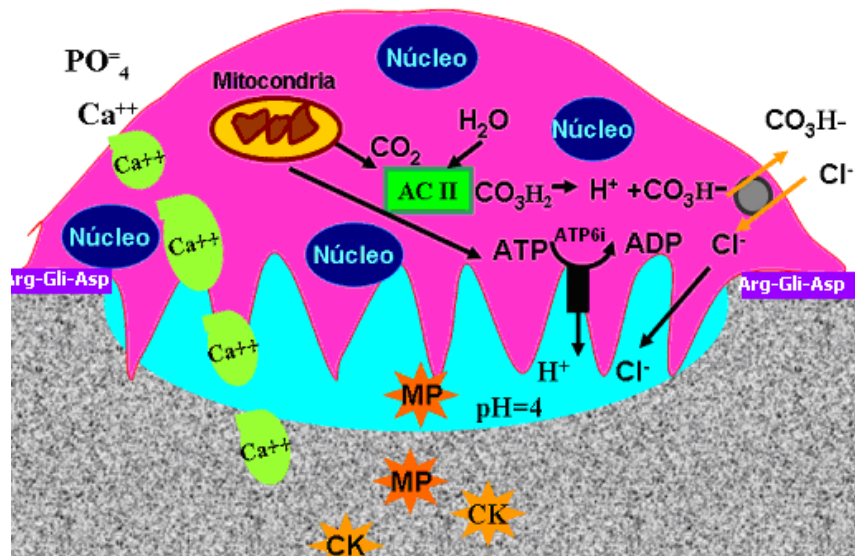


Figura 10.- Esquema del osteoclasto maduro y el proceso de resorción ósea.

La capacidad del osteoclasto para generar un microambiente entre la célula y la matriz subyacente es clave para el evento resortivo. Una vez formado, dicho compartimiento se acidifica por medio de una bomba de protones (H^+ -ATPasa) denominada *complejo ATP6i* y un *canal de cloruro* (Cl^-), que lo libera debido al intercambio de cloruro/bicarbonato ($Cl^-/H_2CO_3^-$). El ácido clorhídrico (ClH) generado disminuye el pH hasta 4.5 aproximadamente, por lo cual el cristal de hidroxiapatita se disuelve dejando expuestas a las moléculas de colágeno tipo I. Una anhidrasa carbónica osteoclástica (AC-II) es la responsable de transformar el dióxido de carbono (CO_2) en $H_2CO_3^-$ y H^+ . Al mismo tiempo se liberan enzimas líticas contenidas en las vesículas que romperán

el colágeno en sitios determinados, generando los telopéptidos del colágeno tipo I. La primera en actuar es la CATK, cuyo pH óptimo se encuentra alrededor de 4 y cuya acción genera telopéptidos específicos de degradación ósea. El medio por debajo del osteoclasto se va alcalinizando hasta un pH cercano a 6, al cual se liberan las MMPs 9 y 13 generando otros telopéptidos distintos a los producidos por CATK. Estos procesos dan lugar a la ruptura completa del colágeno y por ende a la degradación del hueso, generando un pozo llamado *laguna de Howship*. Los productos de degradación, fragmentos de colágeno, Ca^{++} e iones fosfato son procesados dentro del osteoclasto maduro y liberados a la circulación (*Figura 10*).

La actividad de la CATK dará lugar a telopéptidos del colágeno tipo I N- y C- terminales denominados NTX y CTX respectivamente, mientras que la actividad de la MMP-9 genera C-telopéptidos diferentes a los de la CATK denominados en este caso MMPCTX, antes conocidos como ICTP (*Frost HM, 1969*).

Diversas hormonas sistémicas y factores locales estimulan la resorción ósea induciendo la expresión de RANKL; otras, en cambio, inhiben la resorción estimulando la liberación de OPG. Esta citoquina actúa como un receptor “trampa”: modula la actividad resorptiva de RANKL al interponerse entre él y su receptor celular RANK, con lo cual induce la apoptosis de los osteoclastos y, por ende, la resorción ósea.

Las citoquinas proinflamatorias, la PTH y los corticoides suprimen la expresión de OPG incrementando simultáneamente la de RANKL, dando lugar a un marcado incremento de la diferenciación y función osteoclástica. Contrariamente, los estrógenos suprimen la expresión de RANKL y aumentan la de OPG, disminuyendo la función osteoclástica.

Remodelamiento óseo

El hueso es el único tejido del cuerpo que se destruye y se rehace nuevamente a sí mismo en un proceso dinámico denominado remodelamiento óseo (*Lee NK, 2008*). Durante este proceso, las dos células óseas especializadas resorben y depositan en el mismo sitio la MEC, que luego se mineralizará en un ciclo continuo que en el humano dura entre tres y cuatro meses y que en la rata es de aproximadamente veintidós días. El remodelamiento es el proceso que predomina en el adulto; sin embargo, durante el crecimiento se produce fundamentalmente *modelamiento*, que permite el crecimiento en largo y ancho de los huesos. En el modelamiento el osteoblasto puede depositar matriz y mineralizarla en un sitio diferente al de la resorción osteoclástica, con lo cual la actividad de ambas células óseas no se encuentra acoplada. El remodelamiento, en cambio, es un proceso acoplado en condiciones normales, ya que el osteoblasto sólo sintetizará y mineralizará el

hueso en el sitio donde previamente se produjo la resorción. Por este mecanismo se produce la reparación de las microfracturas que puedan producirse por envejecimiento del material y por la adaptación del hueso a las necesidades estructurales del organismo.

El remodelamiento normal necesita de un delicado balance entre la formación y la resorción del hueso. Este balance se ve reflejado en que los osteoblastos exhiben dos fenotipos opuestos: el primero de ellos es osteogénico, por el cual dichas células secretan la matriz ósea de colágeno tipo I en el sitio donde se ha producido la resorción de hueso viejo; el segundo fenotipo es osteoclastogénico ya que, mediante la liberación de M-CSF y RANKL, regula la diferenciación, actividad y supervivencia del osteoclasto en el área a resorber.

El remodelado óseo comprende un ciclo que es llevado a cabo en las denominadas *unidades de remodelamiento óseo* (UROs) (Figura 11). En dichas unidades, osteoblastos, osteoclastos y células accesorias del estroma forman un paquete celular en puntos concretos del esqueleto en los que la matriz mineralizada es resorbida y reconstruida en etapas sucesivas. El mecanismo es iniciado por las células mecano-sensoras del hueso u osteocitos. Ante la presencia de microfracturas por envejecimiento o apoptosis osteocítica, la laguna que los contiene cambia de forma, lo cual se trasmite a la superficie mediante sus prolongaciones citoplasmáticas. Los osteoblastos pueden “sensar” dichos cambios y enviar señales químicas al LEC que atraerán al sitio precursores osteoclasticos. A este punto del ciclo se lo conoce como *activación* del proceso (Figura 11).

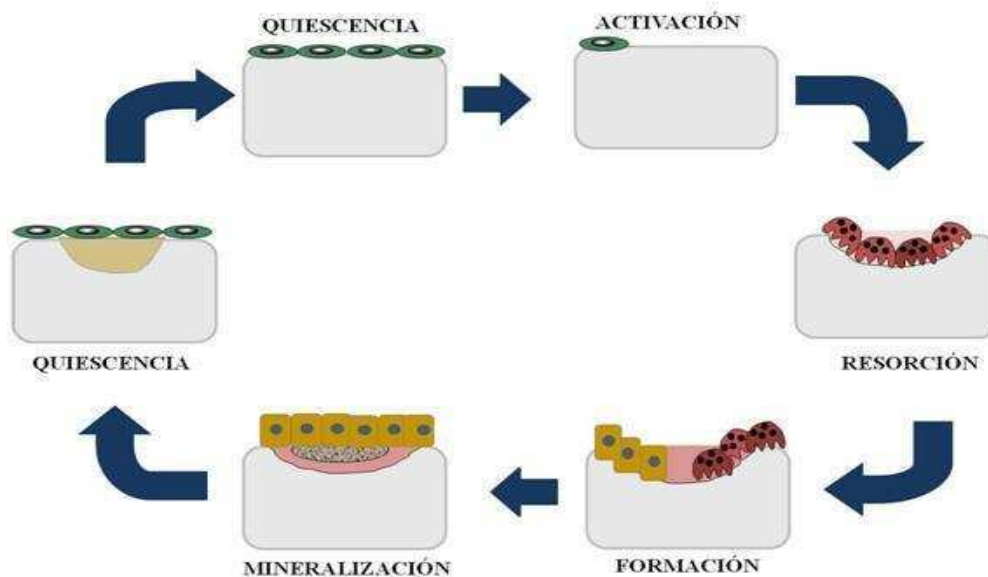


Figura 11.- Etapas del remodelamiento óseo. Figura extraída de internet.
<http://www.sebbm.es>.

Entre las señales liberadas por los osteoblastos se encuentran moléculas de adhesión pero también otras citoquinas como M-CSF y RANKL. La primera atraerá a los precursores osteoclasticos y la segunda permitirá la diferenciación de dichas células a preosteoclastos, que proliferarán y se fusionarán para resorber el hueso viejo.

Con la llegada de los osteoclastos y su unión al hueso se inicia la segunda etapa del ciclo denominada *resorción propiamente dicha*. En dicho proceso la ruptura de la matriz mineralizada libera una gran cantidad de citoquinas y factores de crecimiento que se encontraban inmersos en ella, algunos de las cuales están implicados en la limitación de la etapa de resorción (*Frost HM, 1969*).

Generalmente se encuentran uno o dos osteoclastos en el mismo sitio resortivo, salvo en condiciones de resorción exagerada en donde es posible encontrar hasta cinco células. El proceso resortivo es rápido, ya que dura entre diez y doce días, y finaliza con la apoptosis del o los osteoclastos intervinientes. La etapa siguiente se denomina *reversión* y constituye el punto más oscuro del proceso; consiste en la desaparición de las células multinucleadas y la aparición en su lugar de células mononucleares no funcionantes; al mismo tiempo, células pertenecientes a la progenie osteoblástica son atraídas al lugar por el fenómeno conocido como *acoplamiento*. Posiblemente la liberación de factores que habían quedado inmersos en la matriz y que se liberan en la resorción produzca el agrupamiento de preosteoblastos en los bordes y la superficie del área resorbida. Durante un período de transición, de alrededor de cuatro días en el hueso cortical y de nueve en el trabecular en el que aún no se hallan osteoblastos en el área resorbida, los macrófagos sintetizan una fina lámina de sustancia cementante que servirá para la adhesión de los precursores osteoblásticos y la formación del nuevo tejido (*Tresguerres JAF, 2005*).

Los preosteoblastos se diferencian a osteoblastos maduros e inician la etapa de *formación*. Esta etapa comienza con la síntesis de la matriz orgánica de colágeno tipo I y otras PNC como BGP y OPN, etc., factores de crecimiento como IGF-1 y FGFs, etc., que se incorporan a la matriz induciendo la maduración de la misma y dando lugar al tejido osteoide. Una vez concluida dicha maduración comienza la *mineralización* de la matriz, en la cual se depositan los cristales de hidroxiapatita (*Tresguerres JAF, 2005 y Reynaga Montecinos B y col., 2009*).

La etapa comprendida entre formación y mineralización completa del sitio de remodelamiento es un proceso lento que dura aproximadamente cuatro meses. En la Figura 12 se observa el ciclo de remodelamiento completo.

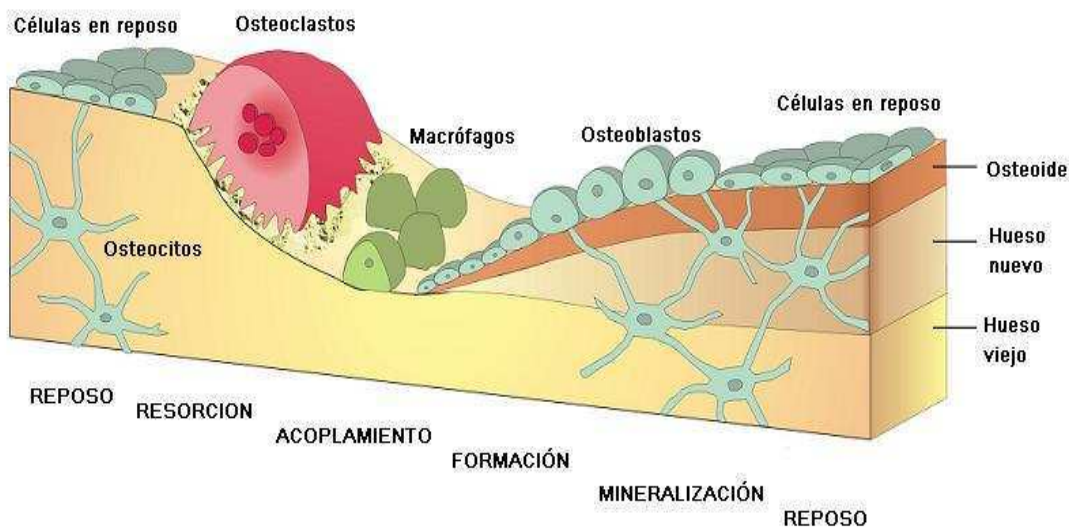


Figura 12.- Esquema del ciclo de remodelamiento óseo.

Regulación energética del metabolismo óseo

En términos de requerimiento energético, el remodelamiento óseo es un proceso costoso. En efecto, la resorción de la matriz mineralizada en múltiples sitios simultáneamente requiere una considerable cantidad de energía; lo mismo es válido para la formación de hueso. Como tal, el remodelamiento requiere un metabolismo energético completamente funcional, de manera que exista un suministro constante de energía para el funcionamiento de osteoclastos y osteoblastos (Lee NK y col., 2008).

Evaluación del metabolismo óseo

El remodelamiento óseo puede evaluarse en forma directa mediante *histomorfometría ósea* de un sitio determinado o indirectamente mediante la determinación bioquímica de *marcadores del remodelamiento óseo*, en sangre u orina. Estas metodologías indicarán en forma dinámica qué es lo que sucede durante el ciclo de remodelamiento óseo; sin embargo, mientras la histomorfometría ósea sólo evalúa un sitio puntual del esqueleto (por ej.: cresta ilíaca), los marcadores óseos son el producto final de la actividad de todas las UROs del esqueleto.

Los cambios en la cantidad de masa ósea pueden determinarse por *densitometría ósea* mediante la técnica de *absorciometría dual de rayos X (DXA)*, tanto de cuerpo entero como de una región determinada.

Histología

El examen histológico del hueso trabecular descalcificado es una herramienta clínica para estudiar la etiología, la patogénesis y el seguimiento de tratamientos de las enfermedades metabólicas óseas. En humanos, la biopsia ósea es comúnmente obtenida a nivel de cresta ilíaca en laboratorios patológicos especializados. El volumen óseo (VO), que se expresa con la sigla BV/TV, representa el porcentaje total de área ósea ocupada por hueso trabecular. El espesor trabecular (W.Th) representa la distancia media (μm) entre la superficie cancelar en reposo y la línea cemental. El grosor trabecular (Tb.Th) es la distancia media (μm) a lo largo de una trabécula individual y la separación trabecular (Tb.Sp) es la distancia media (μm) entre trabéculas. El número de trabéculas por mm (Tb.N) representa el número de trabéculas por unidad de hueso (BV/TV/Tb.Th). La superficie de erosión (ES/BS) es el porcentaje de superficie trabecular ocupada por lagunas de Howship con y sin osteoclastos. Las superficies osteoblástica (Ob.S/BS) y osteoclástica (Oc.S/BS) identifican el porcentaje de superficie trabecular ocupada por osteoblastos y osteoclastos, respectivamente. La superficie osteoide (OS/BS) es el porcentaje de superficie trabecular con osteoide no mineralizado, con y sin osteoblastos. El ancho del osteoide (O.Th) es el ancho medio (μm) de osteoide sobre la superficie cancelar.

Un agente marcador fosforescente suministrado a dos tiempos diferentes puede unirse a sitios de mineralización activa, permitiendo evaluar los cambios en un tiempo determinado. La superficie de mineralización (MS/BS) es el porcentaje de hueso cancelar mineralizado. La tasa de aposición mineral es la velocidad ($\mu\text{m}/\text{d}$) a la cual hueso nuevo se adiciona a la superficie cancelar y representa la distancia entre las dos marcaciones realizadas a distintos tiempos. La frecuencia de activación (Ac.f) es la probabilidad de que un nuevo ciclo de remodelamiento comience en un punto determinado de la superficie cancelar.

Las tasas de formación ósea (BFR/BV y BF/BS) son valores estimados de volumen y superficie de hueso trabecular, respectivamente. El intervalo ("lag") de tiempo de mineralización (Mlt) es la cantidad de días entre la formación del osteoide y su mineralización (*Parfitt AM y col., 1987*).

Estos parámetros pueden evaluarse en los animales de laboratorio. En la rata, la histología comúnmente se realiza a nivel de la porción media de la tibia distal o, en su defecto, en el fémur proximal.

Evaluación bioquímica del remodelamiento óseo***Marcadores de formación***

Los marcadores óseos son utilizados en la clínica diaria, ya que pueden determinar lo que sucede con el remodelamiento óseo durante un período corto de tiempo (meses). Dichas entidades químicas son enzimas, proteínas o factores producidos por la actividad de las células óseas. Los marcadores de formación provienen de la actividad del osteoblasto y los de resorción de la actividad del osteoclasto (*Tabla 1*).

MARCADORES DEL REMODELAMIENTO ÓSEO

<u>FORMACIÓN</u>	<u>RESORCIÓN</u>
FOSFATASA ALCALINA TOTAL E ISOFORMA ÓSEA (FAO)	FOSFATASA ÁCIDA TARTRATO RESISTENTE-5b (TRAP-5b)
OSTEOCALCINA (BGP)	CALCIURIA
PROPÉPTIDOS DE COLÁGENO TIPO I: AMINO (PINP) Y CARBOXILO (PICP) TERMINAL	HIDROXIPROLINA URINARIA PIRIDINOLINAS DEOXIPRIDINOLINA TELOPÉPTIDOS DEL COLÁGENO TIPO I: AMINO TERMINAL (NTX), CARBOXILO TERMINAL (CTX) Y C-TERMINAL DE LA REGIÓN α-1 DEL COLÁGENO (ICTP)

Tabla 1.- Marcadores del remodelamiento óseo.

Entre los marcadores de formación más utilizados se encuentra la FAL. Esta enzima es una glicoproteína tetramérica, perteneciente a una gran familia de proteínas unidas a las membranas celulares por un grupo glicano-fosfatidil-inositol C-terminal. Su vida media en suero es relativamente larga, de uno a dos días, lo que contribuye a que su variación diurna sea mínima. Su actividad total en suero es la resultante de la actividad de dos isoenzimas: una de naturaleza hepática, y otra de naturaleza ósea (FAO). La suma de ambas depende de la edad del individuo, ya que durante el crecimiento la FAO puede alcanzar hasta el 90% del total. Dicha proporción se invierte durante la edad adulta, en la cual la relación entre la fracción hepática y la ósea es de

60:40. Posteriormente, en la posmenopausia, dicha proporción vuelve a cambiar por aumento de la FAO, al aumentar el remodelamiento óseo ante la caída estrogénica.

Las isoenzimas hepática y ósea son idénticas en su composición aminoacídica, pero modificaciones postraduccionales hacen que presenten distinta movilidad electroforética, reactividad ante la lectina de germen trigo, susceptibilidad al calor e inhibición química, métodos todos ellos utilizados para separarlas. La FAO es sintetizada por preosteoblastos y osteoblastos maduros. Participa en la formación y mineralización ósea, y su medición es un índice más sensible y específico que la de FAL para evaluar la formación ósea.

La BGP es sintetizada por los osteoblastos en los últimos estadios de su diferenciación y es el constituyente proteico no colagenoso más importante de la matriz ósea. La síntesis de BGP se inicia con la formación de una molécula precursora de pro-BGP bajo el control de la vit. D. Posee 49 aminoácidos (aá); tres de ellos son de ácido glutámico (glu) que se carboxilan a residuos de ácido ϵ -carboxiglutámico (gla) en una forma vitamina K-dependiente. Tiene gran afinidad por los cristales de hidroxapatita, a los cuales se une por medio de la interacción entre el Ca^{++} y los residuos gla incorporándose rápidamente a la matriz ósea. La porción de BGP que no se incorpora al hueso difunde al suero, donde puede evaluarse como un marcador de formación ósea. Sin embargo, cuando el hueso se degrada, la BGP carboxilada pasa a circulación siendo indistinguible de la fracción que no fue utilizada en la formación ósea, por lo que también podría utilizarse como un marcador de resorción. Por lo tanto, actualmente se la considera un marcador de remodelamiento más que de formación. Como existe discrepancia entre los distintos métodos de medición y por la gran cantidad de fragmentos que se encuentran en circulación (de los cuales no puede discriminarse si provienen del proceso realizado en sangre, hueso o ambos), en la actualidad no se la considera un marcador bioquímico de elección para evaluar formación ósea en osteopatías, salvo en aquellas anomalías secundarias al tratamiento con glucocorticoides o durante el crecimiento.

La medición de BGP no carboxilada fue considerada como un índice de deficiencia de vitamina K (*Reynaga Montecinos B y col., 2009*); sin embargo, en la actualidad se la relaciona al control del metabolismo lipídico (*Motyl KJ y col., 2010*).

Los propéptidos de procolágeno derivan de la ruptura enzimática del procolágeno a colágeno tipo I, principal proteína extracelular de la matriz ósea. De ambos propéptidos, el PINP es considerado la fracción propeptídica que con mayor sensibilidad refleja la actividad total de formación (*Reynaga Montecinos B y col., 2009*).

Marcadores de resorción

La TRAP es una enzima osteoclástica de naturaleza lisosomal. Las fosfatasas ácidas (FA) forman parte de una familia de isoenzimas sintetizada por diferentes células tales como osteoclastos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y son expresadas en varios tejidos como hueso, riñón, hígado, bazo, próstata. Su actividad total en suero es la suma de dos fracciones que presentan diferente sensibilidad al tartrato. Todas las FA son inhibidas por L(+)-tartrato, excepto la banda 5 que es resistente. Dicha banda está compuesta por dos subtipos enzimáticos: TRAP 5a y TRAP 5b que se diferencian por la presencia de ácido siálico en la primera de ellas. La TRAP 5a constituye la fracción mayoritaria y proviene de células monocíticas; la TRAP 5b es liberada por los osteoclastos y su determinación es un buen indicador del número y actividad de dichas células.

El primer marcador de resorción utilizado que proviene de la degradación del colágeno fue la hidroxiprolina (aá no esencial que forma parte del colágeno maduro) (Figura 13).

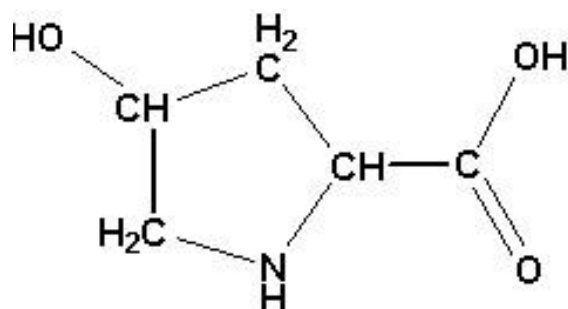


Figura 13: Molécula de hidroxiprolina. Figura extraída de internet. <http://www.scielo.org.ar>.

Las piridinolina (Pir) y deoxipiridinolina (D-Pir) son compuestos cíclicos responsables de la estabilización del colágeno tipo I ya que forman puentes de entrecruzamiento o “cross-links” entre residuos de hidroxilisinas en el primer caso y de lisinas en el segundo. Mientras que la Pir no es específica del hueso, la D-Pir sí lo es, y por lo tanto es un marcador específico de resorción (Figura 13). Los marcadores de resorción más específicos que se conocen hasta el momento son los telopéptidos CTX y NTX, productos de la acción de la CATK, mientras que el telopéptido MMPCTX sólo sería de utilidad en procesos neoplásicos de resorción ósea (Reynaga Montecinos B y col., 2009) (Figura 14).

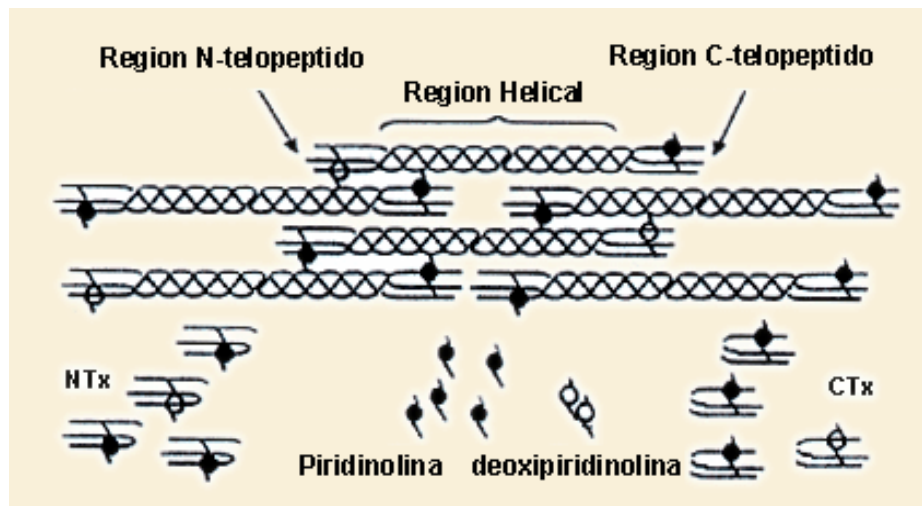


Figura 14.- Productos de la degradación del colágeno. Figura tomada de internet.
<http://www.infobioquimica.com.ar>

Densitometría ósea

En un principio la masa ósea se evaluó mediante rayos X (Rx). Sin embargo, debido a los posibles riesgos de pérdida de fertilidad por el uso de los mismos, se buscaron fuentes más seguras de radiación. Es así que se comenzó con el uso de isótopos emisores de radiación gamma monoenergéticos y de baja energía (20-100 Kev.), fuertemente colimadas para obtener una emisión prácticamente puntual (Mautalen CA, 1987). A fines de la década del 60 aparecen diversos métodos cuantitativos, entre ellos, la absorciometría fotónica. En primer lugar fue la *Densitometría Fotónica Simple* (SPD) y posteriormente la *Densitometría Fotónica Dual* y la *Densitometría de Doble Energía* (DXA).

La técnica de DXA es hoy la más utilizada y se basa en la diferencia de absorción de energía entre los tejidos blandos y el hueso, permitiendo eliminar el error que introduce la mayor o menor cantidad de grasa corporal en la medición de la masa ósea (Ibañez R, 2001). Esto es importante en zonas de gran espesor de partes blandas (abdomen, área lumbar, cadera). DXA valora el estado esquelético de los pacientes mediante un rastreo más rápido y de mayor resolución que la SPD, técnica esta última que sólo permite evaluar el esqueleto periférico (Nottestad SY y col., 1987 y Adams J y col., 2009). Dentro de la técnica de densitometría aparecen nuevas variantes como la DXA periférica (Cosman F y col., 1991), que mide la densidad mineral ósea (DMO) en falanges y carpo con una especificidad del 54% y una exactitud global del 50%, con una correlación de aproximadamente el 50% con la cadera y la columna siendo útiles en la detección de la osteopenia regional.

La densitometría DXA de cadera y columna lumbar tiene la ventaja de medir la DMO en las localizaciones donde preferentemente se quiere prevenir una fractura. La columna anteroposterior (AP) contiene aproximadamente un 66% de hueso trabecular y la cadera un 75% de hueso cortical (Gulam M y col., 2000). Por lo cual con esta técnica, y midiendo ambas localizaciones, se obtienen datos de ambos tipos de hueso siendo un método fiable y preciso con una baja radiación, que ha demostrado su capacidad de predecir fracturas en las localizaciones estudiadas. La técnica de DXA tiene el inconveniente de su alto costo y el de requerir espacio y personal técnico especializado. Es una técnica que puede utilizarse para la medición de la DMO del esqueleto total y subáreas en animales de laboratorio debido a la existencia de un “software” específico para pequeños animales cuya sensibilidad es del 47.5%.

Otros métodos de medición de masa ósea son la tomografía cuantitativa computarizada (QCT), siendo ésta la única técnica tridimensional volumétrica que permite evaluar DMO por unidad de volumen (g/cm^3) respecto de DXA, que evalúa la DMO por unidad de área (g/cm^2) (Pacífico R y col., 1990).

METABOLISMO DEL CALCIO

El Ca es un mineral esencial para sostener el crecimiento y el desarrollo esquelético normal. Un adulto contiene en su organismo aproximadamente 1000g de Ca, de los cuales el 99% se encuentra en el esqueleto asociado al fosfato, formando el cristal de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. El 1% restante está contenido en el LEC y tejidos blandos (Broadus AE, 1999).

Como tejido estructural, el tamaño y la fuerza del esqueleto son proporcionales a la masa corporal que soporta. Como reserva mineral, un porcentaje cercano al 10% del Ca contenido en el esqueleto se encuentra en una forma rápidamente intercambiable con el LEC existiendo mecanismos por los cuales ocurre la liberación del mineral durante períodos de ayuno y la reposición durante los de ingesta. En este sentido, el remodelamiento óseo disminuye durante la alimentación y aumenta durante el ayuno, todo lo cual determina la existencia de mecanismos que regulan la interacción entre la nutrición y el metabolismo óseo. Por lo tanto, es necesaria una adecuada ingesta de Ca (ICa) para producir un balance positivo durante la infancia y la adolescencia, para prevenir desórdenes esqueléticos y para mantener la masa ósea en el adulto.

El Ca cumple dos roles fisiológicos predominantes en el organismo. Respecto de los tejidos duros, la hidroxiapatita le provee integridad estructural al esqueleto; en los tejidos blandos, la concentración de Ca^{++} en el LEC y en el citosol es de importancia crítica para el mantenimiento y control de innumerables procesos bioquímicos celulares y extracelulares (Tabla 2), por lo cual las

concentraciones de Ca^{++} en ambos compartimientos son mantenidas con gran precisión (Weaver CM y col., 2006 y Broadus AE, 1999).

Celulares	
-	Crecimiento y división celular
-	Estabilización de membranas
-	Excitabilidad y permeabilidad de la membrana plasmática
-	Transporte de iones a través de membranas
-	Regulación enzimática
-	Excitación nerviosa
-	Secreción exócrina y endócrina
-	Neurotransmisión
-	Contracción muscular
-	Regulación del metabolismo del adipocito
Extracelulares	
-	Mineralización
-	Cofactor de los factores de coagulación VII, IX y X
-	Reconocimiento y adhesión celular

Tabla 2. - Funciones biológicas del Ca^{++} . Tomado de Tresguerres JAF, 2005.

Ingesta

La I_{Ca} varía con la edad y el estado fisiológico del individuo. Las necesidades son elevadas durante el crecimiento, especialmente durante el pico puberal; posteriormente disminuyen en la edad adulta volviendo a aumentar hacia los cincuenta años de vida, debido a varias causas como la pérdida de los niveles estrogénicos y la caída en la eficiencia del proceso absorbivo. Las recomendaciones diarias de Ca para un individuo adulto normal menor de cincuenta años son de 1000mg/día. El embarazo no eleva los requerimientos de Ca de la mujer adulta o adolescente ya que se ponen en juego mecanismos que aumentan su absorción. Recientemente se han cambiado las recomendaciones de Ca para la lactancia, y en la actualidad no se sugiere aumentar los requerimientos durante esta etapa, a pesar de la cantidad de Ca extra necesaria para la producción láctea (Tabla 3).

EDAD (años)	Ca (mg /día)	TIPO DE RECOMENDACIÓN
0.0 – 6 meses	210	AI (adequate intake)
6.0 – 1 año	260	AI
1 – 3	700	RDA (recommended dietary allowances)
4 – 8	1000	RDA
9 – 13 y 13 – 18	1300	RDA
19 –50	1000	RDA
50 – 70		
mujeres	1200	RDA
hombres	1000	RDA
Embarazo y lactancia:		
< 18	1300	RDA
19 - 50	1000	RDA
> 70	1200	RDA

Tabla 3.- Necesidades de Calcio. US Food & Nutrition Board. Inst. Medicine USA, 2010.

Las necesidades de Ca varían con la especie. En el caso de la rata, el American Institute of Nutrition (AIN) recomienda un aporte de 0,4% de Ca por 100g de dieta en forma de carbonato de Ca (CaCO_3) (Reeves PG y col, 1993) (Tabla 4).

La biodisponibilidad representa la fracción del Ca absorbido que puede ser retenido en el organismo. Sin embargo, no todo el Ca ingerido es absorbido por el organismo y/o utilizado en los distintos procesos fisiológicos, particularmente la mineralización ósea. Por ello, biodisponibilidad y absorción son dos conceptos diferentes, ya que la absorción intestinal no refleja necesariamente la biodisponibilidad de Ca en el organismo, que implica además su uso para la formación ósea y la mineralización.

Cierto tipo de alimentos aumenta la probabilidad de que el Ca absorbido sea incorporado al hueso mientras que otros favorecen la excreción de la mayor parte del mismo. En este sentido se demostró que ciertos aniones, como sulfato y cloruro, ligandos orgánicos (quelantes) y el exceso de proteínas o Na incrementan la pérdida de Ca por orina y, por lo tanto, dificultan su incorporación al hueso. Contrariamente, la retención de Ca es estimulada por el aporte de fosfato, aunque su exceso puede limitar su absorción (Guéguen L y col, 2000). Por lo tanto, la biodisponibilidad

dependerá no sólo de la absorción sino además de la excreción urinaria y de la pérdida fecal del Ca endógeno.

El Ca penetra al organismo a través de la ingesta de los diferentes alimentos que lo contienen. La principal fuente de aporte son los productos lácteos (a excepción de la manteca) aunque también es aportado por otros alimentos como las espinas de pescados pequeños que se ingieren con ellos (sardinas, cornalitos), frutas secas, espinaca, perejil, etc. Sin embargo, en gran parte de estos últimos, el Ca se encuentra formando sales insolubles al pH intestinal, las que disminuyen su absorción. Otros, en cambio, forman compuestos solubles al pH intestinal, manteniéndolo en solución y aumentando su biodisponibilidad.

La forma en que el Ca es aportado por la dieta es de gran importancia, ya que existe interacción del mismo con los diferentes componentes de la misma. El Ca debe estar soluble en el medio alcalino del intestino para poder ser absorbido. La cantidad de Ca dietario absorbido es función de la cantidad de Ca consumido y de la eficiencia del proceso de absorción. Este último proceso está fuertemente regulado por el estado fisiológico (ejemplo: embarazo y lactancia, madurez/envejecimiento) y por la ingesta habitual de Ca (*Fleet, JC, 2006*). Dietas bajas en Ca incrementan la tasa de absorción, al menos en parte, mediante la alteración del sistema endócrino de la vit. D, y la composición y fluidez de las membranas intestinales (*Pérez AV y col., 2008*).

Absorción

La absorción intestinal de Ca^{++} es un proceso importante que se encuentra involucrado en el mantenimiento de la homeostasis del ion (*Pérez AV y col., 2008*). Para que el Ca pueda ser absorbido debe encontrarse en forma iónica, soluble a nivel del lumen intestinal (*Lemann J Jr y col., 1999*).

En condiciones normales, la absorción intestinal de Ca se encuentra alrededor del 20-30% de lo ingerido. Aquel que no fue absorbido junto al Ca endógeno, proveniente de la descamación de las células intestinales y de los jugos digestivos (125mg/d), conforma el Ca excretado por vía fecal.

Existen factores que favorecen o que disminuyen la absorción de Ca (*Tabla 4*). Entre los componentes que la favorecen se encuentran péptidos, y en especial aquellos que provienen de la degradación enzimática de la caseína. Los efectos positivos de los fosfopéptidos de la caseína de la leche sobre la absorción de Ca se han demostrado tanto en estudios “in vitro” como “in vivo” (*Guéguen L y col., 2000*). Los caseínofosfopéptidos poseen la capacidad de unión al Ca^{++} manteniéndolo en solución al pH alcalino del intestino. En cambio, los fosfatos inorgánicos, al igual que los oxalatos, disminuyen la absorción dado que forman sales insolubles al pH intestinal. Los fitatos (constituyentes de la fibra dietaria) poseen cargas negativas en su superficie, por lo cual

adsorben el Ca^{++} sobre la misma evitando su absorción, a la vez que aumentan el tránsito intestinal disminuyendo el tiempo en que el Ca del lumen se encuentra en contacto con las células intestinales evitando, también por esta, vía su absorción. Los ácidos grasos de cadena larga forman jabones insolubles al pH intestinal, por lo que también disminuyen la absorción.

Favorecen	Inhiben
<ul style="list-style-type: none"> - Caseína - Ácido Cítrico - Fosfopéptidos lácteos - Proteínas ricas en lisina 	<ul style="list-style-type: none"> - Oxalatos - Fosfatos inorgánicos - Ácido fítico - Fibra - Ácidos grasos de cadena larga - Fluoruros

Tabla 4. - Factores que modifican la absorción de Ca. Tomado de Weaver CM y col., 2006.

Mecanismos de absorción de Ca

El 90% del Ca se absorbe en el intestino delgado, por mecanismos de transporte epitelial clásicos (Bronner F, 2008 y Pérez AV y col., 2008).

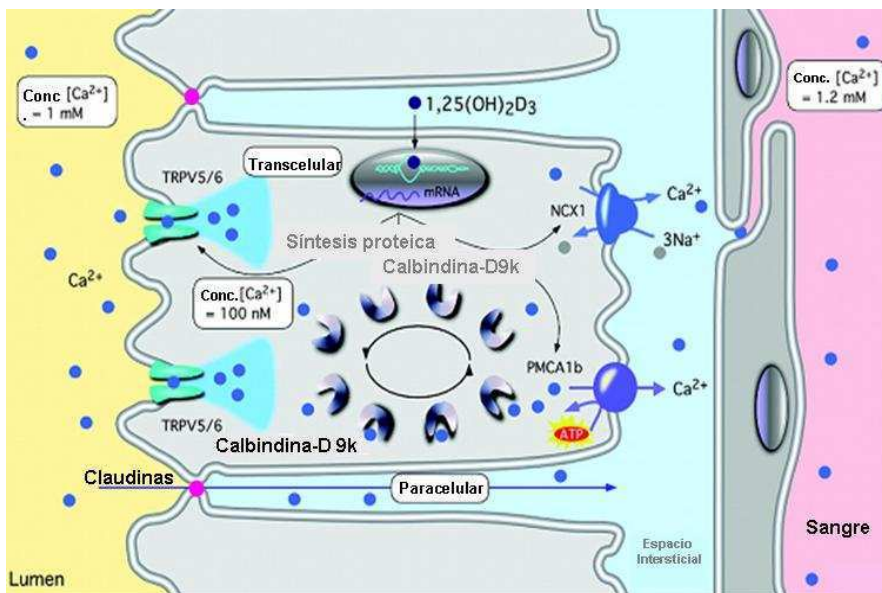


Figura 15.- Mecanismo de absorción intestinal de calcio. Tomado y modificado de Schlatter E, 2006.

La absorción del Ca es la suma de dos procesos de transporte: *absorción transcelular* saturable, regulada fisiológicamente y *absorción paracelular* no saturable, dependiente de la concentración del mineral en el lumen del intestino (Lemann J Jr y col., 1999). El primero predomina a bajas ICa y el segundo cuando las ICa son normales o altas (Bronner F, 2008 y Weaver CM y col., 2006) (Figura 15).

Vía transcelular

Por esta vía el Ca^{++} llega al LEC atravesando la membrana apical del ribete en cepillo de la célula intestinal, el interior celular y la membrana basolateral. Este proceso involucra sistemas de transporte específicos que incluyen: un gradiente eléctrico a través de la mucosa, un pasaje a través del citoplasma mediante la unión del Ca^{++} a una proteína específica denominada *calbindina* (CaBP) y la salida hacia el LEC por acción de una *bomba de Ca dependiente de ATP* presente en la membrana basolateral. Por lo tanto, este proceso es activo, saturable y unidireccional. La CaBP une rápidamente el Ca^{++} citosólico libre para mantener el nivel basal alrededor de 100nM, y así evitar la sobrecarga celular de Ca^{++} (con sus efectos asociados de necrosis y apoptosis).

- **Entrada:** Este mecanismo corresponde al paso limitante del proceso de absorción. Como la concentración de Ca^{++} en el lumen se encuentra en el orden de 10^{-3}M , mientras que la del citosol es del orden de los 10^{-6}M , el mismo ingresa a la célula intestinal a favor del gradiente de concentración (transporte pasivo, sin gasto energético). Este proceso se realiza mediante un mecanismo facilitado por la presencia de *canales iónicos específicos* TRPV5 (anteriormente denominado ECaC1 o CAT2) y TRPV6 (anteriormente denominado ECaC2 o CAT1) en la membrana apical (Walters RF y col., 2006). Ambos canales son miembros homólogos de la superfamilia del receptor potencial transitorio (TRP), que pertenece a la subfamilia vaniloide, (TRPV) diferentes de la subfamilias canónica (TRPC) y melastática (TRPM). El patrón de expresión de estas proteínas es muy variable y esto puede deberse a diferencias entre las distintas especies o a que las expresiones se encuentran por debajo de los niveles de detección. TRPV5 es la principal isoforma en el riñón, en cambio la isoforma TRPV6 es altamente expresada en el intestino. En el humano TRPV5 y TRPV6 se coexpresan en el riñón y el intestino y también en otros órganos como páncreas, próstata, mama, glándulas sudoríparas y salivales. TRPV5 y TRPV6 presentan una homología del 75% y sus principales diferencias se encuentran en los extremos N- y C- terminales. Ambos canales son permeables al Ca, así como a otros cationes divalentes y monovalentes, en ausencia de los divalentes.

La estructura de estos canales es similar a la de otros miembros de la familia TRP: incluyen 6 dominios transmembrana, un corto tramo hidrofóbico entre los segmentos 5 y 6, que formaría parte del poro de Ca y el extremo intracelular N- y el C- terminal extracelular (den Dekker E y col.,

2003). Los segmentos intracelulares contienen sitios regulatorios que participan en el control de la actividad y en el tráfico del canal. Se ha demostrado que los canales tienen una estructura tetramérica y que pueden combinarse entre sí para formar complejos heterotetraméricos con lo cual le brindan a los canales propiedades nuevas. La arquitectura tetramérica de TRPV5/6 implica la formación de un anillo integrado por 4 residuos de ácido aspártico, cargado negativamente, que funciona como un filtro selectivo para el Ca (Hoenderop JG y col, 2003).

La actividad de ambos canales se encuentra regulada hormonalmente a nivel transcripcional por el metabolito activo de la vit. D o *calcitriol* pero también por el contenido de Ca de la dieta; ambos son inactivados por el aumento del Ca⁺⁺ intracelular y constituyen el paso limitante del transporte transepitelial de Ca (Nijenhuis T y col., 2005).

Ratones que presentan disrupción del gen TRPV6 son viables; sin embargo, poseen una disminución del 60% en la absorción intestinal de Ca⁺⁺, una ganancia de peso deficiente, una disminución de la DMO y una disminución en la fertilidad. Por ello se sugiere que el canal TRPV6 no sólo desempeña un papel en los tejidos directamente implicados en la homeostasis del Ca sino también en otros tejidos relacionados al peso corporal y la función gonadal (Bianco SD y col., 2007). La expresión humana del transcrito TRPV6 fue caracterizada en biopsias de intestino, detectándose en el duodeno pero no en el íleon; su expresión duodenal es dependiente de la vit. D en los hombres; contrariamente, en mujeres adultas mayores su expresión se encuentra disminuida al igual que los receptores de vit. D lo que podría explicar, al menos en parte, la menor absorción intestinal de Ca en mujeres de dicho grupo etario (Walters JR y col., 2006).

• **Transporte intracelular:** El aumento del Ca⁺⁺ del líquido intracelular es tóxico para la célula por lo cual, una vez dentro de ella, se une a la CaBP que lo conduce hacia la membrana basolateral. En el duodeno de mamíferos se expresa la CB 9kD (CB9K) mientras que en especies de aves se expresa la CB 28kD (CB28K) (Tolosa de Talamoni N y col, 1998). Ambas son codificadas por distintos genes; no sólo se encargarían de transportar a los iones Ca⁺⁺ a través del citoplasma sino que actuarían como amortiguadores protegiendo, de esta manera, a la célula de los efectos tóxicos durante altas afluencias del ion. El metabolito activo de la Vit. D regula la expresión de CaBP, que al unirse al Ca intracelular incrementa la velocidad de difusión intracelular (Slepchenko BM y col., 2001).

• **Pasaje al LEC:** La concentración de Ca⁺⁺ del LEC se encuentra en el orden de 10⁻³M mientras que en el citosol es de 10⁻⁶M. Por lo tanto, la salida de Ca⁺⁺ hacia el LEC es un proceso activo que requiere gasto de energía. En la membrana basolateral de las células intestinales existen dos sistemas que transportan al Ca⁺⁺ hacia el LEC: la isoforma b de una bomba de intercambio Ca⁺⁺ -

ATPasa (PMCA1) y un intercambiador antiporte $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (NCX1). El proceso se produce fundamentalmente por PMCA1 y en menor medida por NCX1.

Vía paracelular

El epitelio intestinal está constituido por una única capa continua de células las que presentan un espacio muy estrecho entre ellas, permitiendo la difusión de iones y pequeñas moléculas a su través. Las membranas celulares adyacentes entran en íntimo contacto a través de estructuras proteicas que constituyen dominios especializados de membrana (“tight junctions”) localizados en la región apical del enterocito denominados “uniones gap”. Esta estricta unión constituye una barrera al movimiento de moléculas e iones. Son estructuras intracelulares formadas por proteínas sintetizadas por las células adyacentes e incluyen *occludinas*, *claudinas* (principales constituyentes del dominio) y varios miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (*Hoenderop JG y col., 2003*). La ruta paracelular debe ser regulada por el epitelio para mantener la permeabilidad selectiva. El movimiento paracelular de Ca^{++} depende del gradiente electroquímico a través del epitelio, el cual depende a su vez de la solubilidad del Ca^{++} en el intestino delgado distal, del tiempo de permanencia en un segmento intestinal dado y de la tasa de difusión desde la luz al LEC (*Weaver y col., 2006*). Esta vía no saturable prevalece en yeyuno e íleon. Si bien el mecanismo no requiere energía se debe tener en cuenta que las proteínas involucradas en el transporte paracelular, como las claudinas, se encuentran bajo regulación por el metabolito activo de la vit. D (*Bronner F, 2008*).

Excreción

Vía fecal

El Ca excretado por vía fecal está constituido por aquel que no fue absorbido en el intestino junto al que proviene de la descamación de las células intestinales y al que es volcado con los jugos digestivos y no se reabsorbe nuevamente. Estos dos últimos constituyen el Ca fecal endógeno, siendo su valor constante en el adulto, y de aproximadamente 125mg/d.

Eliminación y reabsorción urinaria

En el adulto se ultrafiltran diariamente por el riñón aproximadamente 10g de Ca^{++} , de los cuales se reabsorbe el 98% y sólo una pequeña fracción se elimina por orina dando lugar a una calciuria promedio de 175 mg/d (*Finkelstein JS, 1999*) (*Figura 16*). Esta cantidad es un poco mayor en el hombre (hasta 250mg/día) que en la mujer (hasta 200mg/d) y se ve influenciada por distintos factores. El consumo exagerado de ClNa (sal común) así como una ingesta de proteínas varias veces superiores a los requerimientos nutricionales produce un aumento de la calciuria.

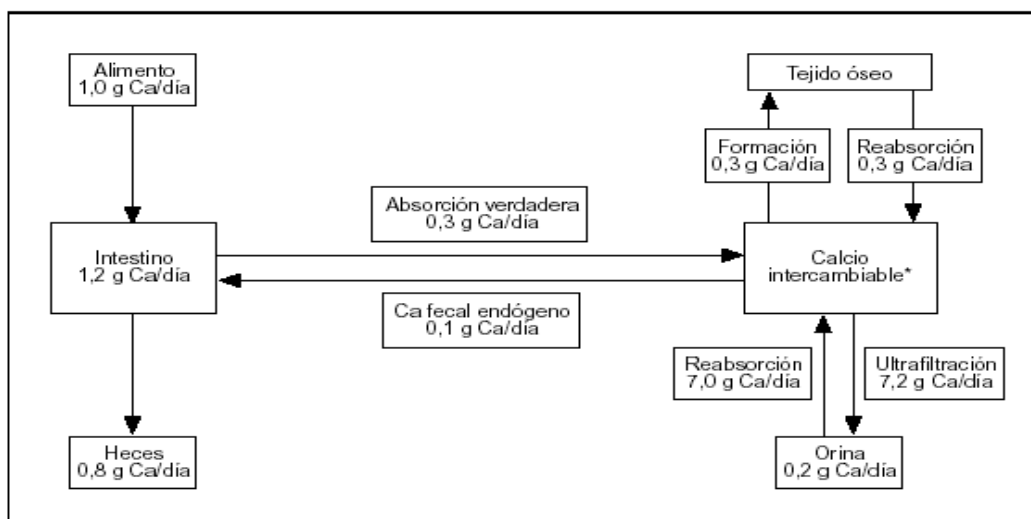


Figura 16.- Esquema general del balance de Ca en un adulto normal.
Figura tomada de internet. <http://www.Doyma.es>.

El mecanismo de reabsorción renal es similar al que se produce en la absorción intestinal. A nivel del túbulo proximal ocurren un proceso transcelular activo (20%), regulado hormonalmente, y un transporte paracelular pasivo (80%). El primero se produce por una serie de procesos que comprenden la entrada a la célula renal por la membrana apical mediante un canal especializado TRPV5, su transporte a la membrana basolateral mediante CaBP y pasaje al LEC por medio de la utilización de las isoformas de la bomba PMCA1b y del intercambiador NCX1 similares a las que se encuentran presentes en la célula intestinal. Las dos terceras partes del Ca filtrado se reabsorben en el túbulo proximal merced a un sistema de transporte pasivo ligado a la reabsorción de Na^+ . En la rama ascendente del asa de Henle se reabsorbe alrededor del 25% del Ca filtrado también en forma pasiva; contrariamente, en el túbulo contorneado distal se reabsorben diariamente unos 1000mg de Ca, regulado hormonalmente por la PTH.

Otras vías de excreción: Existen otras vías de excreción que constituyen las pérdidas diarias insensibles del Ca. Estas son: la piel, el pelo y las uñas. La medición de cada una de estas vías es muy difícil pero la sumatoria de todas permite obtener valores dentro del rango de los 40 a 80mg diarios.

Calcio como componente de los tejidos blandos

Calcio del líquido intracelular

El control de la homeostasis cálcica intracelular es compleja y su regulación es tan estricta como la del LEC (Carafoli E, 2002). Las mitocondrias y los microsomas contienen entre el 90 y 99% del

Ca intracelular, el cual es suficiente como para reponer el Ca citosólico unas quinientas veces. Los niveles de Ca^{++} citoplasmático se mantienen bajos por el funcionamiento de tres sistemas que incluyen canales, bombas e intercambiadores. Estos sistemas son externos ya que se encuentran ubicados en la membrana plasmática o internos localizados en las membranas microsomal y mitocondrial interna; todos ellos requieren de energía para funcionar y comparten una gran afinidad por el Ca^{++} ($K_m \sim 10^{-6}\text{M}$). La importancia de estos sistemas en la regulación del metabolismo del Ca celular varía considerablemente de una célula a otra y depende de la función que la célula desempeñe; por ejemplo: el Ca^{++} constituye el factor de acoplamiento entre la excitación y la contracción del músculo esquelético y cardíaco. Por lo cual, en el músculo estriado, los microsomas y el retículo sarcoplasmático se encuentran ampliamente desarrollados, constituyendo el principal lugar de almacenamiento de Ca^{++} intracelular.

Calcio del líquido extracelular

El pool de Ca del LEC es de aproximadamente 900mg, y se mantiene en equilibrio dinámico con aquel que entra y sale del esqueleto, el que se absorbe y se secreta por el intestino y el que se ultrafiltra y se reabsorbe a nivel del riñón (*Bringurst FD, 1995*) (*Figura 16*).

Normalmente la concentración de Ca del LEC o calcemia varía entre 8.4 y 10.5mg/dl, con un promedio cercano a 9.6mg/dl. La calcemia también puede expresarse en mmol/L (dividiendo por 4) o en mEq/L (dividiendo por 2).

La calcemia es la suma de tres fracciones:

1.- **Ca iónico o libre (Ca^{++}):** Se encuentra en el rango de 10^{-3}M y representa el 50% de la calcemia total circulante. Es la de mayor importancia, por ser la forma en que el catión ejerce sus funciones biológicas y es el único que se encuentra regulado hormonalmente.

2.- **Ca ligado a proteínas:** Corresponde a un 40% de la calcemia total. Se encuentra unido principalmente a albumina (80%) y en menor proporción a globulinas (20%); entre estas últimas, la transferrina presenta una alta afinidad por el Ca.

3.- **Ca unido a aniones inorgánicos:** Representa el 10% de la calcemia total y es aquel que forma complejos con aniones inorgánicos como bicarbonato y fosfato, citrato, lactato, entre otros.

La suma de las fracciones libre y ligada a aniones inorgánicos constituye el Ca ultrafiltrable (60%) y es la forma en que el ion atraviesa las membranas semipermeables.

Cerca del 90% del Ca ligado a proteínas circula unido a la albúmina, por lo cual alteraciones en sus niveles plasmáticos inducirán cambios en los niveles de calcemia total pero no del Ca^{++} . El Ca se une a la albúmina mediante sus grupos carboxílicos, lo que determina que la unión sea altamente dependiente del pH. A pH 7.4 cada g/dl de albúmina puede transportar 0.8mg/dl de Ca; por ello en condiciones de hipoalbuminemia (niveles por debajo del valor de referencia de 4.0g/dl),

la calcemia obtenida será aparente y deberá corregirse sumando 0.8mg/dl de Ca por cada nivel de albúmina por debajo de 4 (ejemplo: calcemia aparente: 7.4mg/dl y albúmina: 2g/dl, calcemia real o corregida: $7.4 + 0.8 \times 2 = 9.0$ mg/dl). En condiciones de acidosis la unión se hace más débil, los protones desplazan al Ca^{++} incrementando la fracción libre; lo opuesto ocurre en condiciones de alcalosis. Sin embargo, los niveles de calcemia total no se modifican, ya que sólo existe una redistribución entre las distintas fracciones que la componen.

Regulación de la homeostasis cálcica

Parathormona (PTH)

La PTH es el principal regulador de la homeostasis del Ca y, junto con la 1.25 dihidroxivitamina D ($1.25(\text{OH})_2\text{D}$) o calcitriol mantiene constante la concentración de Ca del LEC.

En la glándula paratiroidea existe un receptor sensor de Ca (CaSR) que constantemente controla la concentración de Ca^{++} en el líquido intersticial que baña a las células paratiroideas. Los bajos niveles séricos de Ca^{++} son sentidos por el CaSR, que retransmite la señal llevando al incremento en la producción y liberación de PTH (*Weaver CM y col., 2006*).

La PTH preformada se almacena en gránulos secretorios desde donde se liberará, de acuerdo a las demandas metabólicas, o se degradará proteolíticamente dentro de la misma glándula (*Chorev M y col., 1996*). Si los niveles de Ca^{++} no disminuyen marcadamente, la degradación intraglandular puede alcanzar hasta el 50% de la hormona preformada; en cambio, en condiciones de hipocalcemia, la cantidad de hormona degradada dentro de la glándula disminuye notablemente.

El tiempo de vida media de la hormona intacta en circulación es pequeño: dos a tres minutos, ya que rápidamente se degrada en el hígado (60-70%) y en menor proporción en el riñón (20-30%). Las rupturas ocurren en la región comprendida entre los aa 33-43, generando gran variedad de fragmentos de PTH N- y C- terminales. Como la unión de la hormona al receptor se realiza mediante la fracción N-terminal, aquellos fragmentos N-terminales con 34 ó más aa tendrán la misma actividad biológica que la PTH (1-84). Los fragmentos C-terminales serán inactivos, teniendo un tiempo de vida media de cinco a diez veces superior al de la hormona entera, debido a que son metabolizados casi exclusivamente por riñón donde se acumularán en condiciones de insuficiencia renal (*D'Amour P, 2006*).

La dinámica de secreción de PTH en función de los niveles de Ca^{++} se encuentra sumamente estudiada y es de naturaleza sigmoidea (*Figura 17*).

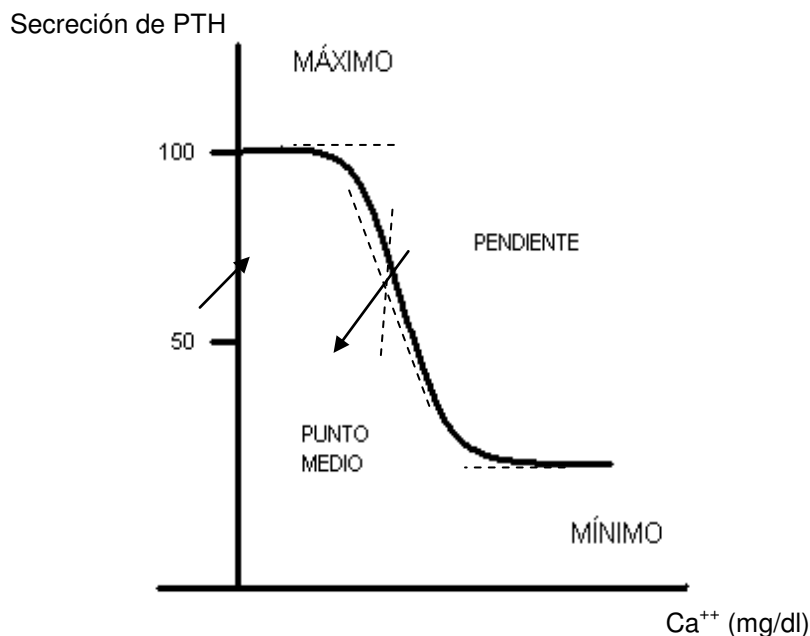


Figura 17.- Relación normal entre la secreción de PTH por las células paratiroideas y la concentración extracelular de Ca^{++} . Tomado y modificado de Nisselson RA y col., 2008.

Dentro de los niveles normales de Ca^{++} (4.4-5.2mg/dl ó 1.1-1.6mM) pequeñas fluctuaciones en su concentración darán lugar a grandes variaciones minuto a minuto en los niveles de secreción de PTH. A medida que los niveles de Ca aumentan los de PTH disminuyen hasta que se alcanza un nivel de secreción mínimo o basal; contrariamente, a medida que los niveles de Ca^{++} disminuyen se produce un aumento en la secreción de PTH hasta que se alcanza la velocidad de secreción máxima. El punto medio de la curva o “set point” corresponde a la concentración de Ca^{++} que inhibe, a la mitad, la secreción de PTH (Felsenfeld A y col., 1993).

Acción homeostática de PTH

La PTH mantiene la homeostasis del Ca a través de sus acciones directas sobre sus principales órganos blanco, hueso y riñón, y a través de sus acciones indirectas sobre el tracto gastrointestinal. Por ello, una vez liberada, la PTH tiene varias funciones importantes. Rápidamente, actuando sobre sus órganos blanco, promueve la resorción ósea estimulando en forma indirecta la actividad osteoclástica y, al mismo tiempo, favorece la reabsorción renal de Ca e inhibe la reabsorción de fosfato en el túbulo proximal. La PTH desencadena también un mecanismo hipercalcemiante lento porque requiere de la síntesis proteica; es así que, a nivel de las células renales, estimula la actividad de la enzima *1 α 25hidroxilasa* encargada de sintetizar el calcitriol, segunda hormona calciotrópica.

El incremento en la producción de $1.25(\text{OH})_2\text{D}$ estimula la resorción ósea, la reabsorción renal de Ca en el túbulo contorneado distal y la absorción de Ca en el intestino delgado proximal (*Weaver CM y col., 2006*).

La PTH regula la homeostasis mineral mediante la activación de un receptor específico ubicado en los tejidos efectores (*Brown EM, 1994*). Respecto del tejido óseo, se debe tener en cuenta que los osteoclastos no poseen receptores para PTH, por lo cual la acción de la hormona sobre la actividad resorptiva es de naturaleza indirecta; los osteoblastos, en cambio, sí poseen receptores para la hormona. Por ende, para que se degrade hueso, es necesaria la interconexión entre osteoblastos y osteoclastos. La unión de la hormona al receptor osteoblástico desencadena la liberación de diversos factores al microambiente óseo como interleuquinas 1 (IL-1) y 6 (IL-6) y el RANKL, que aumentan el reclutamiento, proliferación y actividad de los osteoclastos (*Mundy GR, 1996*). Estudios histológicos y fisiológicos han mostrado que la PTH provoca la degradación de la hidroxiapatita en dos zonas específicas del hueso: en el interior del propio hueso, en la zona vecina a los osteocitos, y a lo largo de su superficie, en la vecindad de los osteoclastos (*González M y col., 2008*). Esto se debe a que los osteocitos apoptóticos liberan RANKL.

A nivel del nefrón distal, la PTH modula rápidamente la excreción de Ca aumentando su reabsorción tubular activa. Al mismo tiempo debe eliminar el exceso de P, que junto al Ca se liberó del hueso al LEC. En este sentido, la mayor parte de la carga filtrada de P se reabsorbe en el túbulo proximal donde la PTH controla su excreción inhibiendo su reabsorción tubular.

A diferencia del efecto catabólico que ocurre en este caso de secreción continua, la administración exógena en forma "intermitente" promueve efectos anabólicos directos. Este efecto estaría mediado, entre otros, por el IGF-1 (*Finkelstein JS, 1996*).

Péptido PTH similar (PTHrp)

Existe un péptido similar a la PTH denominado PTHrp, que originalmente fue descubierto por su acción en condiciones patológicas al ser producida por ciertas células tumorales; es el responsable de la hipercalcemia humoral de la malignidad. Sin embargo, en condiciones normales actúa durante el proceso de crecimiento, regulando tanto el desarrollo como la función de varios tejidos (*Goltzman D, 2010*). Es una polihormona ya que por modificaciones postraduccionales genera múltiples péptidos biológicamente activos. La secuencia aminoacídica es similar a la PTH sólo en la porción N- terminal; fuera de dicha región, la secuencia entre ambas hormonas tiene muy poco en común. Mientras la PTH posee 84 aa, la PTHrp es más larga, con tres isoformas de 139, 141 y 173 aa, las cuales son idénticas hasta el aa 139 (*Strewler G y col., 1996*). De los 13 aa que conforman la fracción N- terminal que se une al receptor, 8 son idénticos a los de PTH dando

lugar a una homologación del 62%. Este hecho le permite unirse y activar al receptor PTHR1 de la PTH desencadenando el mismo tipo de respuesta sobre la homeostasis del fosfocálcica: aumento de la calcemia, disminución de la fosfatemia y activación de la 1 α 25hidroxilasa renal (*Chorev M y col., 1996*).

La PTHrp presenta importantes funciones fisiológicas durante el desarrollo fetal, el embarazo y la lactancia. Los niveles circulantes de PTHrp son extremadamente bajos en el adulto; en cambio, su presencia es indispensable para el desarrollo del feto, actuando en forma auto-parácrina. Dicho péptido estimula el desarrollo del cartílago de crecimiento activando los condrocitos; también participa en la erupción dentaria, desarrollo del folículo piloso y de otros tejidos como músculo esquelético y cardíaco, sección tubular distal del riñón, cerebro y placenta. En el embarazo es producida por la placenta de tal manera que, a diferencia de lo que ocurre en la mujer en edad fértil donde sus niveles son indetectables, el suero de la mujer embarazada contiene importantes niveles de PTHrp. Esta hormona estimula el desarrollo mamario y regula el flujo de Ca⁺⁺ a través de la placenta en contra de gradiente de concentración, manteniendo los niveles de Ca más elevados en el feto que en la madre. Durante la lactancia, la PTHrp es producida por las células epiteliales alveolares y, bajo el control de la prolactina y la succión mamaria, es secretada en altísimas concentraciones en la leche materna (*Strewler G y col, 1996*).

Vitamina D

La vit. D es esencial para la formación ósea y para el mantenimiento de la homeostasis del Ca.

Químicamente pertenece al grupo de moléculas esteroideas y, de acuerdo a su origen, existen dos formas de la misma: el ergocalciferol o D2, sintetizada por las plantas y levaduras, y colecalciferol o D3, de origen animal.

Si bien la vit. D puede obtenerse a través de la dieta por los pocos alimentos que la contienen o por su agregado en forma de fortificación, en el humano su principal aporte (80-90%) es a través de la síntesis de D3 en piel por acción de la radiación ultravioleta B (UV-B) (longitud de onda entre 290-310nm) sobre un precursor inactivo denominado 7-dehidrocolesterol (*Vanga SR y col., 2010*).

El proceso de síntesis se completa en un lapso de 36 a 48hs. Comienza con la transformación del precursor en previt. D3 por la apertura del anillo β a nivel de la epidermis. A la temperatura corporal, la previt. D3 se convierte espontáneamente en D3 que, por ser liposoluble, rápidamente se absorbe, pasa a circulación y se transporta a hígado donde se metaboliza a 25 hidroxivitamina D (25OHD), principal metabolito circulante de la vit. D (*Figura 18*).

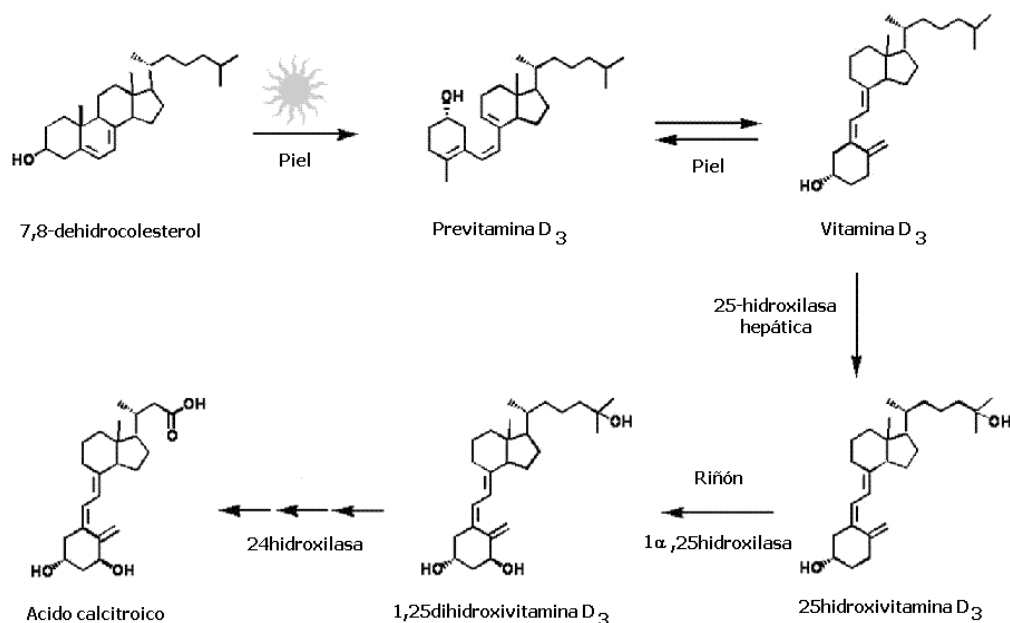


Figura 18.- Fotoconversión del precursor en distintos metabolitos de la vitamina D. Tomado de Dusso AS y col., 2005.

La hidroxilación hepática se produce en la posición 25, dando origen a la 25OHD. Este compuesto es considerado en la actualidad como una prohormona. La hidroxilación hepática es llevada a cabo por una enzima mitocondrial dependiente del citocromo P450c27 (CYP27A1), conocida vulgarmente como *25hidroxilasa hepática*. Como la actividad catalítica de dicha enzima no se encuentra regulada, los niveles circulantes de 25OHD dependerán principalmente de la ingesta de vit. D y del nivel de exposición solar, por lo cual se la considera un indicador del estado nutricional de dicha vitamina (*Holick MF y col., 1978*). La 25hidroxilasa hepática actúa con igual eficiencia en la hidroxilación de la D2 y la D3 (*Strushkevich N y col., 2008*).

La vida media de la 25OHD es de aproximadamente tres semanas y sus niveles circulantes determinarán los distintos estados fisiológicos de la vit. D: suficiencia, insuficiencia, déficit o toxicidad (*Robinson CJ y col., 2010*). En la actualidad, para diferenciar dichos estadios en forma clínica, se utiliza la clasificación de Mc Kenna, basada en estudios que demuestran la existencia de una relación inversa entre los niveles de PTH y 25OHD (*McKenna MJ, 1992*). Se consideran *niveles adecuados u óptimos* a aquellos valores iguales o superiores a 32ng/ml; cuando los niveles de 25OHD son inferiores a dicha cifra, los niveles PTH aumentan aún dentro del rango de referencia. Eso determina la existencia de hipovitaminosis D cuando los niveles de 25OHD varían entre 32 y 20ng/ml. Cuando los niveles disminuyen por debajo de 20ng/ml comienzan a observarse signos de hiperparatiroidismo secundario (HPT^{2º}), por lo cual se considera que el individuo presenta *insuficiencia* de vit. D cuando los niveles se encuentran entre < 20 y 10g/ml.

Por debajo de 10ng/ml existe *deficiencia* de vit. D, donde se evidencian alteraciones óseas (Tabla 5). Los niveles de 25HOD se pueden expresar en nmol/L, multiplicando ng/ml por un factor de 2.5.

NIVELES	25OHD (ng/ml)
DESEABLE u ÓPTIMO	> 30-32
HIPOVITAMINOSIS	21 a 29
INSUFICIENCIA	10 a 20
DEFICIENCIA	< 10

Tabla 5.- Niveles de 25OHD y estado fisiológico respecto de la vitamina D.
Tomado de McKenna MJ y col., 1998.

La 25OHD es metabolizada a nivel del túbulo proximal del riñón donde se produce una segunda hidroxilación en la posición 1 del anillo A por acción de otra enzima, dependiente de citocromo P450, conocida como 1 α 25hidroxilasa (CYP27B1). Mediante esta transformación se genera la verdadera hormona: 1.25(OH)₂D o calcitriol (Figura 18). La actividad de la 1 α 25hidroxilasa renal está altamente regulada. Dicha regulación se ejerce principalmente a nivel genómico por la PTH. El calcitriol también regula su propia síntesis ejerciendo un efecto de feed-back negativo sobre la síntesis y liberación de PTH por las glándulas paratiroideas y, al mismo tiempo, inhibiendo la actividad de la 1 α 25hidroxilasa y estimulando la expresión de la 24,25hidroxilasa renal.

Recientemente se ha determinado que una proteína llamada factor fosfatúrico 23 (FGF-23) también regula la actividad de la 1 α 25hidroxilasa renal. La deficiencia o ausencia del FGF-23 provoca hiperfosfatemia y marcado aumento de los niveles de 1.25(OH)₂D; contrariamente, su aumento induce hipofosfatemia por aumento de la fosfaturia y reducción en los niveles de calcitriol debido a la disminución del mRNA de la enzima. Otros factores también regulan la expresión de la 1 α .25hidroxilasa; a modo de ejemplo, la hipofosfatemia estimula a la enzima independientemente de los niveles de PTH y los estrógenos favorecen también la actividad de la enzima (Negri AL y col., 2005).

La síntesis de calcitriol constituye el paso limitante de la bioactivación de la vit. D y está relacionada directamente a las necesidades orgánicas de Ca y P del organismo. A diferencia de la 25OHD, este metabolito activo posee un tiempo de vida media de unos pocos minutos.

El transporte de la vit. D y sus metabolitos es realizado por una proteína sérica específica perteneciente a las α 2-globulinas denominada *proteína transportadora de vit. D* (DBP o "Vitamin D-Binding Protein"). La DBP es la responsable no sólo del transporte sino que esta unión

constituye una forma de reserva ya que, por simple disociación, se dispondrá de compuestos listos para actuar (Dusso AS, 2005).

Como otras hormonas esteroideas, el calcitriol ejerce sus funciones biológicas mediante acciones genómicas y no genómicas. Ambas respuestas dependen de su unión a un receptor específico (“Vitamin D Receptor” o VDR). La capacidad de unión de los metabolitos al VDR disminuye en el siguiente orden: calcitriol > 25OHD > vit. D. Como dicho receptor se encuentra dentro de la célula, principal pero no exclusivamente en el núcleo, los metabolitos de la vit. D deberán internalizarse mediante un proceso en el cual participa un receptor endocítico denominado megalina.

La principal acción endócrina del calcitriol es actuar sobre intestino favoreciendo la absorción de Ca y P, los que se absorben por mecanismos diferentes e independientes uno del otro. La 1.25(OH)₂D estimula el transporte epitelial de Ca y P y, por lo tanto, la eficiencia del intestino delgado y del riñón para ejercer la absorción y reabsorción de dichos nutrientes, respectivamente.

A nivel del intestino delgado, el calcitriol ejerce su acción sobre la absorción de Ca a través de la acción sobre distintos componentes celulares (Figura 19).

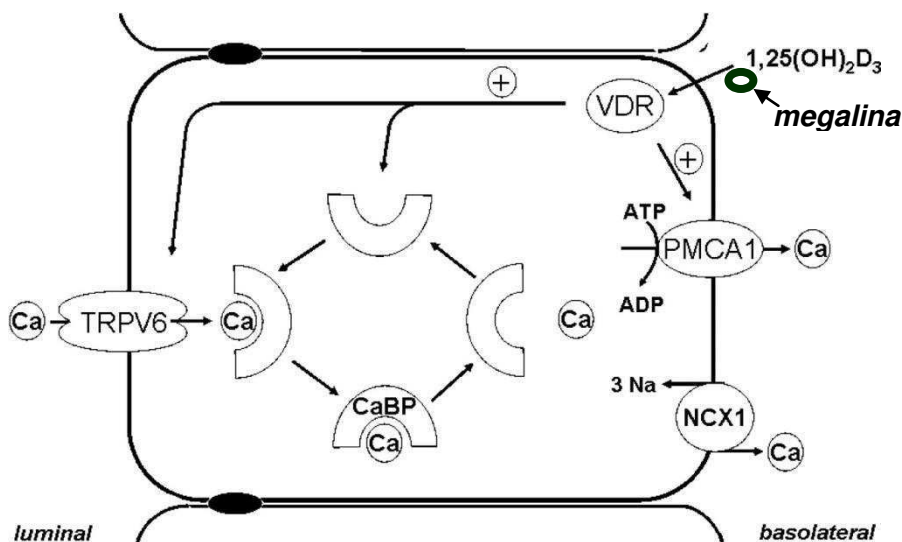


Figura 19.- Regulación del transporte epitelial transcelular de Ca por 1.25(OH)₂D.
Modificado de Hoenderop JG y col. Am J Physiol Renal Physiol 278: F352-60, 2000.

- 1) Aumento en la expresión de los canales de Ca TRPV6 o TRPV5 de la zona apical, con lo cual se favorece la entrada de Ca a la célula.
- 2) Inducción de la síntesis de CaBP, facilitando el movimiento de Ca a través de la célula hacia la membrana basal.

3) Inducción de la bomba de Ca^{++} PMCA1, presente en la membrana plasmática basolateral.

Asimismo, el calcitriol ejerce un efecto de “feed-back” negativo sobre la función paratiroidea, con lo cual controla el remodelamiento óseo y la reabsorción renal de Ca y P. El calcitriol favorece la degradación de hueso en forma indirecta, aumentando la actividad osteoclástica mediante un mecanismo similar al de la PTH.

La vit. D también ejerce efectos anabólicos a nivel del tejido óseo, ya que es esencial para la correcta mineralización del esqueleto. Su deficiencia induce raquitismo en los niños y osteomalacia en los adultos. En forma directa, el calcitriol mantiene las concentraciones de Ca y P dentro de niveles de sobresaturación aportando los componentes minerales necesarios para la producción del cristal óseo; al mismo tiempo estimula la síntesis osteoblástica de BGP, indispensable para el proceso de mineralización.

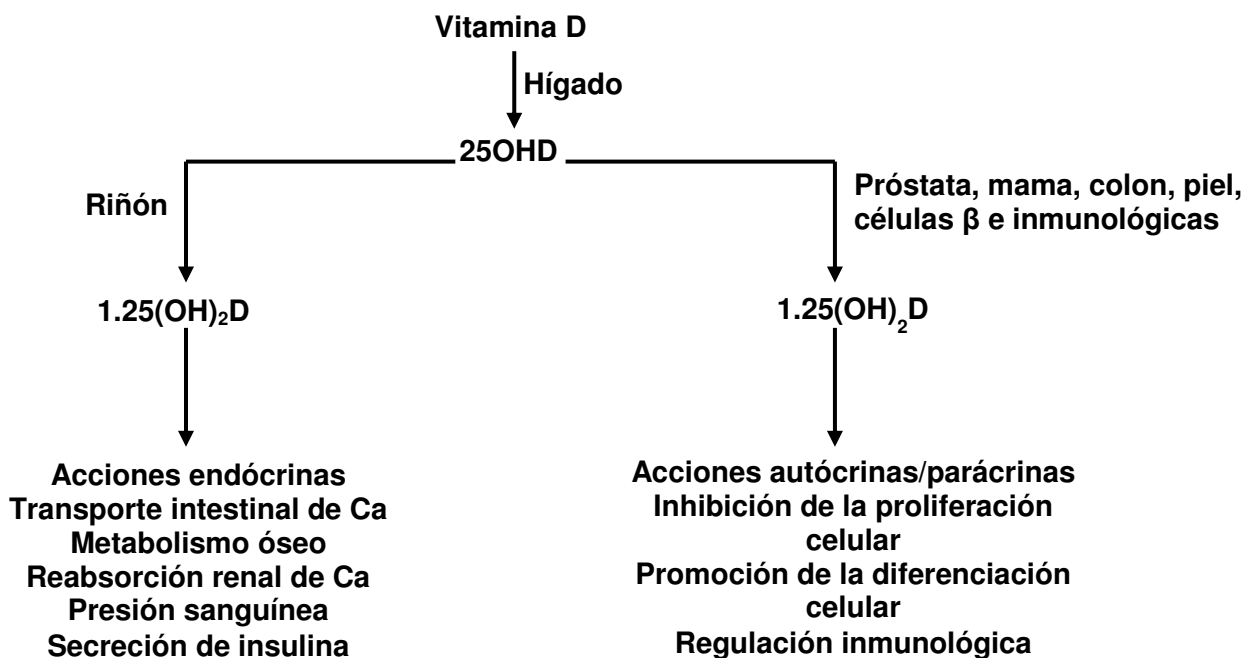


Figura 20.- Funciones endocrinas y auto-parácrinas de la vitamina D.
Tomado de Dusso AS, 2005.

Independientemente de su rol en el metabolismo fosfocálcico, la $1.25(\text{OH})_2\text{D}$ juega un rol importante en diversos procesos fisiológicos. Si bien la producción endócrina de calcitriol se produce a nivel renal, casi todos los tejidos contienen 1α 25hidroxilasas las cuales transforman a la 25OHD en calcitriol para ser utilizado en forma auto-parácrina. A diferencia de la 1α 25hidroxilasa, renal aquellas de origen extrarrenal no responden al estímulo de PTH (DeLuca HF, 2004). La

producción extrarrenal de calcitriol juega un rol importante en la diferenciación y proliferación celular y en la función inmunitaria (*Figura 20*).

Otras hormonas que afectan la homeostasis cálcica

Hormona de crecimiento (GH) y factores de crecimiento insulínicos (IGFs)

La GH no interviene directamente sobre procesos fisiológicos, sino indirectamente mediante la liberación hepática de IGF-1. Este IGF-1 sistémico, junto a aquel de origen local producido por los osteoblastos, es un potente estimulador del crecimiento óseo longitudinal (*Nilsson O y col., 2005*). La desnutrición proteica es otro factor importante en la liberación de IGF-1, y por ende en la alteración del eje GH-IGF-1.

El rol del eje GH-IGF-1 en el crecimiento óseo ha sido evaluado por manipulación genética de sus componentes en ratones. En este sentido, ratones carentes del gen de GH exhiben peso normal al nacimiento pero presentan una reducción en el crecimiento postnatal. Los ratones carentes de los genes *igf-1* o *igf-2* muestran retardo intrauterino en el crecimiento con pesos al nacimiento de aproximadamente el 60% de las camadas "wild type". Ratones deficientes en el receptor de IGF-1 tienen una reducción más severa del peso al nacimiento y mueren al poco tiempo de nacer (*Nilsson O y col., 2005*).

Calcitonina (CT)

Es un polipéptido de 32 aá, producto del gen *CALC1*. La CT es sintetizada en las células parafoliculares de la glándula tiroides como un precursor más largo denominado preproCT; posteriormente, por acción enzimática dentro de la célula, se transforma en proCT y, finalmente, en CT. La secuencia de aá varía en mayor o menor medida entre las distintas especies; por ejemplo entre la humana y la de rata sólo existe una diferencia de 2 aá (*Deftos LJ, 2003*).

La CT ejerce su acción sobre hueso uniéndose a receptores específicos de membrana que se expresan en los osteoclastos, por lo cual dicha célula, en su etapa final de la diferenciación, es rica en receptores para CT (*Riancho Moral JA y col., 2004*). Sobre las células resorptivas la CT genera la pérdida del ribete en cepillo del osteoclasto maduro y, por ende, la inhibición de su actividad en la resorción ósea.

La CT ejerce un efecto mínimo en la homeostasis normal del Ca en el humano. Se considera que es una hormona residual que ha quedado de los tiempos en que la vida se desarrollaba en los mares. Esta hormona regula el balance hídrico; de allí su importancia en peces que, como el salmón, pasan del agua salada a la dulce. En dichos animales la disponibilidad acuosa es infinita. En animales terrestres, el desarrollo de los riñones para el control acuoso limitó la importancia de

la CT. En el humano, su acción se limita a inhibir rápidamente la actividad osteoclástica cuando es suministrada en dosis farmacológicas. Al mismo tiempo, por tratarse de un poderoso analgésico, calma el dolor. Sin embargo, el osteoclasto presenta el denominado fenómeno de “escape” a la CT por lo cual, al cabo de un tiempo, deja de ejercer efecto (*Adami S, 2008*).

Hormonas que controlan el proceso digestivo

El hueso es un tejido que se encuentra en constante remodelamiento, por lo cual requiere de una ingesta de nutrientes satisfactoria para mantener la masa ósea. Varios estudios demostraron que existe una asociación entre la ingesta de alimentos y el nivel de remodelamiento óseo (*Talbott SM y col., 1998; Zeni SN y col., 2003*); ello determina la existencia de mecanismos regulatorios adicionales al eje PTH/calcitriol, entre los que se encontrarían hormonas producidas por el tracto gastrointestinal. Estudios recientes sugieren que las hormonas gastro-entero-pancreáticas que se liberan en respuesta a la ingesta de nutrientes regulan postprandialmente la homeostasis ósea. En este sentido, se observó que el cambio en el remodelamiento óseo debido a una carga oral de glucosa es mayor que la respuesta a glucosa intravenosa, sugiriendo un rol de las hormonas incretinas polipéptido inhibidor gástrico y péptido glucagon-símil 1 (GIP y GLP1, respectivamente). Asimismo, el tratamiento con octreotide, análogo de la somatostatina que inhibe la secreción basal y postprandial de muchas hormonas pancreáticas, evita la supresión del remodelamiento inducido por la ingesta de nutrientes. Por ello las hormonas gástricas, pancreáticas o entéricas presentarían un rol potencial en la supresión aguda del remodelamiento óseo e incluirían, además de las mencionadas, a insulina, glucagon, gastrina, péptido glucagon-símil 2 (GLP2), GH y ghrelina. Los efectos no estarían controlados por cambios en los niveles de PTH o Ca^{++} , determinando la posibilidad de nuevos mecanismos endócrinos que mediarían una interacción “éntero-ósea” entre el tracto gastrointerstinal y el hueso (*Clowes JA y col., 2005*).

Insulina

El esqueleto es un tejido altamente metabólico, lo cual requiere de la utilización global de energía a través de sus interacciones hormonales con otros tejidos del organismo (*Fukumoto S y col., 2009*); la insulina, hormona proteica secretada por las células β del páncreas, regula el metabolismo energético (*Figura 21*).

Hace una década se observó la asociación entre tejido graso, cerebro y masa ósea, lo cual ha sido estudiado en dos direcciones complementarias. La primera explora cómo la leptina, la serotonina y otras moléculas regulan la masa ósea; la otra se enfoca al rol endócrino del hueso en la regulación del metabolismo energético. El hecho de que el metabolismo energético afecte la masa ósea a través del osteoblasto llevó a la hipótesis de que esta célula actuaría como un órgano de secreción endócrina liberando una molécula que controla el metabolismo energético.

Dicha molécula es la BGP, la cual postraduccionalmente puede carboxilarse dando una molécula con alta afinidad por el cristal de hidroxiapatita. Sin embargo, cuando está decarboxilada pierde dicha actividad, siendo esta BGP no carboxilada (BGPnc) la que actúa como hormona controlando al metabolismo energético. Entre las funciones de la BGPnc se encuentran las de alterar la proliferación de las células β del páncreas, la secreción y sensibilidad a la insulina y el gasto energético (Lee NK y col., 2007 y Ferron M y col., 2008) (Figura 21).

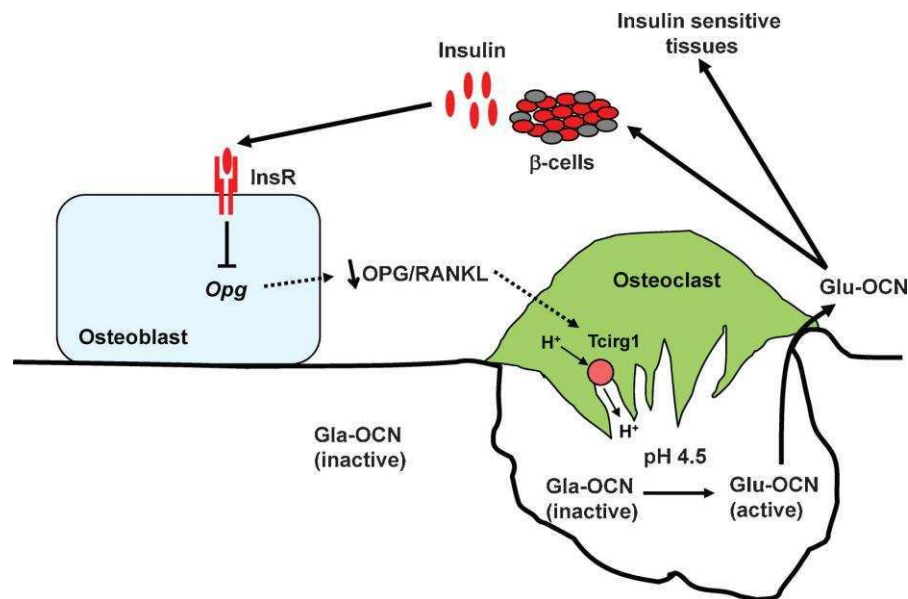


Figura 21.- Insulina, resorción ósea y osteocalcina. Tomado de Clemens TL y col., 2011.

El osteoblasto expresa pocos genes específicos: entre ellos el *Esp*, que codifica para una proteína intracelular denominada tirosina fosfatasa (OST-PTP). Dicha proteína participa en el metabolismo de la glucosa e impide que la proteína extracelular BGP pueda cumplir con sus funciones específicas en el proceso de mineralización. Tal efecto es inesperado, ya que dicha proteína no interviene directamente en la carboxilación de la BGP (Hinoi E y col., 2008; Lee NK y col., 2007 y Fulzele K y col., 2010). La insulina es la proteína que regula la expresión y actividad de la BGP mediante su unión al receptor específico. El receptor de insulina, presente en el osteoblasto, es del tipo tirosina quinasa (RTK) por lo cual su actividad está negativamente regulada por la tirosina fosfatasa. Los osteoblastos expresan una enorme cantidad de receptores de insulina a los cuales puede unirse la OST-PTP, regulando negativamente la señal de insulina en dichas células. Mientras los ratones *Esp*^{-/-} presentan una ganancia en la actividad insulínica, los ratones que carecen del receptor insulínico exclusivamente en osteoblastos (*InsR*^{-/-ob}), al ser

sometidos a una dieta normal, desarrollan intolerancia a la glucosa. Este hecho demostraría que la presencia de los receptores insulínicos en el tejido óseo es indispensable para el control de la homeostasis de la glucosa en todo el organismo y que el hueso actuaría sobre el control del metabolismo energético. Los ratones $InsR^{-/ob}$ presentan reducción en la cantidad de hueso trabecular por disminución en el número y actividad de osteoblastos pero también presentan disminución en la actividad de los osteoclastos. La insulina ejerce efectos anabólicos en los osteoblastos “wild type” estimulando su proliferación y diferenciación, suprimiendo a un inhibidor del Runx2 denominado Twist2; sin embargo, también estimula la diferenciación osteoclástica inhibiendo por un lado la liberación de OPG, inhibidor del RANKL, y por el otro activando a la CATK.

Es conocido que ciertas proteínas pueden decarboxilarse mediante la disminución en el pH del medio en el cual se encuentran. Por lo cual la acidez existente en la laguna de resorción osteoclástica sería suficiente para decarboxilar y activar a la BGP. En este sentido la insulina, a través de sus receptores osteoblásticos, activa la resorción ósea y en dicho proceso se decarboxila la BGP que, a su vez, favorece la expresión y sensibilidad a la insulina.

En humanos, los pacientes con osteopetrosis que presentan un defecto en la resorción desarrollan hipoinsulinemia y baja actividad de BGPnc (*Figura 21*).

Amilina

La amilina es un péptido de 37 aá cosecretado junto a la insulina por las células β del páncreas; sus niveles aumentan luego de la ingesta. A nivel óseo estimula el número de osteoblastos e inhibe la diferenciación osteoclástica “in vitro”. “In vivo”, dosis farmacológicas de amilina tienen un efecto anabólico sobre el hueso.

Ratones “knock-out” para amilina presentan una disminución en la masa ósea, efecto que estaría mediado por una inhibición de la osteoclastogénesis, sin efecto aparente sobre la diferenciación o la función osteoblástica (*Clowes JA y col., 2005*).

Leptina

La leptina, proteína secretada principalmente pero no exclusivamente por el tejido adiposo, regula central y periféricamente el metabolismo óseo. Se han identificado receptores para leptina en osteoblastos. Además de su participación en la regulación del metabolismo energético, la leptina es uno de los principales determinantes del remodelamiento óseo. Mediante un aumento en la actividad simpática hipotalámica desencadena una respuesta sobre receptores β 2-adrenérgicos presentes en los osteoblastos, por lo cual por un lado inhibe la formación ósea pero por el otro incrementa la actividad osteoclástica induciendo una mayor liberación del factor RANKL

por los progenitores osteoblásticos. Esta acción simpática requiere la fosforilación por parte de la protein quinasa A del factor transcripcional ATF4 (*Elefteriou F y col., 2005; Elefteriou F y col., 2004*). Esta acción sería independiente de la actividad de la leptina sobre el metabolismo energético.

La leptina también actúa sobre la resorción ósea mediante otro mecanismo que involucra la modulación de un neuropéptido hipotalámico denominado transcripto regulado por cocaína-anfetamina (CART). El RANKL es regulado negativamente por acción de CART sobre los osteoblastos (*Singh MK y col., 2008*). Por ello la leptina controla los factores implicados en el remodelamiento mediante la acción de vías neurales.

Los condrocitos y osteoblastos presentan receptores extraneurales para leptina, lo que permite la acción directa de la hormona sobre ellos incrementando la proliferación osteoteoblástica e inhibiendo la osteoclástica, y en consecuencia ejerciendo efectos opuestos a su acción central (*Cornish J y col., 2002; Holloway WR y col., 2002*).

Adiponectina

Esta hormona se expresa amplia y específicamente en los adipocitos diferenciados con mayor expresión en el tejido graso subcutáneo que en el visceral. Estudios recientes indican que la adiponectina está directamente involucrada en la regulación de la masa ósea mediante acciones tanto positivas como negativas. En este sentido, se ha observado que la adiponectina promueve “in vitro” la proliferación osteoblástica, pero que además ejerce funciones antirresortivas (*Shetty S y col., 2009*).

Los osteoblastos presentan receptores para adiponectina, mecanismo por el cual la hormona estimularía la proliferación y diferenciación de osteoblastos y la mineralización (*Singla P y col., 2010*). La adiponectina también inhibe la actividad resortiva de los osteoclastos “in vitro”. Si bien en algunos trabajos se encontró que el tratamiento de ratones con adiponectina aumenta la masa ósea trabecular, disminuye el número de osteoclastos y los niveles plasmáticos de marcadores de resorción, otros estudios no se observaron dicha interrelación (*Silha JV y col., 2006*).

La adiponectina sería un importante factor en la ecuación hueso-sensibilidad a insulina vs adiposidad. Estudios recientes han demostrado que la manipulación genética de factores osteoblásticos lleva a alteraciones metabólicas que dependerían de adiponectina (*Shetty S y col., 2009*). Es el único factor adipocitario que incrementa la sensibilidad a la insulina, con lo cual existe una relación fuertemente negativa entre niveles de adiponectina y resistencia a la insulina. Ratones deficientes en adiponectina, al ser sometidos a una dieta rica en hidratos de carbono, desarrollan intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina con aumento de ácidos grasos

libres (AGL) en forma prematura. Dicho perfil metabólico desfavorable ocurre sin diferencias significativas en el peso corporal o en la ingesta de alimentos.

Los ratones $Esp^{-/-}$, que presentan elevados niveles de BGPnc comparados con los “wild type”, también presentan elevados niveles de adiponectina; contrariamente, ratones carentes del gen de BGP ($OCnc^{-/-}$) presentan un fenotipo opuesto al $Esp^{-/-}$. La $OCnc$ podría inducir la expresión de adiponectina en los adipocitos.

Ghrelina

Es una hormona peptídica de 28 aa secretada por el estómago, que posee una potente actividad estimulante del apetito. Se ha sugerido que la actividad orexígena de ghrelina estaría localizada primariamente en neuronas hipotalámicas del núcleo arcuato (*Cowley MA y col., 2004* y *Costa JL y col., 2011*); posiblemente el área postrema, un centro troncal caudal del hipotálamo que carece de barrera hematoencefálica, sería el sitio de actividad de ghrelina donde estimula el apetito y regula la secreción pancreática de proteínas (*Gilg S y col., 2006*).

La ghrelina tiene un rol en la regulación del balance energético a largo plazo, ya que su administración crónica provoca ganancia de peso reduciendo la utilización de grasa como fuente de energía (*Tschop M y col., 2000*). Los niveles circulantes de ghrelina aumentan en el estado de ayuno y en la anticipación de comida y se atenúan en la alimentación y en presencia de nutrientes en el estómago. También participa en la digestión y en la estimulación de la motilidad gástrica, la secreción gástrica y la secreción pancreática (*Parul S y col., 2010*).

En diferentes estudios se ha determinado la presencia de receptores para la hormona en osteoblastos, con efectos variables sobre su proliferación y supervivencia (*Kim SW y col., 2005* y *Maccarinelli G y col., 2005*). Aunque no se ha estudiado el efecto de la ghrelina sobre osteoclastos se cree que, al ser un secretagogo de GH, tendría efectos indirectos sobre los mismos similares a los de la misma, aumentando su formación y su función (*Costa JL y col., 2011*).

El hecho de que la ghrelina estimule la actividad de osteoclastos maduros sugiere una posible relación directa entre niveles circulantes aumentados de la hormona y estimulación de resorción ósea inducida por ayuno. La ghrelina no parece ser un requerimiento primario para la formación ósea y el remodelamiento. Ratones carentes de la hormona o sus receptores no muestran cambios esqueléticos.

Hormonas entéricas

Los osteoblastos humanos poseen receptores para GLP2, lo que sugiere una disminución aguda reversible del remodelamiento en respuesta a dicha hormona. Sin embargo, para inducir una

disminución significativa del remodelamiento se requieren dosis superiores a su concentración postprandial.

Las células osteoformadoras poseen receptores para GIP, cuya respuesta fisiológica sería modificar la síntesis de colágeno y FAO. Más aún, se ha demostrado que la administración de GIP previene la pérdida ósea inducida por ovariectomía en ratas. Asimismo, la sobreexpresión de GIP da lugar al aumento en los marcadores de formación ósea y en la DMO del esqueleto (*Clowes JA y col., 2005*).

METABOLISMO DEL FÓSFORO

El P es uno de los elementos esenciales para el organismo y, debido a su alta capacidad de reacción, no se lo encuentra libre en la naturaleza sino formando fosfatos. Por ser un componente universal de las células se encuentra presente en todos los alimentos; por lo tanto, su deficiencia nutricional no ocurre, excepto bajo condiciones sumamente especiales.

La cantidad de P en el organismo, para un adulto normal de 70Kg de peso, se encuentra en el orden de los 700g, de los cuales el 80-85% se encuentra en hueso en la forma de fosfato inorgánico, formando parte de los cristales de hidroxapatita, y el 10-15% en los tejidos blandos, principalmente en el músculo esquelético (9%) y vísceras (10,9%) y sólo el 0.1% en el LEC (*Figura 22*).

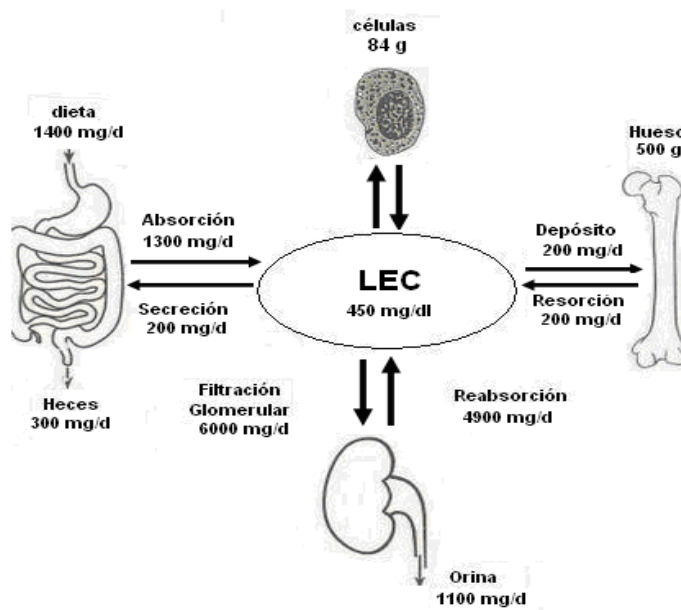


Figura 22.- Balance de Fósforo en un adulto normal.

El P intracelular es fundamentalmente de naturaleza orgánica en la forma de creatina-fosfato, ATP y en el glóbulo rojo como 2,3difosfoglicerato. Este último se encuentra libremente distribuido entre el espacio intra y el extracelular (*Gaasbeek A y col., 2005*).

A diferencia de lo que ocurre con la calcemia, que se mantiene constante a lo largo de la vida, la fosfatemia se modifica con la edad, el sexo, la ingesta dietaria de P, la velocidad de crecimiento y los niveles hormonales. Aproximadamente el 70% del P sérico es orgánico, formando parte de los fosfolípidos plasmáticos y sólo el 30% es inorgánico, siendo este último el responsable del valor de la fosfatemia.

En adultos, el rango de la fosfatemia se halla comprendido entre 2.5 y 4.5mg/dl (0.81-1.45mM); los niveles séricos son más elevados en los infantes y disminuyen en el niño hasta alcanzar en la adolescencia el nivel observado en el adulto. El 85% del P dosable se encuentra libre, que como mono y difosfato constituye el ultrafiltrable; el 15% se encuentra ligado a proteínas. La mayor especie de fosfato al pH sérico normal de 7.4 es la forma divalente (HPO_4^{2-}) (*Lemann J y col., 2003*).

Absorción

La absorción de P está directamente relacionada a su ingesta. Cuando la ingesta se encuentra en el rango normal de 770 a 1860mg/d, el porcentaje de absorción se encuentra entre el 60 y el 80%. La absorción, como en el caso del Ca, puede ser:

- **Pasiva:** es máxima después de una comida y dependiente de la concentración luminal de P.
- **Activa:** mediada por un mecanismo totalmente diferente al del Ca, pero también regulada por calcitriol.

El proceso de absorción es saturable, dependiendo de la concentración luminal de P, y existe a lo largo de todo el intestino pero no ocurre en el colon. Como la concentración intracelular es mayor, el ion penetra a través del ribete en cepillo por un proceso dependiente de energía o un transporte activo secundario acoplado al flujo de Na^+ . El calcitriol estimula la entrada de P, favoreciendo su pasaje a través del ribete en cepillo (*Figura 23*).

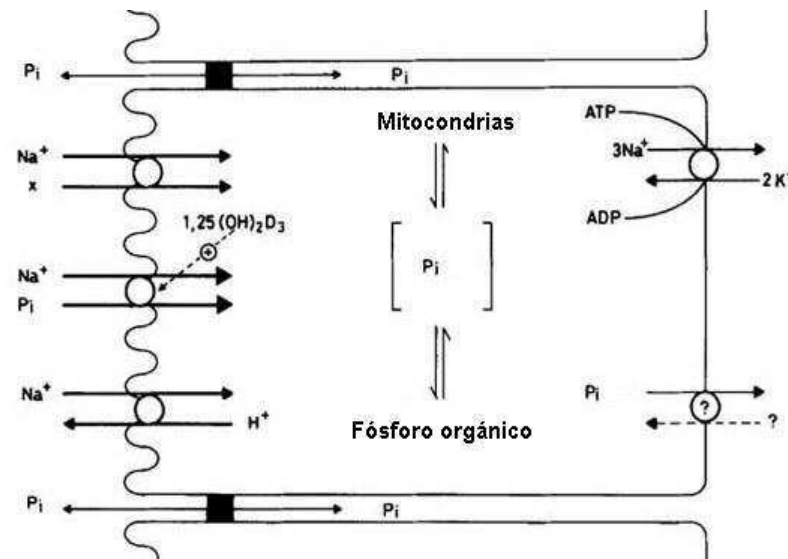


Figura 23.- Absorción intestinal de P.

Excreción

El 85% del P sérico es ultrafiltrable, siendo la excreción urinaria de ~750-1000mg/d.

El 85% de la reabsorción ocurre en el túbulo proximal, donde la etapa limitante se encuentra en la zona apical debido a que allí se produce el cotransporte activo de Na-P.

Los factores que regulan la reabsorción de P dependiente de Na^+ son: la cantidad de P en la dieta, los niveles de PTH y los de FGF-23. Una baja ingesta estimula la reabsorción y viceversa. La PTH es el principal factor fosfatúrico, suprimiendo la reabsorción de P dependiente del cotransportador Npt2 presente en las membranas del ribete en cepillo. El calcitriol estimula tanto la absorción intestinal como la reabsorción tubular de P. El FGF-23 (fosfatonina) es uno de los principales factores circulantes fosfatúricos (principal regulador del Npt2), detectable en suero de sujetos normales y en desórdenes de tipo hipofosfatémico.

Rol del Fósforo en la regulación hormonal

La homeostasis del Ca se altera por anomalías en el metabolismo del P al inducir cambios en el producto sérico $[\text{Ca} \times \text{P}]$. Este producto es constante en el sentido de que el aumento en uno de sus componentes produce la disminución recíproca del otro. La hipofosfatemia incrementa, independientemente de la PTH, la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y ésta, a su vez, favorece la absorción intestinal y la resorción ósea de Ca y P. Esta hipercalcemia relativa suprimirá la secreción de PTH, aumentando la excreción renal de Ca y disminuyendo la excreción renal de P (Favus MJ y col., 2008).

GENERALIDADES DEL METABOLISMO LIPÍDICO

El tejido graso o adiposo es uno de los tejidos más abundantes del organismo; representa alrededor del 15-20% del peso corporal del hombre y del 20-25% en las mujeres. Se encuentra distribuido en varias localizaciones, principalmente a escala dérmica, subcutánea, mediastínica, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal. Es un tejido que no está conformado sólo por adipocitos maduros, sino también por fibroblastos, células endoteliales y macrófagos, los cuales constituyen cerca del 50% del contenido celular total (*Pérez Mayorga M, 2007*).

El tejido adiposo cumple funciones mecánicas y metabólicas. Mecánicamente la grasa amortigua a los órganos internos, protegiéndolos y manteniéndolos en su sitio, pero también lo hace con estructuras más externas del cuerpo. Metabólicamente dicho tejido es el encargado de regular el metabolismo de los lípidos corporales.

Existen dos tipos de tejido adiposo: blanco y marrón. Estos dos tejidos no sólo presentan diferencias en su coloración sino también en su morfología, distribución y función.

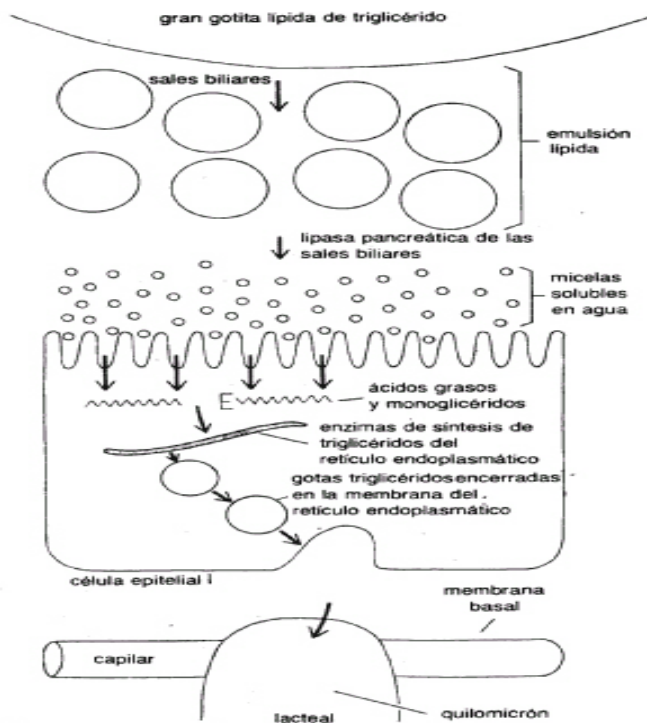


Figura 24.- Absorción de grasas en el intestino.

El tejido blanco es el más común en el adulto. Sus células son polihédricas, miden entre 50 y 150µm de diámetro y contienen una gran gota de grasa llenando todo el citoplasma mediante la

cual almacenan energía. Esta gota desplaza las organelas hacia la periferia, las que quedan reducidas a una pequeña área cerca de la membrana (*Figura 24*).

La grasa de las células, que se encuentra en estado semilíquido, está compuesta fundamentalmente por triglicéridos (TGL). En el citoplasma perinuclear se ubican un aparato de Golgi pequeño, escasas mitocondrias en forma ovalada, cisternas del retículo endoplasmático rugoso (RER) poco desarrolladas y ribosomas libres. El citoplasma que rodea la gota de lípido contiene cisternas del RE liso (REL), algunos microtúbulos y numerosas vesículas. Además de funcionar como depósito energético, el tejido adiposo blanco es reconocido como un *órgano endócrino*, secretor de adipocinas entre las cuales se encuentran la leptina, la adiponectina y citoquinas proinflamatorias.

Al tejido adiposo marrón se lo conoce como grasa parda, se encuentra únicamente en mamíferos y su distribución está restringida en el adulto. Sus células son poligonales y más pequeñas que las del tejido adiposo blanco; su citoplasma contiene numerosas gotas de lípido de diferente tamaño (son multiloculares) y contienen menos lípidos que los adipocitos blancos. Es una célula particularmente rica en mitocondrias con abundantes crestas y su núcleo esférico está centralmente ubicado. Las células que se disponen normalmente alrededor de los vasos sanguíneos se especializan en la producción de calor mediante la expresión de una proteína desacoplante 1 (UCP-1) que disipa en esa forma el gradiente de protones generado por la cadena de transporte mitocondrial. En este sentido, sus mitocondrias carecen del aparato celular necesario para transformar la energía liberada por la oxidación de los ácidos grasos en ATP, por lo que dicha energía se transfiere en forma de calor a la sangre (*Pérez Mayorga M, 2007*).

Metabolismo del tejido graso

Ingesta

En los alimentos, los lípidos se encuentran fundamentalmente como TGL y, en menor proporción, como fosfolípidos, colesterol libre o esterificado y otros esteroides. La mayor parte de la digestión se lleva a cabo en el duodeno y yeyuno, aunque existen una lipasa salival y una gástrica que inician la hidrólisis parcial de los TGL, liberando especialmente ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y media que pueden absorberse a nivel de estómago. En el duodeno, y debido a los movimientos peristálticos, la grasa se emulsifica con la bilis y se dispersa en pequeñas gotitas que aumentan enormemente la superficie de contacto con las enzimas digestivas, favoreciendo su digestión y absorción (*Figura 24*).

En la luz intestinal la acción de la lipasa/colipasa hidroliza los TGL dando AGL y monoglicéridos. Estos productos resultantes de la digestión forman con las sales biliares pequeñas micelas

hidrosolubles que difunden en el medio acuoso hacia las microvellosidades donde se separan; el material lipídico atraviesa la membrana por difusión simple. Los fosfolípidos y el colesterol libre que provienen de la bilis tienen el mismo destino que aquellos provenientes de la dieta.

En el interior de la mucosa, los monoglicéridos y los AGL se reesterifican formando TGL, se recomponen los fosfolípidos y el colesterol se esterifica parcialmente, lo cual les imposibilita recorrer el camino inverso. Los lípidos reconstituidos forman complejos lipoproteicos solubles denominados *quilomicrones* (Q), lo que facilita su transporte en medio acuoso. Los Q se vehiculizan hacia el torrente sanguíneo a través de los vasos linfáticos; son procesados prioritariamente por el tejido adiposo pero también por el resto de los tejidos extrahepáticos; los Q "remanentes" son catabolizados en el hígado. En el tejido adiposo el material lipídico de los Q es desdoblado en AGL y colesterol por la acción de la lipoproteínlipasa (LPL). Una vez dentro del tejido, los AGL son reesterificados a TGL.

El hígado también es capaz de sintetizar AG y colesterol de "novo" a partir del excedente de hidratos de carbono vía acetil-CoA. Esa grasa de síntesis endógena se vuelca al torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas más pequeñas que los Q, llamadas *lipoproteínas de muy baja densidad* (VLDL) las que descargarán sus TGL en los tejidos extrahepáticos, principalmente en tejido adiposo. Dicha pérdida convierte parte de las VLDL en VLDL residuales denominadas *lipoproteínas de densidad intermedia* (IDL), las que son, en su mayor parte, eliminadas de la circulación por los hepatocitos. La pérdida adicional de TGL produce lipoproteínas *de baja densidad* (LDL), más ricas en colesterol y ésteres de colesterol (Nelson DL y col., 2005).

Tanto IDL como LDL distribuyen el colesterol a los tejidos a través de su unión con receptores LDL ubicados en las membranas celulares de tejidos hepáticos y extrahepáticos (Altman R y col., 2005).

Las *lipoproteínas de alta densidad* (HDL) se sintetizan en el hígado y en el intestino delgado o bien resultan del catabolismo de las lipoproteínas ricas en TGL. Estas partículas de HDL nacientes presentan una forma discoidal que se transforma en una partícula esférica de HDL madura al enriquecerse en colesterol. Esta lipoproteína retorna al hígado, donde se metaboliza descargando el colesterol, pero también puede ser captada por tejidos esteroideogénicos para la formación de hormonas. La HDL desprovista de lípidos se disocia, vuelve a la circulación sanguínea y extrae más lípidos de los Q y de las VLDL residuales. La HDL carente de lípidos también puede captar colesterol almacenándolo en los tejidos extrahepáticos o transportándolo hacia el hígado, donde se cataboliza (DL Nelson y col., 2005).

El HDL-colesterol (HDL-Col) tiene un rol crítico en la homeostasis de colesterol ya que media la transferencia de colesterol desde los tejidos extrahepáticos hacia el hígado. Este proceso se

denomina *transporte reverso del colesterol* (TRC) y es considerado el efecto antiaterogénico de HDL-Col. A través del proceso de TRC los tejidos periféricos remueven el exceso de colesterol, previniendo la formación de placas de ateroma. Asimismo, el HDL-Col ejerce funciones antiaterogénicas y protectoras vasculares por su acción antioxidante, antitrombótica y antiinflamatoria (Shah PK y col., 2001). La obesidad afecta la cantidad y calidad de HDL-Col (Wang X y col., 2007) (Figura 25).

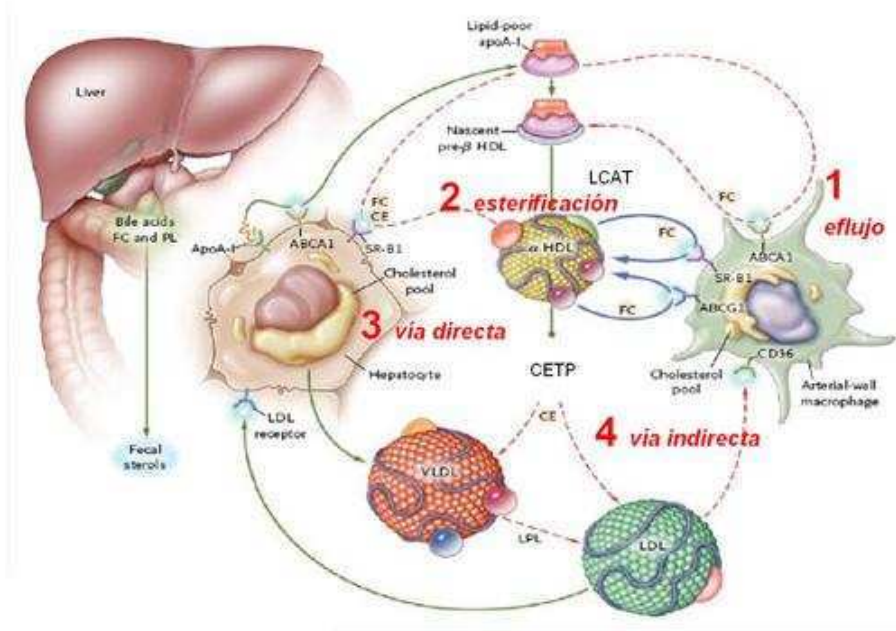


Figura 25.- Metabolismo del colesterol. Tomado de Nelson DL y col., 2005.

Adipogénesis

Las MSCs son células pluripotenciales, potencialmente diferenciables, con alto índice mitótico. Los mecanismos de diferenciación de los progenitores y su desarrollo a formas maduras (osteoblastos, adipocitos, miocitos y condrocitos) no se encuentran completamente dilucidados (Savopoulos Ch y col., 2011) (Figura 26). El proceso de transdiferenciación involucra el pasaje de una línea celular a otra de origen común durante la diferenciación. Varios estudios indican la existencia de transdiferenciación entre las células de la médula ósea durante el mecanismo de maduración y diferenciación de los adipocitos.

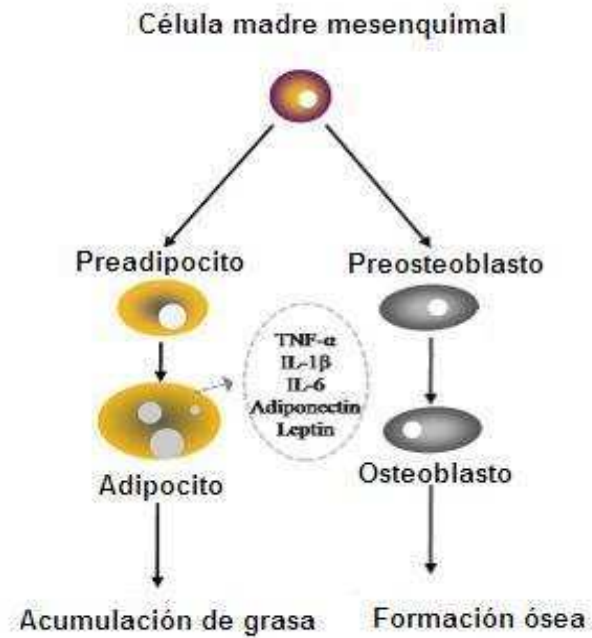


Figura 26.- Metabolismo óseo regulado por adipocitos, osteoblastos y osteoclastos. Tomado de Cao JJ, 2011.

La diferenciación hacia adipocitos está caracterizada por cambios en la morfología celular, la sensibilidad a hormonas, la expresión génica y la capacidad secretora. En este caso, secretan factores locales como adipsina, leptina, adiponectina, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y angiotensinógeno, los que se caracterizan por un efecto pleiotrópico significativo sobre el microambiente local de la médula ósea, incluyendo los osteoblastos (Savopoulos Ch y col., 2011).

Los adipocitos son células que presentan la propiedad de acumular lípidos en su citoplasma. Los lipoblastos o precursores adipocíticos producen cantidades importantes de colágenos tipo I y III. En cambio, los adipocitos adultos secretan muy bajas cantidades de colágeno y pierden la capacidad de dividirse; sin embargo, presentan una vida media muy larga y una capacidad de aumentar la cantidad de lípidos acumulados. El tejido adiposo postnatal contiene células inmaduras y precursores adipocíticos residuales a partir de los cuales pueden generarse adipocitos adicionales. Este último mecanismo se hace operativo cuando la ingesta calórica aumenta exageradamente.

Diversos factores de transcripción están implicados en la adipogénesis. Hasta ahora se han descrito dos familias de factores de transcripción, las C/EBPs (“CCAAT/Enhancer Binding Proteins”) y los PPAR γ (“Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ ”), aunque también se expresan otros factores como el SREBP-1 (“Sterol-Regulatory Element-Binding Transcription Factor 1”). En la diferenciación primaria se expresa el C/EBP- δ , mientras que en las etapas finales de la maduración lo hace el C/EBP- α . Los factores de transcripción PPAR γ están implicados en el control del balance entre osteoblastogénesis y adipogénesis (Nuttall ME y col., 2004 y Perera RJ y col., 2006) (Figura 27). Estos factores se expresan en dos isoformas: PPAR γ 1 and PPAR γ 2, debido al “splicing” alternativo o a los promotores de los genes primarios.

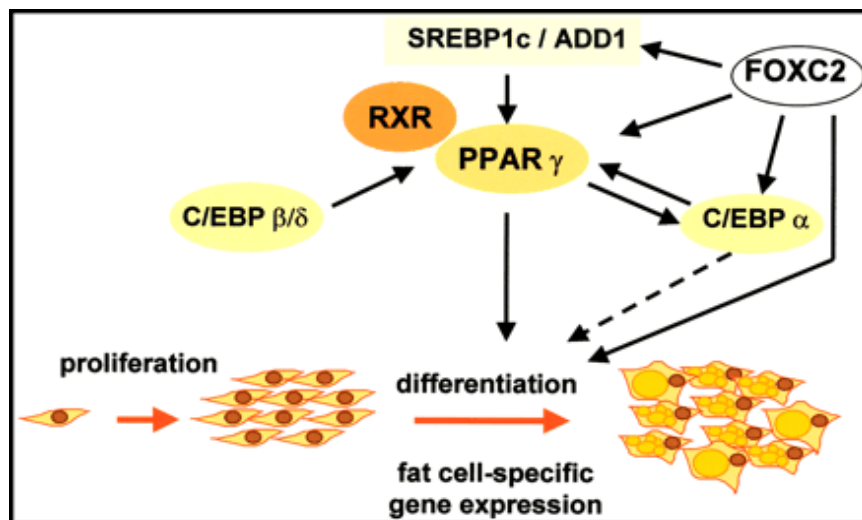


Figura 27.- Adipogénesis. Figura tomada de internet. [http:// www.jlr.org](http://www.jlr.org).

Los ligandos de PPAR γ incluyen cadenas largas de AG y sus derivados oxidados. Se ha demostrado que la activación de receptor de PPAR γ promueve la adipogénesis de las células

estromales de la médula ósea al tiempo que inhibe la osteoblastogénesis. Agonistas sintéticos de PPAR γ , como los derivados de tiazolidinedionas, son sustancias sensibles a insulina utilizadas en el tratamiento de la diabetes tipo II; sin embargo, la adipogénesis es un efecto indeseable de dicho tratamiento (*Packard CJ y col., 2008; Nuttall ME y col., 2004; Lecka-Czernik B y col., 2002 y Savopoulos Ch y col., 2011*).

Tejido adiposo como órgano secretor

El tejido adiposo está actualmente considerado no sólo como un tejido de almacenamiento sino como un órgano de secreción de sustancias con acción endócrina, parácrina y autócrina. Entre las sustancias secretadas, las adipoquinas leptina y adiponectina están involucradas en la patofisiología de diferentes desórdenes como diabetes, obesidad, inflamación y aterogénesis; otras sustancias secretadas se relacionan con el sistema inmune (TNF α , IL-1 e IL-6) y al desarrollo de resistencia a la insulina (resistina).

A pesar de sus connotaciones negativas respecto de la salud, la grasa corporal tiene un importante rol fisiológico. Los efectos benéficos incluyen el mantenimiento de la temperatura corporal, el depósito de TGL y su acción moduladora sobre la sensibilidad a insulina y al apetito. Aunque los efectos negativos de la adiposidad sobre la sensibilidad a la insulina son a menudo vistos como algo meramente patológico, se cree que la resistencia a dicha hormona representa una respuesta fisiológica normal a la obesidad, tratando de disminuir el depósito de TGL en el tejido adiposo (*Eckel RH, 1992*). En este sentido, varios estudios concluyen que la resistencia a la insulina protegería al organismo de la ganancia de peso ejerciendo un rol limitante de la deposición grasa (*Swinburn BA y col., 1991 y Frayn KN y col., 1996*).

Citoquinas liberadas por el tejido graso

Las citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, en conjunto con niveles elevados de AGL, promueven la resistencia a la insulina. Asimismo se ha propuesto que actúan en un circuito autócrino inhibiendo la respuesta hiperplásica de los adipocitos por lo cual, a su vez, llevan a la hipertrofia del tejido y secreción posterior de AGL y citoquinas proinflamatorias (*Hamdy O y col., 2006*). Estas citoquinas se encuentran elevadas en la obesidad y fundamentalmente el TNF α estaría implicado en la resistencia a la insulina. Sin embargo, el tejido adiposo también jugaría un rol importante en la modulación de la inmunidad a través de la leptina y de las citoquinas secretadas con propiedades tanto pro como antiapoptóticas (*Ferris WF y col., 2011*).

Leptina

Es una proteína de 167 aá, codificada por el gen *ob* que presenta varios roles incluyendo el control del crecimiento, la regulación inmune y la reproducción (*Schwartz MW y col., 2000; Bajari*

TM y col., 2004; Kaur T y col., 2005 y Friedman JM y col., 1998). Uno de los roles más importantes de la leptina es la regulación del peso corporal (*Singla P y col., 2010*).

Si bien los adipocitos son el sitio primario de producción de leptina, dicha hormona también se expresa en la pared gástrica y vascular, placenta, ovarios, músculo esquelético e hígado (*Koerner A y col., 2005; Brzozowski T y col., 2005; Nawrot-Porabka K y col., 2004 y Konturek PC y col., 2004*). Los receptores de leptina se expresan en una variedad de tejidos, incluyendo al óseo.

Los niveles de leptina circulante están relacionados con la adiposidad, pero este no es el único factor determinante de sus niveles. La leptina parecería indicar el estado energético del organismo. La falta de sensibilidad a la leptina lleva a obesidad con la participación significativa de los mecanismos que regulan el metabolismo óseo (transdiferenciación).

La leptina regula el “eje cerebro-intestino” que provee una señal de saciedad a través de su acción sobre receptores hipotalámicos del sistema nervioso central (SNC) suprimiendo la ingesta de alimentos y promoviendo las vías de liberación de energía (*Konturek PC y col., 2004; Konturek SJ y col., 2004 y Tilg H y col., 2006*). Por ello se planteó la hipótesis de que, en algunos casos, la obesidad se debería a una reducida acción de leptina en el cerebro, y que los individuos afectados no responderían al tratamiento farmacológico con leptina. La leptina es captada por el cerebro mediante receptores expresados en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica que funcionan como transportadores de leptina; sin embargo, en el interior se requiere además de la activación de una serie de respuestas neuronales integradas que darán lugar a un balance entre ingesta y energía. Una alteración en una o más de estas vías se manifestará en resistencia a la leptina.

La tasa de utilización de la glucosa estimulada por insulina es un factor clave que conecta la secreción de leptina y la masa grasa (*Friedman JM y col., 1998*). En este sentido, varias investigaciones indican que la leptina tendría un rol más importante que la insulina en el control central de la homeostasis energética. Los receptores de leptina e insulina se expresan en diversas neuronas involucradas en la ingesta de energía, y la administración de cualquiera de los péptidos directamente en cerebro reduce la ingesta de alimentos (*Weigle DS y col., 1995 y Campfield LA y col., 1995*). La insulina es una señal aferente hacia el SNC que causa efectos inhibitorios a largo plazo sobre la ingesta energética. Los niveles de insulina decrecen con la reducción del peso. La deficiencia de leptina causa obesidad severa con hiperfagia que persiste a pesar de los altos niveles de insulina. En contraste, la deficiencia de insulina no induce obesidad. Sin embargo, estas comparaciones se complican por el rol crítico que tiene la insulina en la promoción tanto del almacenamiento de grasa como en la síntesis de leptina por parte de las células grasas.

La leptina presenta acción proinflamatoria ya que incrementa la activación de células T y la liberación de citoquinas; promueve la respuesta Th1; aumenta la activación de células NK; aumenta la activación y la producción de citoquinas de macrófagos (TNF- α , IL-6, etc.); también activa neutrófilos y sus actividades quimiotácticas y oxidativas, funciones estas importantes para las respuestas de inmunidad innata y la regulación de la colonización de patógenos de piel y mucosas. Asimismo induce la liberación de citoquinas por parte de los monocitos (*Singla P y col., 2010*).

Resistina

Esta hormona secretada por los adipocitos maduros debe su nombre a que confiere un aumento en la resistencia a la acción de la insulina (*Steppan CM y col., 2001*). Es una proteína de 114 aá cuyos niveles se encuentran aumentados en la obesidad. Es considerada una molécula proinflamatoria ya que activa la liberación de la citoquinas que como el TNF- α e IL-6 y la expresión de moléculas de adhesión dependientes del factor de transcripción NF κ B. Juega un rol importante en la patogénesis de diabetes y sus complicaciones. La liberación de resistina se asocia a menudo con el aumento en la liberación de IL-6, hiperglucemia y ciertas hormonas, como la GH y hormonas gonadales. Su rol en el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina en humanos es controvertido (*Kusminski CM y col., 2005*).

En roedores, la expresión de resistina es relativamente adipocito-específica mientras que, en humanos, se expresa predominantemente en macrófagos y monocitos, y es virtualmente indetectable en adipocitos. En roedores, la sobreexpresión de resistina induce un perfil dislipidémico similar al observado en el estado de insulino-resistencia a través de una secreción incrementada de lipoproteínas. La administración de resistina recombinante modula la producción hepática de glucosa en ratas e inhibe significativamente la glucogénesis inducida por insulina. Posiblemente, bajo ciertas circunstancias, los niveles elevados de leptina podrían suprimir los de resistina inhibiendo su expresión. Aunque se observaron relaciones opuestas entre leptina y grasa corporal y entre resistina y grasa corporal no se encontró correlación significativa entre los niveles de estas dos adipoquinas (*Clowes JA y col., 2005*).

Adiponectina

Se encuentra presente tanto dentro de las células como en circulación, en formas multiméricas: trímeros, hexámeros, multímeros.

La principal diferencia con otras hormonas secretadas por el tejido adiposo es que, mientras dichas hormonas están relacionadas con la resistencia a insulina y aumentan en la obesidad, la producción y concentración de adiponectina se oponen a dicho efecto (*Arita Y y col., 1999*). A

diferencia de la resistina, la adiponectina aumenta la sensibilidad a la insulina y parecería estar más cercamente relacionada con la sensibilidad a insulina en humanos. En ratones, sin embargo, la adiponectina tendría un rol limitado en la modulación de la acción de la insulina; tampoco se encontró relación entre los niveles de adiponectina y grasa corporal. En humanos, en cambio, se observa generalmente una relación inversa entre adiponectina e índice de masa corporal (IMC). En este sentido, varios estudios han demostrado una relación inversa entre adiponectina plasmática y los niveles de TGL en la etapa postprandrial o con los niveles de glucosa en ayunas. Es una hormona antiinflamatoria ya que disminuye la activación y proliferación de células T, inhibe la liberación citoquinas dependiente de NFκB, aumenta la producción del mediador antiinflamatorio IL-10 en monocitos, macrófagos y células dendríticas humanas. Adicionalmente, la adiponectina reduce la producción de interferón γ (IFN-γ) y los macrófagos tratados con adiponectina exhiben una capacidad fagocítica reducida (*Singla P y col.; 2010*).

En la obesidad existe una disminución en la expresión y liberación de adiponectina debido a que aumentan las concentraciones de mediadores inflamatorios.

HIPÓTESIS

La primera hipótesis del presente trabajo tuvo su origen en estudios previos de Zemel y col. (2004), por los cuales la baja ingesta de calcio (ICa) impactaría negativamente no sólo sobre la salud ósea sino también sobre el desarrollo de sobrepeso y obesidad. Sin embargo, el efecto podría ser diferente en condiciones favorables o no para el desarrollo de obesidad. Por ello, la hipótesis del presente estudio fue que el efecto de la deficiencia de Ca podría impactar diferentemente en condiciones de predisposición a desarrollar obesidad respecto de condiciones que no presenten tal predisposición.

La segunda hipótesis también se basó en estudios previos en los cuales se aseguraba que el mayor contenido graso sería beneficioso para la salud esquelética ya que se asociaría con una menor pérdida de masa ósea y, en consecuencia, con una reducción en el riesgo de padecer osteopenia/osteoporosis y fracturas asociadas. En la actualidad se postula que la masa magra y no la masa grasa sería la responsable de proteger al hueso, por lo cual la hipótesis del presente estudio fue que las ratas obesas presentarían, a igualdad de peso corporal, menor masa ósea que las ratas sin padecer obesidad.

Este nuevo postulado se basó en los acontecimientos recientes de la existencia de una interrelación osteoblasto-adipocito. En este sentido, además de originarse a partir de la misma célula madre mesenquimal, existirían regulaciones recíprocas entre el tejido óseo y graso, los cuales se podrían evidenciar mediante los niveles de BGP e insulina. Estas nuevas interrelaciones sugieren que los niveles de BGP estarían inversamente relacionados con la cantidad de grasa corporal y con los niveles de insulina.

OBJETIVOS

Objetivo General

En base a las hipótesis planteadas, los objetivos generales consistieron en evaluar en forma comparativa en ratas genéticamente obesas IIMB/ β *versus* ratas de la cepa Wistar:

- 1) el efecto de la diferente ICa sobre la composición corporal,
- 2) la interrelación entre el metabolismo óseo, la composición corporal y ciertos parámetros del metabolismo energético.

Objetivos Específicos

Para cumplir con los objetivos generales se plantearon los siguientes objetivos específicos:

De acuerdo al consumo de dietas con diferentes niveles de Ca (bajo, normal y alto) se realizaron los siguientes estudios:

- Evaluación de la composición corporal.
- Evaluación del metabolismo óseo mediante:
 - a) medición densitométrica del contenido mineral y la densidad mineral del esqueleto total y subáreas de interés,
 - b) medición de marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo en sangre.
 - c) medición histológica del cartílago de crecimiento,
 - d) medición de la absorción y balance de Ca,
 - e) medición del contenido corporal total de Ca y P.
- Evaluación de parámetros del metabolismo energético:
 - a) medición del contenido de grasa perigonadal y retroperitoneal y peso del hígado,
 - b) medición del colesterol total, colesterol HDL, colesterol no-HDL, triglicéridos, glucosa e insulina,
 - c) absorción de grasas.
- Interrelaciones entre los parámetros evaluados de los metabolismos óseo y energético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En el presente estudio se utilizaron:

-Ratas adultas de la cepa Wistar con un peso comprendido entre 250 y 300g, pertenecientes al bioterio de la Cátedra de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

-Ratas adultas de la cepa IIMb/ β con un peso comprendido entre 250 y 300g, pertenecientes al bioterio de la Cátedra de Bromatología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario. Esta cepa de ratas obesas y diabéticas ha sido obtenida por desadaptación genético-ambiental y alto grado de endocría. Es un modelo adecuado para el estudio de los efectos de diferentes tratamientos sobre la evolución de la obesidad acompañada de hipertriacilglicerolemia y progresión desde la intolerancia a la glucosa a la diabetes tipo 2. En esta cepa de ratas la instalación de la obesidad y la sintomatología de la diabetes se producen en la pubertad. Otra característica interesante de estos animales es el hecho de no presentar hipercolesterolemia asociada a la obesidad (*Olguin MC y col., 1998*).

Todos los animales permanecieron en condiciones controladas de humedad ($55\pm 10\%$) y temperatura ($21\pm 1^\circ\text{C}$), con ciclos de 12hs de luz/oscuridad y fueron alimentados *ad libitum* durante todo el período experimental con libre acceso al alimento y al agua desionizada.

Los animales fueron mantenidos de acuerdo a las normas de la Guía de Salud de Institutos Nacionales para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (*ILARCLS, 1996*), y el protocolo fue aprobado por la Universidad de Buenos Aires.

Dietas experimentales

Todas las dietas experimentales fueron isocalóricas (4 kcal/g) y se formularon de acuerdo a las recomendaciones de American Institute of Nutrition (AIN'93G) del año 1993, que estableció los estándares nutricionales para roedores (*Reeves PG y col., 1993*). Dichas dietas satisfacen los requerimientos nutricionales de los animales durante el crecimiento, la preñez y la lactancia.

La composición completa de las dietas se detalla en la Tabla 5. El aporte de proteínas se realizó mediante el agregado de caseinato de potasio (Nestlé, Argentina), conteniendo 85.1% de proteína; los lípidos se suministraron en forma de aceite de soja; la fuente de vit. D (200UI%) fue en forma de ergocalciferol; y los hidratos de carbono fueron aportados por la dextrina. Mientras que el contenido de P fue consante, la cantidad de Ca varió mediante el agregado de CaCO_3

anhidro (Anedra, Argentina), dando lugar a dietas con una concentración de 0.2; 0.5 ó 0.9g de Ca/100g de dieta denominadas con contenido: bajo (B), normal (N) y alto (A), respectivamente.

El consumo de dichas dietas dio lugar a los siguientes grupos experimentales:

- Grupo Alto (ACa): 0.9% Ca
- Grupo Normal (NCa): 0.5% Ca
- Grupo Bajo (BCa): 0.2% Ca.

Composición de las dietas experimentales /100g (Reeves, Nielsen & Fahey, 1993).

DIETA	Baja	Normal	Alta
Energía (Kcal)	400	400	400
Energía (KJ)	1675	1675	1675
Proteína (g)	17.0	17.0	17.0
Lípidos (g)	7.0	7.0	7.0
Mezcla de sales libre de Ca*	4.0	4.0	4.0
Vitaminas solubles en agua*	0.25	0.25	0.25
Vitaminas solubles en lípidos	0.50	0.50	0.50
Colina	0.15	0.15	0.15
Celulosa	5.0	5.0	5.0
Dextrina **	para completar 100g		
Calcio (g)	0.2	0.6	0.9
Fósforo (g)	0.6	0.6	0.6

*Vitaminas (componentes individuales de Sigma, Missouri, USA), 5% de celulosa y 0.71% citrato de colina (Anedra, Argentina).

** Dextrina, agregada como fuente de carbohidrato para alcanzar 100g de dieta.

Tabla 5: Composición de las dietas experimentales.

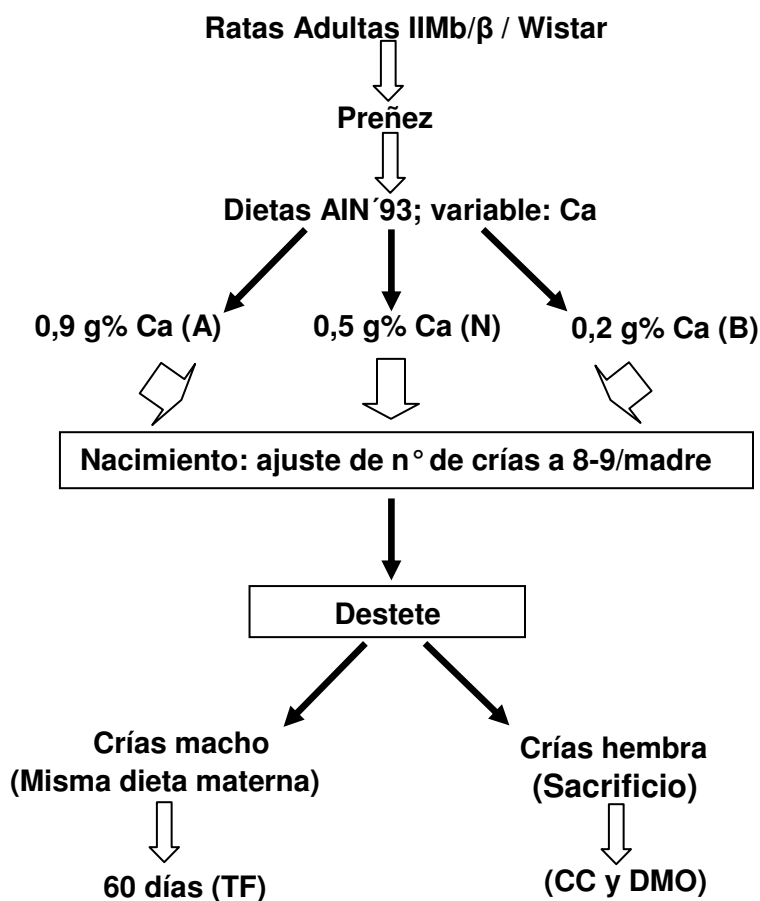
Drogas utilizadas

- Anestesia:

Solución de clorhidrato de ketamina (50mg/ml) (Holliday-Scott SA, Argentina) inyectada vía intraperitoneal (ip) en una dosis de 0.1ml/100g peso corporal (PC), conjuntamente con 0.02ml de clorhidrato de xilacina (Xilacina, Lab Richmond Div. Veterinaria SA, Argentina) independientemente del PC.

Diseño experimental

El esquema del diseño experimental se muestra a continuación:



Las ratas hembra adultas de ambas cepas fueron apareadas en proporción de 4 hembras por 1 macho. Al comprobarse la preñez por la presencia del tapón vaginal se separaron los animales, asignando una rata hembra por jaula y por dieta, con lo cual quedaron establecidos los tres grupos experimentales. Dichos grupos se alimentaron durante la preñez y la lactancia con una de las tres dietas experimentales isocalóricas, cuya única variación fue la concentración de Ca.

Al nacimiento se registró el número de machos y hembras para cada madre y el peso de las crías. Posteriormente se ajustó el número de crías a 8-9 por madre. Se descartaron las madres cuyo número de crías fue inferior a 8. Las hembras sólo se mantuvieron con el objeto de contar con el número adecuado de crías.

Al destete (40 ± 2 g), diez crías macho ($n = 10$) continuaron recibiendo *ad libitum* las mismas dietas experimentales que sus madres hasta los 60 días de edad (tiempo final: TF). Las crías hembras fueron sacrificadas para determinar composición corporal (CC) y DMO al destete.

Metodología

Ingesta de alimentos

En las madres se midió el consumo de alimentos durante la preñez y durante los diez primeros días del nacimiento de las crías. Este hecho se debe a que aproximadamente a la segunda semana de vida las crías comienzan a consumir dieta mixta (leche + polvo), por lo cual el consumo sería de las madres y su progenie. Desde el destete hasta el final de la experiencia se registró la ingesta de alimentos de las crías tres veces por semana.

La medición del consumo se realizó por diferencia de pesadas entre el tarro vacío y el que contenía la comida. El consumo de alimento se evaluó utilizando una balanza analítica Mettler, con precisión $\pm 0.1g$. Se calculó la cantidad total de ingesta de alimentos de todo el período experimental (g totales) y la cantidad ingerida por día (g/día). De acuerdo al contenido de Ca, P y proteínas de la dieta se calcularon las ingestas cálcica, de P y proteica en g totales y g/día, respectivamente.

Peso corporal

El peso corporal se evaluó una vez por semana a partir del destete utilizando una balanza analítica Mettler con precisión $\pm 0.1g$.

Absorción aparente y balance

Durante los últimos tres días de experiencia todos los animales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales de acero inoxidable. Durante dicho período se registró la ingesta de alimento y se recolectaron las heces. Con dichos parámetros se calculó la absorción (A) total (mg/d) y la A como porcentaje de la ingesta (%A) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$1) \quad A = I - F$$

$$2) \quad \%A = [I - F/I] \times 100$$

Donde F: eliminación fecal e I: ingesta de alimento

Se calcularon la A y el % A de Ca, P y grasa.

Asimismo, se calculó el balance (B) total (mg/d) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$B = I - F - U$$

Donde U: eliminación urinaria.

Determinaciones bioquímicas séricas

Al finalizar la experiencia (TF) se extrajo sangre por punción cardíaca bajo anestesia leve. El suero fue separado del paquete de glóbulos por centrifugación a 1000g durante 10 minutos permaneciendo a -20°C hasta su análisis. Las evaluaciones séricas fueron las siguientes:

- **Calcemia (mg/dl):** por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) a 423nm empleando cloruro de lantano (concentración de 6500ppm) como supresor de interferencias. El equipo utilizado para la medición fue un espectrofotómetro de absorción atómica GBC 902 de doble haz con llama de aire-acetileno.

El coeficiente de variación (CV) intraensayo fue de 0.9%, y el CV interensayo de 1.2%.

- **Fosfatemia (mg/dl):** por colorimetría UV mediante un equipo comercial (Wiener S. A.). El equipo utilizado para su determinación fue un espectrofotómetro UV visible Metrolab 2100.

El CV intraensayo fue de 1.3%, y el CV interensayo de 2.9% (*Gomori GA y col., 1942*).

- **25OHvitamina D (25OHD) (ng/ml):** por radioinmunoensayo (¹²⁵I RIA Kit, DiaSorin, Stillwater, MN, USA).

El procedimiento analítico consiste en un ensayo de competición proteica que consta de dos pasos. En el primero se extraen rápidamente la 25OHD y otros metabolitos hidroxilados presentes en el suero mediante acetonitrilo. Luego de esta etapa, la muestra se incuba con el anticuerpo específico y el trazador (¹²⁵I) 90 minutos a temperatura ambiente. La separación de las fases libre y unida al anticuerpo se realiza por medio de una incubación con un segundo anticuerpo que forma un complejo precipitante con el primer anticuerpo. Se agrega un buffer para reducir las uniones no específicas y se procede a centrifugar las muestras. La radioactividad se evalúa en el precipitado mediante un contador de rayos gamma.

El analizador calcula automáticamente la concentración del analito de cada muestra (en ng/ml o nmol/L).

Factores de conversión para la 25OHD: nmol/L x 0.40 = ng/ml

ng/ml x 2.50 = mmol/L

Los CV intra e interensayo fueron de 10 y 15%, respectivamente.

- **Fosfatasa Alcalina Ósea (FAO) (UI/L):** por colorimetría (Fosfatasa Alcalina optimizada de Wiener SA), previa precipitación de la isoforma ósea con lectina de germen de trigo.

Sus niveles plasmáticos se determinaron colorimétricamente utilizando paranitrofenol fosfato como sustrato mediante el ensayo comercial citado precedentemente, previa precipitación de la isoforma ósea con lectina de germen de trigo (*Farley JR y col., 1994*). La fosfatasa alcalina (ALP o monoéster ortofosfórico fosfohidrolasa, EC. 3.1.3.1.) hidroliza al p-nitrofenilfosfato (p-NFF) que es

incoloro produciendo fosfato y p-nitrofenol a pH 9,8. La velocidad con que se produce el anión p-nitrofenolato (amarillo) a 405nm es proporcional a la actividad enzimática de la muestra.

La dietanolamina (DEA) regula el pH de la reacción y actúa como aceptor del fosfato liberado por la fosfatasa (transfosforilación) observándose como resultado una activación de la reacción. La DEA reúne las mejores condiciones en cuanto a activación y capacidad buffer cuando se emplea p-NFF como sustrato.

Mediante este ensayo la reactividad cruzada con la isoforma fosfatasa alcalina hepática es menor del 5%. La sensibilidad del ensayo es de 0.7UI/L.

Los CV intra e interensayo se encuentran entre 4-8% y 6-8%, respectivamente.

- **Osteocalcina (BGP) (ng/ml):** por inmunoensayo (ELISA) (Rat-Osteocalcine Osteometer BioTech, Herlev, Dinamarca). El ensayo se basa en la unión de un anticuerpo monoclonal a la BGP soluble o inmovilizada. El anticuerpo está dirigido a la BGP humana y reconoce la región media (aá 21-29) de la molécula. Para la estandarización se utiliza BGP sintética humana y se observa un paralelismo con BGP purificada y con muestras de suero de rata. Este ensayo reconoce la BGP total (tanto carboxilada como no carboxilada).

Durante el paso de preincubación se inmoviliza la BGP biotinilada por unión a pocillos revestidos con estreptavidina. Luego se colocan la muestra, los estándares y el control en los pocillos apropiados, seguido de la solución de anticuerpo monoclonal (primera incubación). En la segunda incubación se agrega una solución de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con peroxidasa que se pega al anticuerpo monoclonal.

Por último se agrega el sustrato cromogénico tetrametilbenzidina (TMB) y se frena la reacción con ácido sulfúrico. Finalmente, se lee la absorbancia a 450nm.

El coeficiente de variación (CV) intraensayo fue del 6%.

- **Telopéptido C terminal del Colágeno Tipo I (CTX) (ng/ml):** por inmunoensayo (ELISA) (Rat-laps. Osteometer BioTech, Herlev, Dinamarca o Crosslaps, Nordic Bioscience Diagnostics A/S).

Este inmunoensayo enzimático detecta los CTX en suero y plasma. El método se basa en la utilización de dos anticuerpos monoclonales altamente específicos para una secuencia de aminoácidos Glu-Lys-His-Asp- β -Gly-Gly-Arg, donde el residuo de ácido aspártico se encuentra β isomerizado. Se utiliza un péptido sintético de estreptavidina inmovilizado en la pared de la microplaca; sobre éste se añaden la muestra y la mezcla de anticuerpos (un anticuerpo conjugado con peroxidasa y un anticuerpo conjugado con biotina). Después de la incubación y del lavado se produce una reacción colorimétrica que utiliza TMB como sustrato específico, deteniéndose la reacción con ácido sulfúrico. La absorbancia se mide mediante un lector de microplacas (Microplate reader Metrolab 980) a 450nm. El límite de detección es de 20ng/L.

El CV intraensayo fue del 6%.

- **Insulina (ng/ml):** por metodología de ELISA (Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, Millipore, Billerica, MA, USA).

Este ensayo está basado, secuencialmente, en la captura de moléculas de insulina de la muestra en pocillos de una placa cubierta por una cantidad pretitulada de anticuerpos monoclonales de ratón anti-insulina de rata y la unión de anticuerpos policlonales biotinilados a la insulina capturada, el lavado del material no pegado, la unión de peroxidasa del rábano picante a los anticuerpos biotinilados inmovilizados, el lavado de los conjugados libres de enzima y la cuantificación de los conjugados anticuerpo-enzima mediante la medición de la actividad de peroxidasa del rábano picante en presencia del sustrato TMB.

La actividad enzimática se mide espectrofotométricamente a 450 y 590nm, siendo el aumento en absorbancia directamente proporcional a los niveles de insulina.

Los resultados se calculan mediante un programa computacional, utilizando la ecuación generada a partir de la curva dosis-respuesta. Se grafica la curva de referencia para la interpretación de la muestra dibujando la absorbancia a 450nm menos la absorbancia a 590nm sobre el eje Y versus la concentración de los estándares de insulina en el eje X.

Sensibilidad: El nivel más bajo de insulina que puede detectarse con el ensayo es de 0.2ng/ml (35pM).

Los CV intra e interensayo se encuentran entre 6.0-17.9% y 0.9-8.4%, respectivamente.

- **Colesterol Total (CoIT) (mg/dl):** enzimáticamente, utilizando un automatizador Abbott Diagnostic.

Los ésteres de Col son hidrolizados enzimáticamente por la enzima colesterol esterasa a Col libre y ácidos grasos libres. El Col libre es entonces oxidado por la enzima colesterol oxidasa a 4-colesterona y peróxido de hidrógeno. Este último se combina con ácido hidroxibenzoico (HBA) y 4-aminoantipirina para formar un cromóforo (quinoneimina), que se cuantifica a 500nm.

Cálculo de los resultados:

Se utiliza la siguiente ecuación para determinar las concentraciones desconocidas.

$$\text{Muestra Problema} = \frac{\text{Abs. problema}}{\text{Abs. calibrador}} \times \text{Concentración del calibrador}$$

Concentración del calibrador: 200mg/dl.

Límite de detección: 5.0mg/dl (0.1mmol/L).

El CV intraensayo fue de 0.6-0.8%, y el CV interensayo de 0.4-0.8%.

- **HDL-Colesterol (HDL-Col) (mg/dl):** enzimáticamente, utilizando un automatizador Abbott Diagnostic.

La función del HDL-Col en el metabolismo lipídico es la de tomar y transportar el Col desde los tejidos periféricos hacia el hígado mediante un proceso llamado transporte reverso de Col.

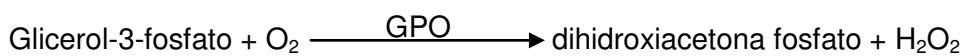
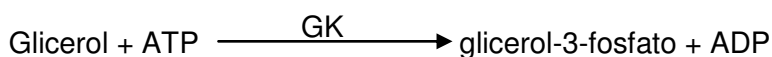
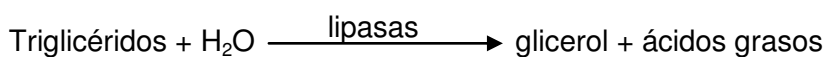
Este ensayo permite la medición directa de la concentración de HDL-Col en suero o plasma mediante la mezcla de dos reactivos, y la acción de un detergente. Se basa en la aceleración de la reacción de la enzima colesterol oxidasa con Col no-HDL no esterificado y la disolución selectiva del HDL-Col usando un detergente específico. Con el primer reactivo el Col no HDL no esterificado es atacado enzimáticamente y el peróxido generado es consumido por una reacción peroxidasa con, N-bis (4-sulfobutil)-m-disodio toluidina (DSBmT) originando un producto incoloro. El segundo reactivo es un detergente capaz de solubilizar al HDL-Col, conteniendo colesterol esterasa y un acoplante cromogénico que desarrollará color, el cual servirá para la determinación cuantitativa de HDL-Col.

Límite de detección: 5.0mg/dl (0.1mmol/L)

El CV intraensayo fue de 1.0-1.7%, y el CV interensayo de 0.5-1.1%.

- **Triglicéridos (TGL) (mg/dl):** por enzimología, utilizando un automatizador Abbott Diagnostic.

Los TGL se deteminan a partir de la hidrólisis enzimática por lipasas. El color se debe a la formación de quinoneimina por la reacción entre hidrógeno-peróxido, 4-aminofenazono y 4-clorofenol, bajo la influencia catalítica de peroxidasa, según la siguiente reacción:



Cálculo de resultados:

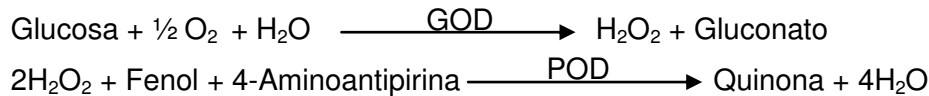
$$\text{Concentración de TGL} = \frac{\text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Patrón}} \times 200 = \text{mg/dl}$$

El CV intraensayo fue de 0.7-0.8%, y el CV interensayo de 0.4-0.6%.

- **Glucemia (mg/dl):** por enzimología, utilizando el método glucosa oxidasa/peroxidasa (BioSystems).

La enzima glucooxidasa cataliza la oxidación de glucosa a gluconato y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La concentración de glucosa es proporcional al H_2O_2 ; este puede evaluarse mediante una reacción de color producto de la acción de la peroxidasa.

La determinación de glucosa se efectúa según las siguientes reacciones:



Abreviaturas: GOD = Glucosa oxidasa

POD = Peroxidasa

Se utiliza una muestra control de concentración conocida. Se incuba, y posteriormente se lee la absorbancia a 505nm.

Cálculo de los resultados:

$$\text{mg /ml Glucosa} = \frac{\text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Estándar}} \times \text{Conc. estándar.}$$

$$\text{mg/dl} \times 0.0555 = \text{mmol}$$

Concentración del estándar: 100mg/dl

Límite de detección: 0.23mg/dl.

El CV intraensayo fue de 0.9-1.2%, y el CV interensayo de 1.9-2.7%.

Determinación urinaria de calcio

El Ca en orina se determinó sobre una recolección de 24hs, utilizando la misma metodología que para la calcemia.

Determinación de grasa en heces

Se utilizó el método de Folch J (*Folch J y col., 1957*):

Las heces recolectadas durante el período de balance se desecaron en estufa en dos etapas. En la primera etapa se colocaron a 42°C durante 12hs, posteriormente se molieron hasta la obtención de partículas de tamaño menor a 1mm. En la segunda etapa se colocaron a 105°C durante 2hs, hasta peso constante. Sobre la materia fecal seca (1.5 a 2.0g) se hicieron extracciones con una mezcla cloroformo:metanol 2:1 (5-6ml). Los extractos se recogieron en un recipiente tarado. Se evaporaron los solventes bajo campana y se obtuvo por diferencia de pesadas la grasa presente en materia fecal.

Determinación del contenido mineral en la dieta y en las heces

En las heces y la dieta se determinó el contenido de Ca y en la dieta el contenido de P.

Las heces recolectadas fueron lavadas previamente con solución de acetona (Raudo, Argentina) y posteriormente secadas bajo lámpara infrarroja. Se pulverizaron en una máquina procesadora provista de una hoja de titanio.

Las muestras de heces secas y de dietas fueron digeridas con ácido nítrico en un microondas usando bombas Parr previo a la determinación de los minerales.

El Ca y el P se determinaron por las mismas metodologías utilizadas para la determinación de la calcemia y la fosfatemia.

Composición corporal

Para su determinación se utilizaron los métodos descritos por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC):

- **Contenido de agua:** Se determinó por desecación.

Luego del sacrificio los animales se pesaron y se colocaron en estufa a $100 \pm 2^\circ\text{C}$. El contenido de agua se determinó por diferencia de pesadas antes y después de la desecación, hasta peso constante (alrededor de 48hs).

- **Contenido de grasas:** por el método de Soxhlet.

Este método consiste en homogeneizar la muestra libre de agua y extraer la grasa con un solvente (éter de petróleo) durante 4hs aproximadamente.

Los resultados se expresan como grasa cruda %. Este cálculo corresponde al porcentaje de grasa en base seca; para expresarlo en base húmeda (muestra original) se debe tener en cuenta el contenido de humedad determinado previamente. Con dicho dato se efectúa la corrección mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ base húmeda} = \% \text{ base seca} \times (100 - \% \text{ agua}) / 100$$

- **Contenido de proteínas:** se determinó nitrógeno por el método de Kjeldhal, calculando el contenido de proteínas mediante el factor 6.25 (% proteínas = % N x 6.25).

Dicho método involucra la oxidación húmeda de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado y la conversión del nitrógeno reducido a sulfato de amonio. Posteriormente, se descompone el sulfato de amonio por alcalinización con hidróxido de sodio y se destila el amoníaco liberado captándolo en solución ácida. Finalmente se valora el amoníaco.

Esta determinación incluye todo el nitrógeno reducido presente ($-\text{NH}_2$ y $=\text{NH}$), de modo que también se valoran los compuestos orgánicos no proteicos como urea, aminoácidos libres, purinas

y pirimidinas, compuestos amoniacales, alcaloides, etc. Sin embargo, la presencia de estas sustancias es generalmente pequeña comparada con el contenido proteico del peso corporal.

Expresión de resultados

$$\% N = VSO_4H_2 \times NSO_4H_2 \times meqN \times 100/pm$$

Donde VSO₄H₂: volumen de solución de ácido sulfúrico

NSO₄H₂: normalidad de solución de ácido sulfúrico

mEq N: 0.014

pm: peso de la muestra (o volumen si es un líquido)

$$\% \text{ Proteínas} = \% N \times \text{Factor de conversión (6,25)}$$

- **Contenido de cenizas:** por calcinación en mufla.

La muestra desecada y desengrasada se calcinó hasta cenizas blanquecinas a 550°C. El contenido de cenizas se determinó por diferencia de peso, antes y después de someter las muestras a calcinación. El método general de determinación de cenizas totales involucra la oxidación de toda la materia orgánica presente en una cantidad exactamente pesada de la muestra homogénea y la pesada posterior de las cenizas blancas resultantes.

Determinaciones Densitométricas

Al destete y al finalizar la experiencia se midió la DMO y el CMO del esqueleto total *in vivo* bajo anestesia general leve mediante la técnica de DXA. El equipo utilizado consta de un software diseñado específicamente para evaluar pequeños animales (DPX Alfa, radiación Lunar Corp., Madison, WI). Todas las ratas fueron analizadas utilizando el mismo tipo de exploración. La precisión del software fue evaluado por la medición de una misma rata cinco veces con reposición entre dos exploraciones en el mismo y en diferentes días. El CV fue de 0,9% para DMO de esqueleto total y el 3,0% para CMO. El análisis de las diferentes subáreas se realizó utilizando la imagen del animal visualizado en la pantalla de la computadora, mediante operación manual delimitando una ventana específica (ROI) para cada segmento. El CV para DMO de columna lumbar (CL) fue de 1.8% y de tibia proximal (TP) fue de 3.5%. Todos los análisis fueron realizados por el mismo observador con el fin de reducir al mínimo la variación inter-observador (*Mastaglia SR y col., 2006*).

Métodos estadísticos

Los resultados se expresaron como media \pm desvío estándar (DS). Para ello se realizó el test de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de las variables y el test de Levene para determinar la homogeneidad de varianzas. Comprobada la normalidad, los datos fueron analizados usando

análisis de varianza de un factor (ANOVA), y se realizó el test de comparaciones múltiples *a posteriori* cuando se encontraron diferencias significativas. Las correlaciones fueron analizadas utilizando el test de Pearson para muestras paramétricas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS 19.0 para Windows (SPSS, Inc. Chicago, IL). Un valor de P por debajo de 0.05 ($P < 0.05$) fue considerado significativo.

RESULTADOS

1- Resultados en ratas obesas

Características Clínicas

Durante todo el estudio experimental el porcentaje de sobrevivencia fue del 100%, por lo cual para cada dieta el número de animales ensayados fue de 10 (n=10).

La tasa de preñez de las madres alimentadas con la dieta BCa fue baja; dos hembras parieron menos de ocho crías y fueron eliminadas del estudio. Sin embargo, una vez lograda la misma no se observaron anomalías.

Los promedios \pm DS del número y sexo de la descendencia (relación machos:hembras) de los grupos bajo, normal y alto (OBCa, ONCa y OACa) figuran en la Tabla 6.

	OBCa	ONCa	OACa
Nº de crías	9 \pm 2	9 \pm 4	10 \pm 2
Machos:Hembras	4:5	4:5	5:5

Tabla 6.- Tasa de preñez de las madres y proporción de sexo de la descendencia.

Como puede observarse, no existieron diferencias significativas entre los grupos ni en el número de crías ni en la relación machos:hembras.

Ingesta y peso corporal

El consumo de alimentos (g/d) registrado durante toda la experiencia del grupo OBCa alcanzó un nivel significativamente mayor que el observado en los otros dos grupos estudiados ($p < 0.05$), sin evidenciarse diferencias significativas entre ONCa y OACa.

El aumento del PC durante toda la experiencia mostró un nivel significativamente mayor en el grupo OBCa ($p < 0.01$) respecto de los otros dos grupos, sin diferencias significativas entre ONCa y OACa.

A pesar de la mayor ingesta observada en el grupo OBCa la eficiencia energética a lo largo de la experiencia, calculada como la relación entre ingesta de alimento y PC (g/g), no presentó diferencias significativas entre los tres grupos estudiados (Tabla 7).

	OBCa	ONCa	OACa
Ingesta (g/d)	18,9±2,1	15,9±2,9*	16,4±4,0*
Aumento de Peso (g/d)	6,4±1	5,3±0,8*	4,7±1,0*
Eficiencia de Ingesta (g/g)	3,0±0,3	3,0±0,5	3,3±0,3

Tabla 7.- Ingesta de alimentos, aumento de peso y eficiencia de ingesta de los grupos estudiados.
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa.

Si bien el PC de las crías al nacimiento no alcanzó diferencias significativas entre los tres grupos estudiados (p : NS), las crías de las madres alimentadas con bajo Ca mostraron una tendencia a alcanzar un mayor PC. Al destete, las crías OBCa alcanzaron valores de PC significativamente mayores que los otros dos grupos ($p < 0.01$), sin observarse diferencias significativas entre ONCa y OACa. Dicha diferencia en el PC de las OBCa se mantuvo durante el resto de la experiencia; asimismo, al finalizar la misma los animales OACa alcanzaron el menor PC, que presentó significancia también respecto del grupo ONCa ($p < 0.01$) (Tabla 8 y Figura 28).

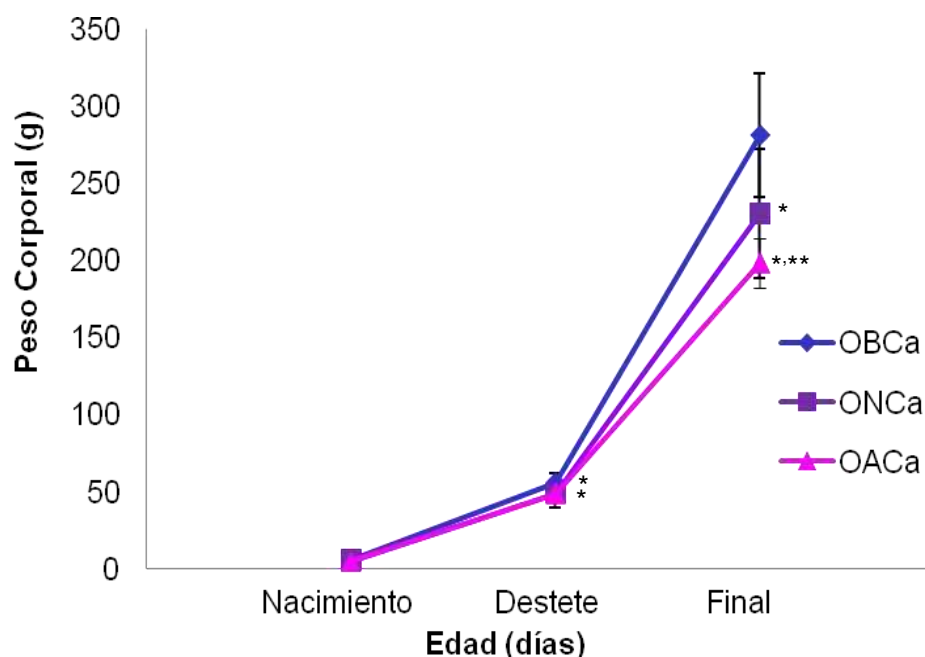


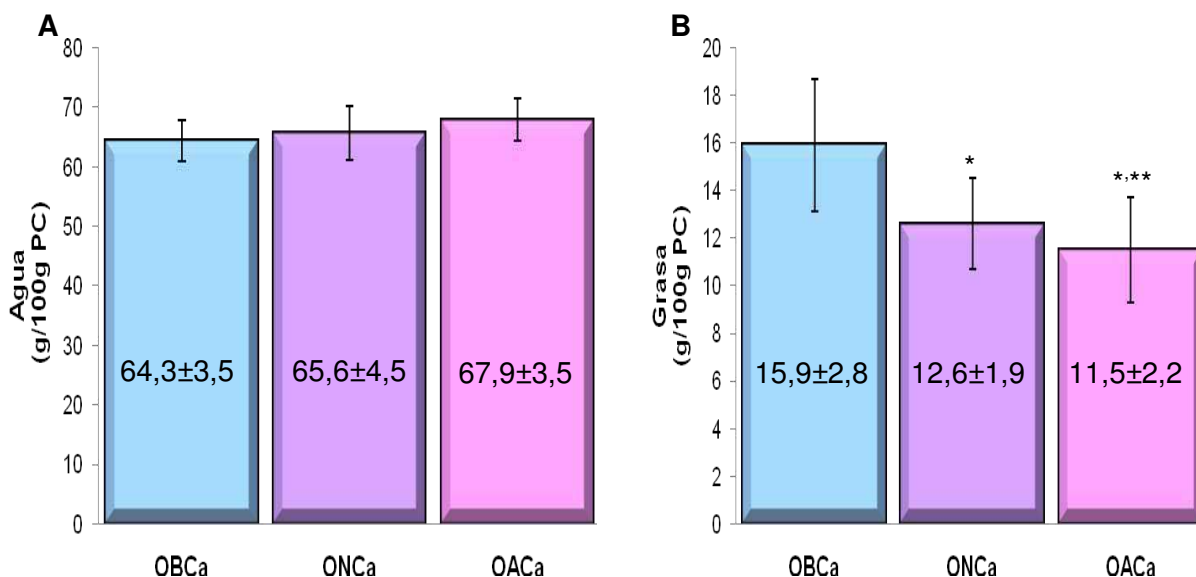
Figura 28.- Peso corporal al nacimiento, al destete y al final de la experiencia.
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de ONCa.

	OBCa	ONCa	OACa
Peso Corporal al Nacimiento (g)	5,9±0,6	5,4±0,3	5,1±0,7
Peso Corporal al Destete (g)	56,1±5,5	48,7±9,2*	49,0±5,3*
Peso Corporal Final (g)	281,0±40,0	230,0±42,0*	198,0±16,0***

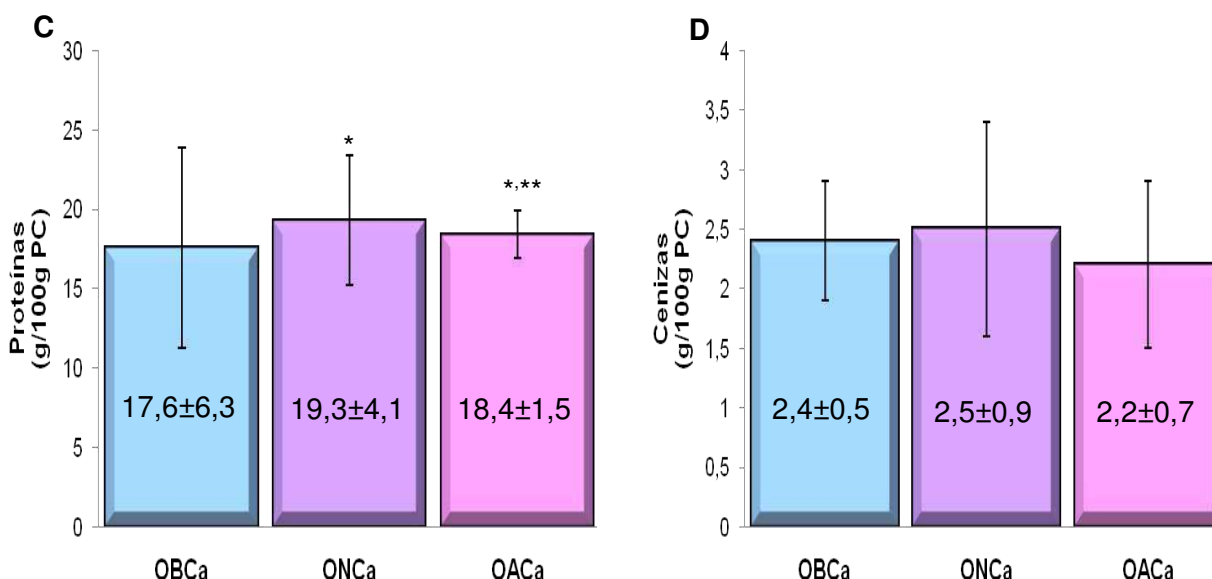
Tabla 8.- Peso corporal de los grupos a lo largo de la experiencia.
 (*): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de ONCa.

Composición corporal

La composición corporal total y como porcentaje (%) de los tres grupos estudiados al destete se muestra en la Tabla 9 y en la Figura 29 (A-D), respectivamente.



(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa;
 (**): $p < 0.01$ respecto de ONCa.



(*): $p < 0.05$ respecto de OBCa;
 (**): $p < 0.05$ respecto de ONCa.

Figura 29.- Composición corporal (g/100g PC) para los tres grupos al destete.
 A: Agua; B: Grasa; C: Proteínas; D: Cenizas.

	OBCa	ONCa	OACa
Agua Corporal (g)	36,1±4,0	31,9±5,0	33,3±3,5
Grasa Corporal Total (g)	8,9±1,5	6,1±1,0*	5,6±1,6*
Proteínas Corporales Totales (g)	9,8±1,4	9,4±0,9	9,0±1,7
Cenizas Corporales Totales (g)	1,3±0,1	1,2±0,5	1,1±0,4

Tabla 9.- Composición corporal (g) para los distintos grupos estudiados al destete.
 (*): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de ONCa.

El agua corporal total y el porcentaje de agua no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos estudiados.

El contenido corporal total de grasa mostró un aumento significativo en el grupo OBCa respecto de los otros dos grupos ($p < 0.01$), los cuales no mostraron diferencias entre ellos; el porcentaje de grasa mostró una relación inversamente proporcional al contenido de Ca de la dieta (OBCa>ONCa>OACA; $p < 0.01$).

No se observaron diferencias significativas en la cantidad total de proteínas entre los grupos estudiados; sin embargo, el porcentaje de proteínas totales fue significativamente mayor en ONCa respecto de los otros dos grupos ($p < 0.05$), y en OACa respecto de OBCa ($p < 0.05$).

El contenido corporal y el porcentaje de cenizas no mostraron diferencias entre los grupos estudiados.

La composición corporal total y en porcentaje de los tres grupos estudiados al final de la experiencia se muestra en la Tabla 10 y en la Figura 30, respectivamente.

	OBCa	ONCa	OACa
Agua Corporal (g)	189,1±18,2	153,4±21,0*	136,8±23,3*
Grasa Corporal Total (g)	45,1±10,0	30,1±9,7*	24,9±1,8*
Proteínas Corporales Totales (g)	41,1±4,5	39,7±5,2*	31,2±2,2*
Cenizas Corporales Totales (g)	5,5±0,9	6,2±1,1*	4,9±0,3**

Tabla 10.- Composición corporal (g) para los distintos grupos estudiados al final de la experiencia.

(): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de ONCa.*

Debido a su mayor PC, el contenido de agua total fue significativamente mayor en el grupo OBCa ($p < 0.05$), respecto de ONCa y OACa, los cuales no presentaron diferencias entre ellos. El contenido porcentual de agua, en cambio, no presentó diferencias significativas entre los grupos estudiados (*Figura 30A*).

Tanto el contenido total de grasa como el porcentual fueron significativamente mayores en el grupo OBCa comparado con los otros grupos ($p < 0.01$), los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos, aunque existió una tendencia a contener menor cantidad de grasa de grasa en el grupo OACa (*Tabla 10 y Figura 30B*).

Como resultado del mayor PC, el grupo OBCa mostró el mayor contenido de proteínas totales al compararlo con los otros grupos ($p < 0.01$), sin diferencias significativas entre ONCa y OACa. Sin embargo, el porcentaje de proteínas del grupo ONCa alcanzó un valor significativamente mayor que OBCa y OACa ($p < 0.01$), sin diferencias entre ellos (*Tabla 10 y Figura 30C*).

El contenido total de cenizas fue significativamente mayor en el grupo ONCa respecto tanto del grupo OBCa como del grupo OACa ($p < 0.01$); sin embargo, el porcentaje de cenizas presentó valores significativamente menores en el grupo OBCa ($p < 0.0001$) respecto tanto de ONCa como de OACa, sin encontrarse diferencias entre estos dos últimos.

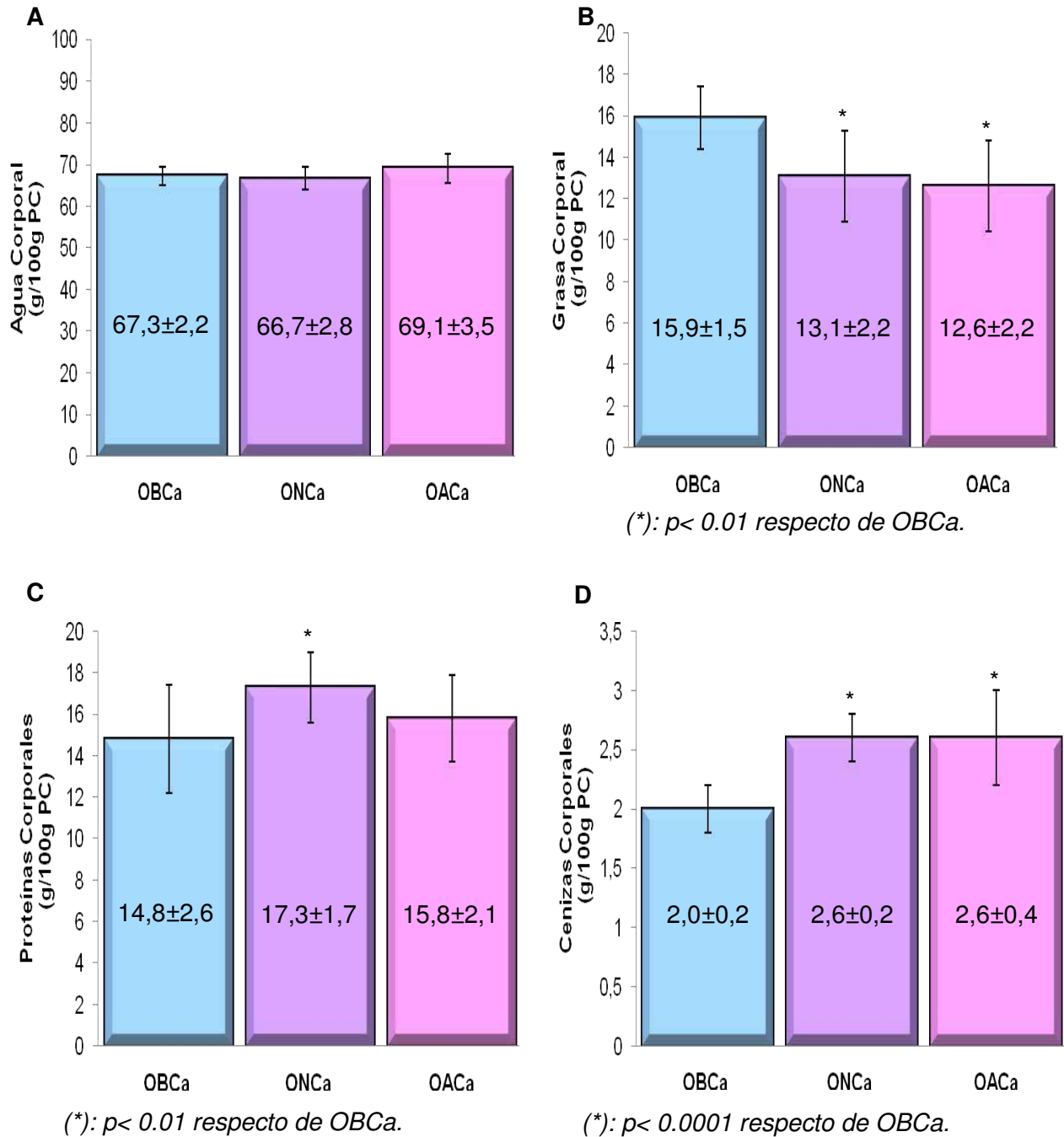


Figura 30.- Composición corporal (g/100g PC) para los tres grupos al final de la experiencia.
A: Agua; B: Grasa; C: Proteínas; D: Cenizas.

Cuando se correlacionaron los valores individuales del contenido total de cenizas (g) respecto de la masa magra total (g) de los tres grupos estudiados se obtuvo una función significativamente positiva entre ellos ($r= 0.78$; $p< 0.012$), mientras que no se encontró correlación respecto de la masa grasa (Figura 31 A y B). La masa magra fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación: Masa magra = PC total – contenido total de grasa – contenido total de agua – cenizas totales.

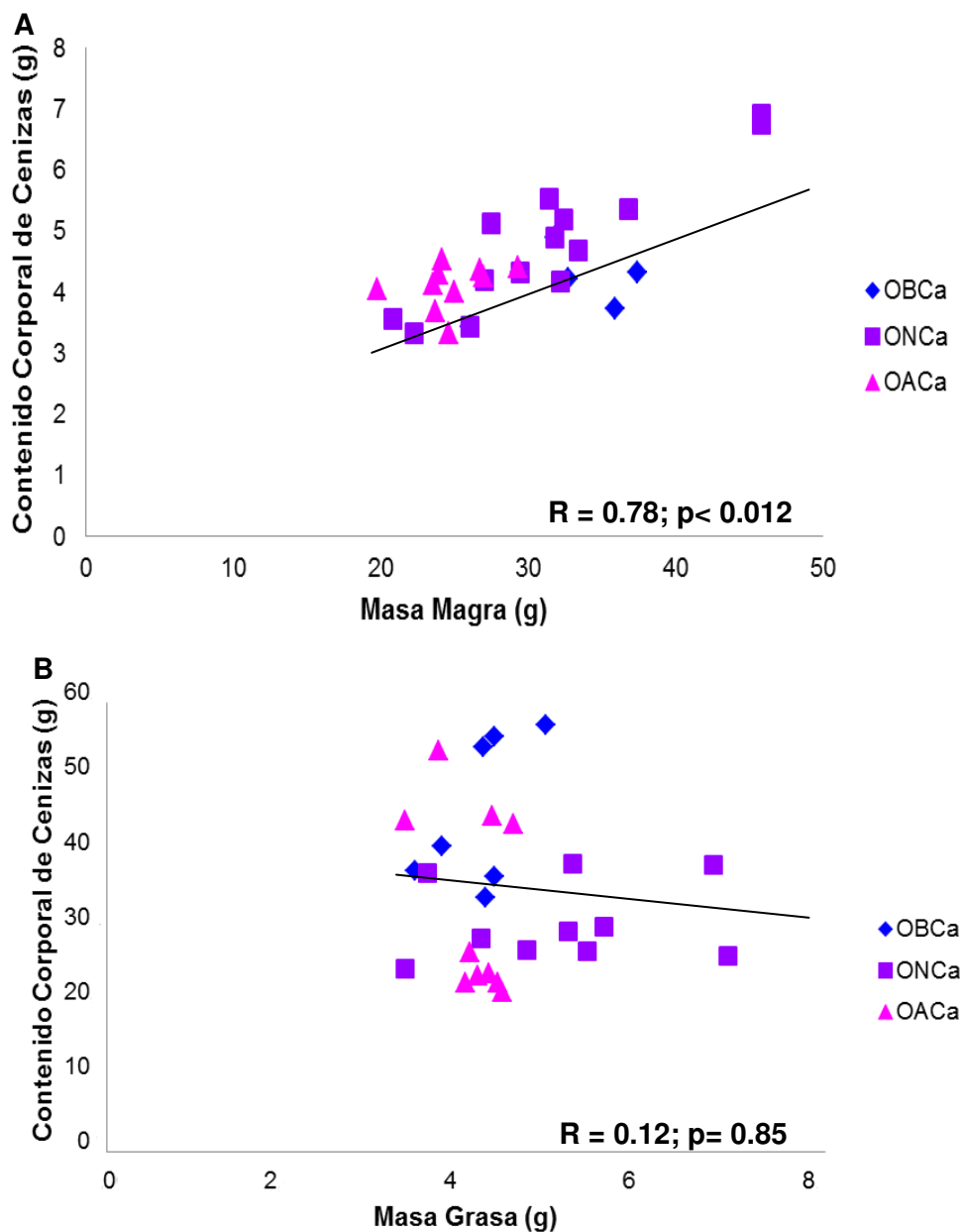


Figura 31.- A: Contenido de cenizas vs masa magra; B: Contenido de cenizas vs masa grasa.

Parámetros relacionados al metabolismo lipídico

Absorción de grasa

La Tabla 11 muestra los resultados de la absorción de grasa durante los últimos tres días de experiencia. El consumo de alimentos durante dicho período no presentó diferencias entre los grupos estudiados (p : NS), por lo cual, al ser dietas isocalóricas, tampoco se encontraron diferencias en el consumo de grasas. La excreción fecal de grasas fue significativamente mayor en el grupo OACa comparado con OBCa y ONCa ($p < 0.01$), los cuales no mostraron diferencias entre sí. La cantidad total de grasa absorbida (mg/d) y el porcentaje de absorción de grasas no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos estudiados (p : NS), aunque existió una tendencia del grupo OACa a presentar una menor cantidad de grasa absorbida ($p = 0.065$).

	OBCa	ONCa	OACa
Ingesta de Alimento (g/d)	24,0±3,7	25,2±8,8	24,6±1,7
Ingesta de Grasas (mg/d)	1745,6±194,9	1765,3±615,9	1720,0±121,2
Grasa Fecal (mg/d)	30,3±11,1	37,5±8,4	54,2±13,1 ^{***}
Absorción de Grasa (mg/d)	1705,2±183,5	1722,4±603,8	1665,8±122,7
Absorción de Grasa (%)	97,6±0,6	97,5±0,5	96,4±0,9

Tabla 11.- Ingesta de alimentos e ingesta, excreción y absorción de grasas para los grupos estudiados.

(^{*}): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (^{**}): $p < 0.01$ respecto de ONCa.

Peso del hígado y grasa perigonadal/retroperitoneal

El peso del hígado y los resultados de grasa perigonadal y retroperitoneal se muestran en la Tabla 12.

	OBCa	ONCa	OACa
Peso del Hígado (g)	15,6±0,7	12,3±2,6 [*]	10,2±1,2 [*]
Grasa Perig. + Retrop. (g)	13,5±0,72	10,2±2,6 [*]	7,43±1,5 ^{**,*}
% Grasa (Perig.+Retrop.)/PC	5.34±0.24	4.36±0.48 [*]	3.77±0.46 ^{***}

Tabla 12.- Peso del hígado y suma de grasa perigonadal y retroperitoneal (g y %) para los grupos estudiados.

(^{*}): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (^{**}): $p < 0.01$ respecto de ONCa.

El peso del hígado fue significativamente mayor en el grupo OBCa ($p < 0.01$) respecto de los otros dos, que no presentaron diferencias entre sí, aunque existió una tendencia a ser menor en el grupo OACa ($p = 0.059$). La suma total de la grasa perigonadal y retroperitoneal fue significativamente mayor en el grupo OBCa respecto de los otros dos grupos ($p < 0.01$); asimismo, el grupo OACa presentó un valor significativamente menor que ONCa ($p < 0.01$). El porcentaje de grasas perigonadal y retroperitoneal mostró un aumento significativo a medida que disminuyó el contenido de Ca en la dieta ($p < 0.01$) (Tabla 12).

Determinaciones Bioquímicas

Los niveles de colesterol total (Col T), colesterol HDL (HDL-Col), colesterol no HDL (Col no-HDL) y TGL se muestran en la Tabla 13.

	OBCa	ONCa	OACa
Col T (mg/dl)	122,4±28,1	98,4±4,9*	92,1±38,8*
HDL-Col (mg/dl)	19,8±7,9	30,7±3,8*	26,4±3,3*
Col no-HDL (mg/dl)	119,0±16,0	105,0±4,4	110,0±14,4
TGL (mg/dl)	290,6±138,9	225,0±123,6*	246,9±119,5**

Tabla 13.- Perfil lipídico de los diferentes grupos estudiados.
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de ONCa.

Los niveles séricos de colesterol total presentaron un valor significativamente mayor en el grupo OBCa respecto de los otros dos grupos ($p < 0.05$), los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos. Los niveles de HDL-Col fueron significativamente menores en el grupo OBCa respecto de los otros dos grupos ($p < 0.01$); si bien los grupos ONCa y OACa no alcanzaron diferencias significativas entre ellos, se observó una tendencia a menores niveles de HDL-Col en el grupo OACa ($p = 0.061$). Con respecto al Col no-HDL, no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados, aunque el grupo ONCa tendió a valores menores (Tabla 13). Los niveles de TGL fueron significativamente menores en el grupo ONCa al compararlo con los otros dos grupos estudiados ($p < 0.01$), los cuales no presentaron diferencias entre ellos.

Parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa

Los niveles de glucosa, insulina y el índice HOMA-IR se muestran en la Tabla 14.

	OBCa	ONCa	OACa
Glucosa (mg/dl)	252,0±48,9	151,9±69,3*	111,8±62,4*,**
Insulina (ng/dl)	6,9±3,2	4,1±1,6*	1,9±1,3*,**
HOMA-IR	81,5±46,3	31,0±22,5*	9,6±6,1*,**

Tabla 14.- Niveles de glucosa e insulina, e índice de resistencia a la insulina de los grupos estudiados.

(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (**): $p < 0.001$ respecto de ONCa.

Los niveles de glucosa e insulina aumentaron en forma significativa a medida que disminuyó el contenido de Ca en la dieta ($p < 0.01$); el grupo OBCa presentó los niveles significativamente más altos ($p < 0.01$) y el grupo ONCa presentó concentraciones significativamente mayores que el grupo OACa ($p < 0.01$).

Como consecuencia del aumento en los niveles de glucosa e insulina, el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) presentó una disminución significativa con el aumento de Ca de la dieta. El grupo OBCa presentó el mayor nivel de HOMA-IR respecto de los otros dos grupos ($p < 0.01$), y el ONCa un nivel significativamente mayor que el OACa ($p < 0.001$) (Tabla 14).

Absorción y Balance de Ca

Dado que durante el período de balance no existieron diferencias en cuanto a la ingesta de alimentos (Tabla 11), la ICa se relacionó directamente con el contenido de Ca de la dieta. El grupo OBCa presentó la ICa significativamente menor ($p < 0.01$) y el grupo ONCa un valor significativamente menor que el OACa ($p < 0.01$) (Tabla 15). Al igual que la ICa, la excreción fecal de Ca durante el período de balance estuvo significativamente relacionada con el contenido dietario de Ca ($p < 0.001$). La excreción urinaria en el grupo OACa mostró un aumento significativo respecto de los otros dos grupos ($p < 0.01$), entre los cuales no se observaron diferencias significativas.

El porcentaje de absorción aparente de Ca mostró una disminución significativa a medida que aumentó el contenido de Ca de la dieta (OBCa<ONCa<OACa; $p < 0.01$).

Tanto el balance aparente de Ca (B) (mg/d) como la absorción aparente de Ca (A) (m/d) totales se relacionaron en forma directamente significativa con el contenido de Ca de las dietas (OBCa<ONCa<OACa; $p < 0.01$) (Tabla 15).

	OBCa	ONCa	OACa
Ingesta de Ca (mg/d)	47,9±7,2	126,2±43,8*	221,1±15,3*,**
Ca Fecal (mg/d)	2,3±0,8	15,7±5,9*	80,8±16,1*,**
Ca Urinario (mg/d)	0,6±0,2	0,5±0,3	1,3±0,4*,**
Absorción Aparente de Ca (mg/d)	43,8±8,5	110,5±38,1*	140,3±11,0*,**
% Absorción de Ca	91,3±8,7	87,7±1,3*	64,0±6,0*,**
Balance Aparente de Ca (mg/d)	43,1±7,7	109,4±38,3*	139,0±11,0***

Tabla 15.- Ingesta de Ca, Ca fecal y urinario y absorción aparente de Ca de los diferentes grupos.
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de ONCa.

Cuando se graficó el BCa (mg/d) vs la ICa (mg/d) se observó una relación positiva que alcanzó una meseta entre los 200 y los 250mg de Ca ingerido ($p < 0.001$) (Figura 32).

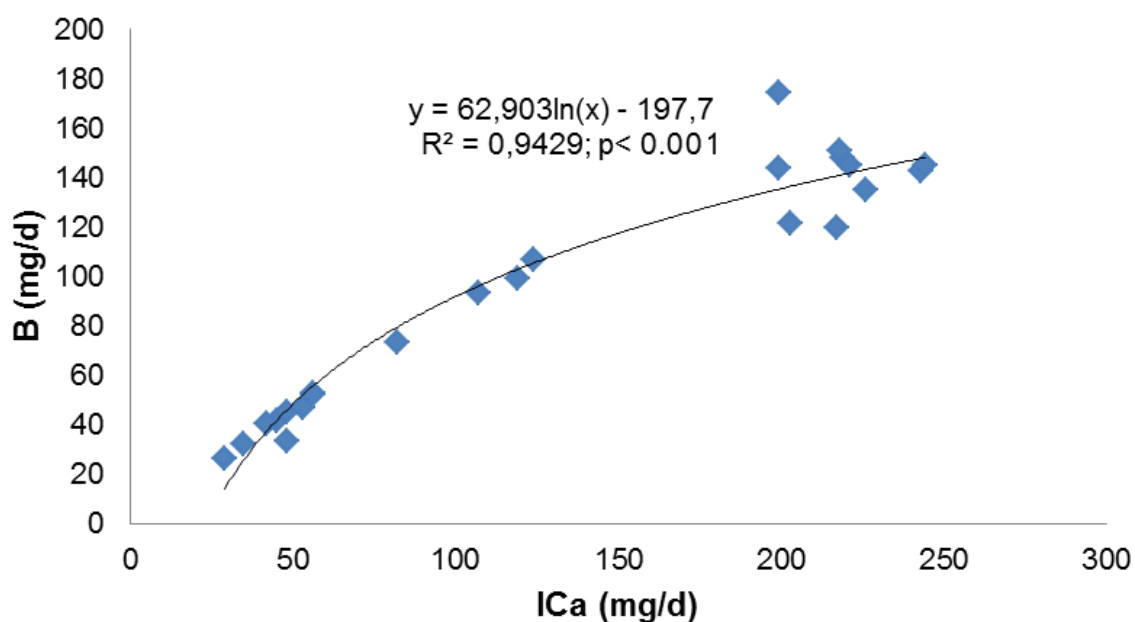


Figura 32.- Valores individuales de BCa vs ICa para los tres grupos estudiados.

Retención corporal de Ca y P

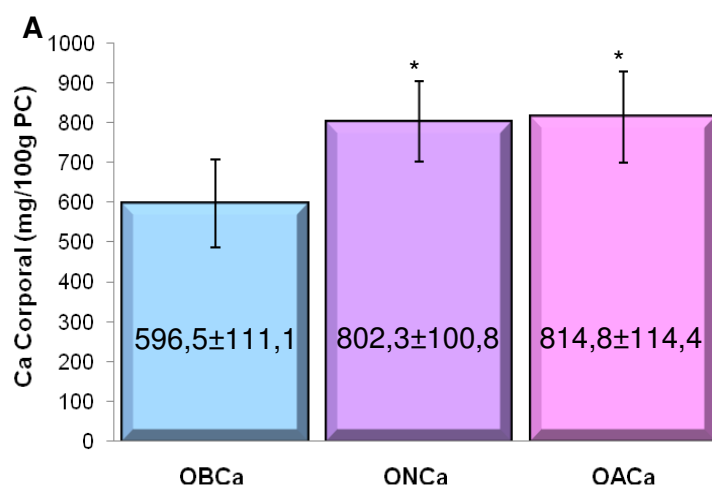
La Tabla 16 muestra los niveles corporales totales de Ca y P y la relación entre ellos.

	OBCa	ONCa	OACa
Ca Corporal Total (mg)	1656,0±119,0	1818,0±298,0*	1639,0±266,0**
P Corporal Total (mg)	1281,0±359,0	1457,0±309,0*	1068,0±274,0**
Relación Ca/P	1,36±0,04	1,36±0,03	1,54±0,05***

Tabla 16.- Contenido corporal de Ca y P, y relación Ca/P para los distintos grupos.
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de ONCa.

Cuando se determinaron los contenidos corporales totales de Ca y P existió una concordancia con el contenido de cenizas; el grupo ONCa presentó niveles de Ca y P corporales totales significativamente mayores respecto de OBCa y OACa ($p < 0.01$), los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos (Tabla 16). Los porcentajes de los contenidos corporales totales de Ca y P presentaron valores significativamente menores en el grupo OBCa comparado tanto con ONCa como con OACa ($p < 0.01$), los que no mostraron diferencias entre sí (Figura 32 A y B).

La relación corporal total de Ca/P no mostró diferencias entre los grupos OBCa y ONCa, los cuales a su vez presentaron valores significativamente menores que aquel observado en el grupo OACa ($p < 0.05$) (Tabla 16).



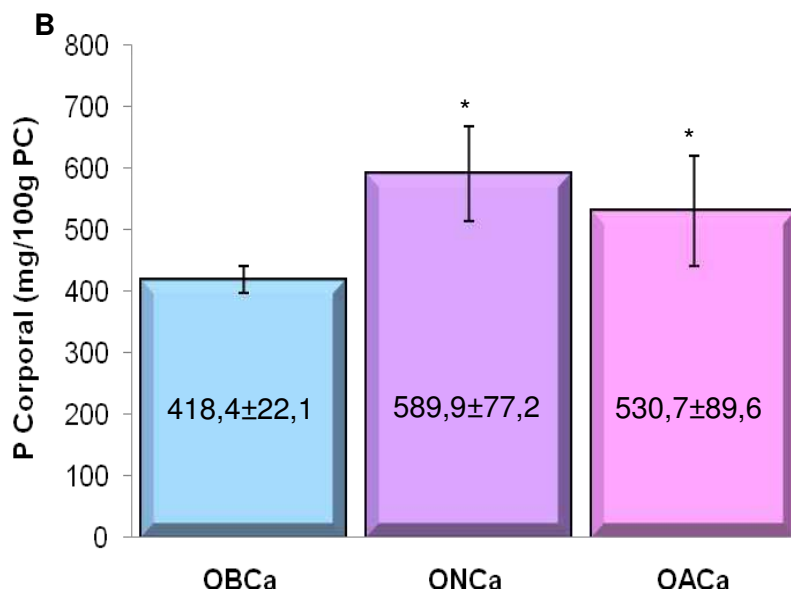


Figura 33.- Ca (A) y P (B) corporales de los diferentes grupos estudiados.
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa.

Parámetros Densitométricos

La Tabla 17 muestra el contenido y la densidad mineral del hueso analizados por DXA.

	OBCa	ONCa	OACa
CMO/PC de Esqueleto Total (g/100g PC)	0,84±0,2	1,44±0,3*	1,27±0,3***
DMO de Esqueleto Total (mg/cm²)	222,3±9,0	234,6±7,2*	232,6±4,4*
DMO de Tibia Proximal (mg/cm²)	203,0±13,0	210,0±16,0*	200,2±10,2**
DMO de Columna Lumbar (mg/cm²)	185,0±10,0	207±13,0*	192,0±6,0**

Tabla 17.- Parámetros densitométricos al final de la experiencia.
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (**): $p < 0.05$ respecto de ONCa.

El CMO del esqueleto total normalizado por PC (g/100g PC) fue significativamente menor en el grupo OBCa comparado tanto con ONCa como con OACa ($p < 0.01$); el grupo OACa presentó un valor significativamente menor que el ONCa ($p < 0.05$) (Tabla 17).

La DMO de esqueleto total presentó valores significativamente menores en el grupo OBCa respecto de los otros dos ($p < 0.05$), los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos.

Los valores de DMO de tibia proximal (DMOtp) y DMO de columna lumbar (DMOcol) fueron significativamente mayores en el grupo ONCa respecto de los otros dos grupos ($p < 0.05$), los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos; sin embargo, existió una tendencia a presentar DMOcol mayor en el grupo OACa respecto del OBCa ($p = 0.059$).

Parámetros bioquímicos relacionados al metabolismo fosfocálcico y óseo

Los resultados correspondientes a los parámetros bioquímicos se muestran en la Tabla 18.

	OBCa	ONCa	OACa
Cas (mg/dl)	10,4±0,5	10,3±0,6	10,6±0,7
Ps (mg/dl)	11,9±1,4	10,5±1,3	10,9±0,8
FAO (UI/L)	188,0±27,0	173,0±33,0	208,0±30,0 ^{*,**}
BGP (ng/ml)	514,0±60,0	375,0±46,0 [*]	739,3±190,7 ^{*,**}
CTXs (ng/ml)	70,0±4,0	83,0±7,0 [*]	69,0±13,0 ^{**}
25OHD (ng/ml)	24,8±4,8	19,0±5,4 [*]	20,5±2,3 [*]

*Tabla 18.- Parámetros bioquímicos para los diferentes grupos.
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de ONCa.*

Los niveles de Cas y Ps no presentaron diferencias significativas entre los tres grupos estudiados, aunque en los niveles de Ps existió una tendencia de los animales OBCa a presentar niveles más elevados que el resto de los grupos ($p = 0.059$). Los niveles de FAO fueron significativamente más elevados en el grupo OACa ($p < 0.01$); sin observarse diferencias significativas entre los grupos OBCa y ONCa. Los niveles de BGP fueron significativamente menores en el grupo ONCa ($p < 0.01$); asimismo, el grupo OBCa presentó niveles significativamente menores que el grupo OACa ($p < 0.01$).

Los niveles de CTX fueron significativamente mayores en el grupo ONCa ($p < 0.05$), sin observarse diferencias significativas entre los grupos OBCa y OACa.

Los niveles de 25OHD fueron significativamente mayores en el grupo OBCa comparado con los otros dos grupos ($p < 0.05$), los que no presentaron diferencias significativas entre ellos.

2- Resultados en ratas Wistar

Características Clínicas

Durante todo el estudio experimental el porcentaje de sobrevivencia fue del 100%, por lo cual para cada dieta el número de animales ensayados fue de 10 (n=10).

La tasa de preñez de las ratas alimentadas con la dieta BCa fue baja; por lo cual fue necesario aumentar el número de madres para lograr la preñez. Sin embargo, una vez lograda la misma no se observaron anomalías.

Los valores promedio \pm DS del número y sexo de la descendencia (machos:hembras) de los tres grupos estudiados se muestran en la Tabla 19.

	WBCa	WNCa	WACa
Nº de crías	9 \pm 2	9 \pm 4	10 \pm 2
Machos:Hembras	4:5	4:5	5:5

Tabla 19.- Tasa de preñez de las madres y proporción de sexo de la descendencia.

No existieron diferencias en ninguno de dichos parámetros entre los tres grupos estudiados.

Ingesta y peso corporal

El consumo de alimentos, el aumento de PC y la eficiencia en la ingesta de alimentos no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos estudiados (*Tabla 20*).

	WBCa	WNCa	WACa
Ingesta (g/d)	15,5 \pm 1,8	16,5 \pm 1,6	16,0 \pm 2,4
Aumento de Peso (g/d)	4,9 \pm 0,7	5,5 \pm 0,5	4,7 \pm 1,2
Eficiencia de Ingesta (g/g)	3,1 \pm 0,3	3,0 \pm 0,4	3,0 \pm 0,3

Tabla 20.- Ingesta de alimentos, aumento de peso y eficiencia de ingesta de los grupos estudiados. (): p < 0.05 respecto del resto de los grupos.*

El PC de las crías al nacimiento y al destete no presentó diferencias significativas entre los tres grupos estudiados (p: NS). Si bien el PC de las crías alimentadas con ACa alcanzó valores de PC

final mayores que los otros dos grupos, no se observaron diferencias significativas entre ellos (Tabla 21 y Figura 34).

	WBCa	WNCa	WACa
Peso Corporal al Nacimiento (g)	5,9±0,3	5,5±0,5	5,4±0,7
Peso Corporal al Destete (g)	44,5±5,8	44,2±3,4	45,5±5,8
Peso Corporal Final (g)	197,6±22,6	192,9±9,0	199,3±21,8

Tabla 21.- Peso corporal de los grupos a lo largo de la experiencia.

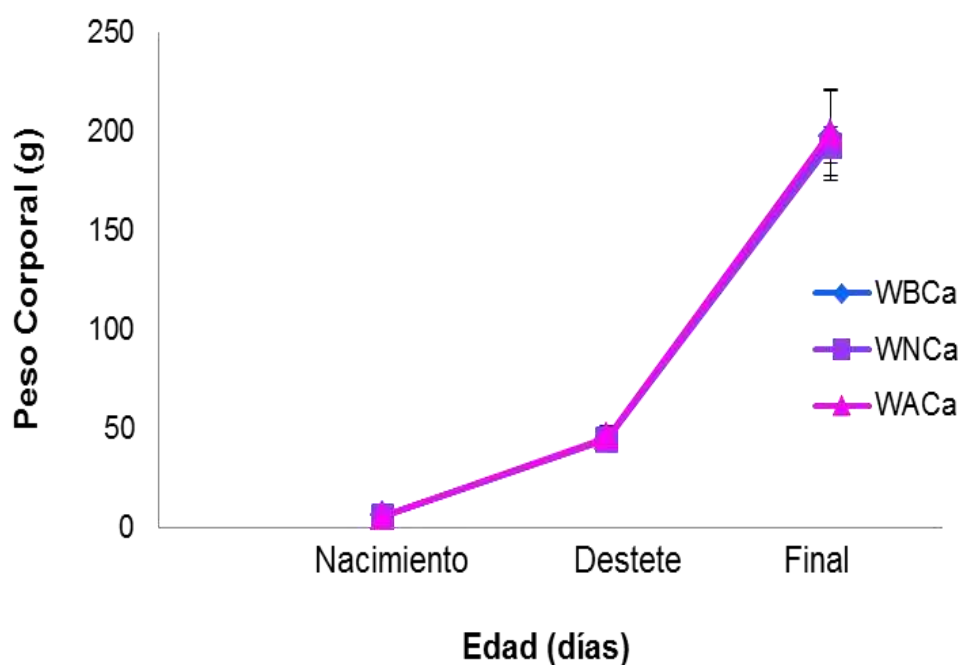


Figura 34.- Peso corporal al destete, al nacimiento y al final de la experiencia.

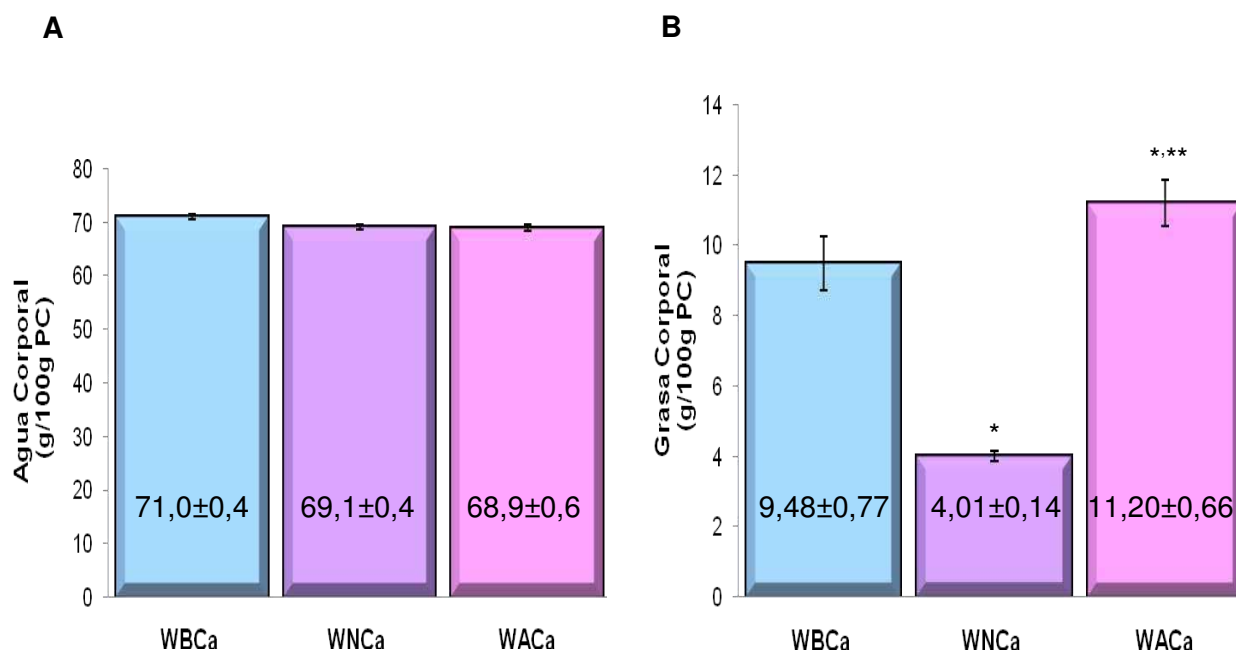
Composición corporal

La composición corporal total y como porcentaje al normalizarla por el PC (%) de los tres grupos estudiados al destete se muestra en la Tabla 22 y en la Figura 35 (A-D), respectivamente.

	WBCa	WNCa	WACa
Agua Corporal (g)	31,5±0,4	30,0±0,5	30,2±0,9
Grasa Corporal Total (g)	3,8±0,3	1,7±0,1*	5,0±0,5*,**
Proteínas Corporales Totales (g)	5,7±0,1	8,4±0,2*	6,6±0,3*,**
Cenizas Corporales Totales (g)	0,98±0,03	1,43±0,04*	1,14±0,04**

Tabla 22.- Composición corporal (g) para los distintos grupos estudiados al destete.
(*): $p < 0.01$ respecto de WBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de WNCa.

Se observa que el agua corporal, en las dos formas de expresión, no muestra diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, el contenido de grasa fue menor, mientras el de las proteínas y las cenizas corporales fue significativamente mayor en el grupo WNCa comparado con WBCa y WACa ($p < 0.01$). Asimismo, el contenido de grasas y proteínas totales fue significativamente mayor en el grupo WACa al compararlo con WBCa ($p < 0.05$); el contenido corporal total de cenizas no mostró diferencias significativas, mientras que el porcentaje fue significativamente mayor en WACa comparado con WBCa ($p < 0.05$).



(*): $p < 0.01$ respecto de WBCa;
(**): $p < 0.01$ respecto de WNCa.

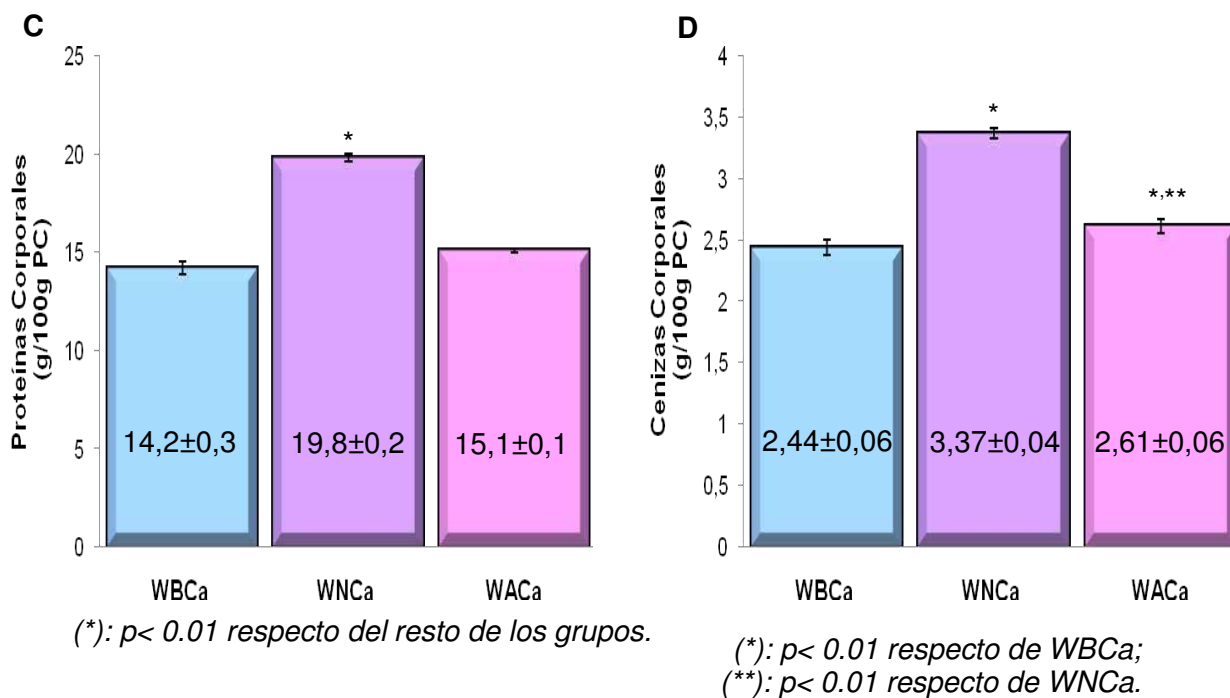


Figura 35.- Composición corporal (g/100g PC) para los tres grupos al destete.
A: Agua; B: Grasa; C: Proteínas; D: Cenizas.

La composición corporal total y como porcentaje (%) al final de la experiencia se muestra en la Tabla 23 y Figura 36 (A-D), respectivamente.

	WBCa	WNCa	WACa
Agua Corporal (g)	130,2±12,4	124,8±17,2	117,8±21,3
Grasa Corporal Total (g)	19,9±5,2	18,3±3,8	26,7±2,8***
Proteínas Corporales Totales (g)	28,6±2,6	32,5±7,6	38,6±8,1*
Cenizas Corporales Totales (g)	3,6±0,7	5,3±1,0*	6,2±1,4***

Tabla 23.- Composición corporal (g) para los distintos grupos estudiados al final de la experiencia.
(*): $p < 0.01$ respecto de WBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de WNCa.

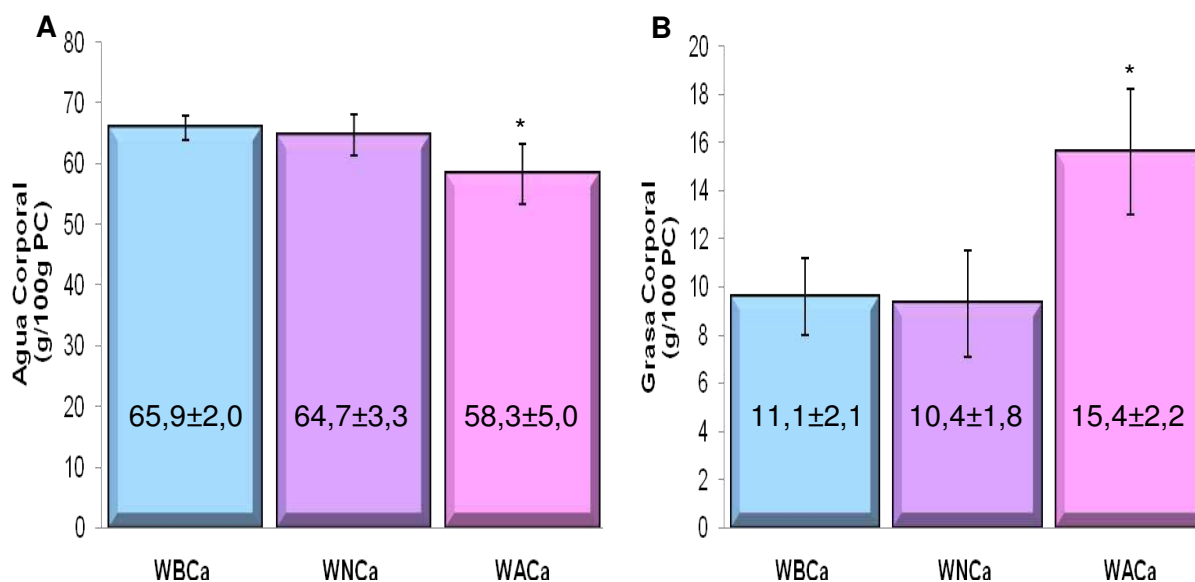
La cantidad de agua total presentó una tendencia a aumentar con el menor contenido de Ca de la dieta, aunque sin alcanzar significancia. Contrariamente, el porcentaje de agua fue

significativamente menor en el grupo WACa al compararlo con WNCa y WBCa ($p < 0.05$), sin diferencias significativas entre ellos.

Sorprendentemente, se observó que tanto el contenido de grasa total como el porcentaje de grasa fueron significativamente mayores en el grupo WACa, al compararlo con el WBCa y el WNCa ($p < 0.01$), los cuales no presentan diferencias entre ellos.

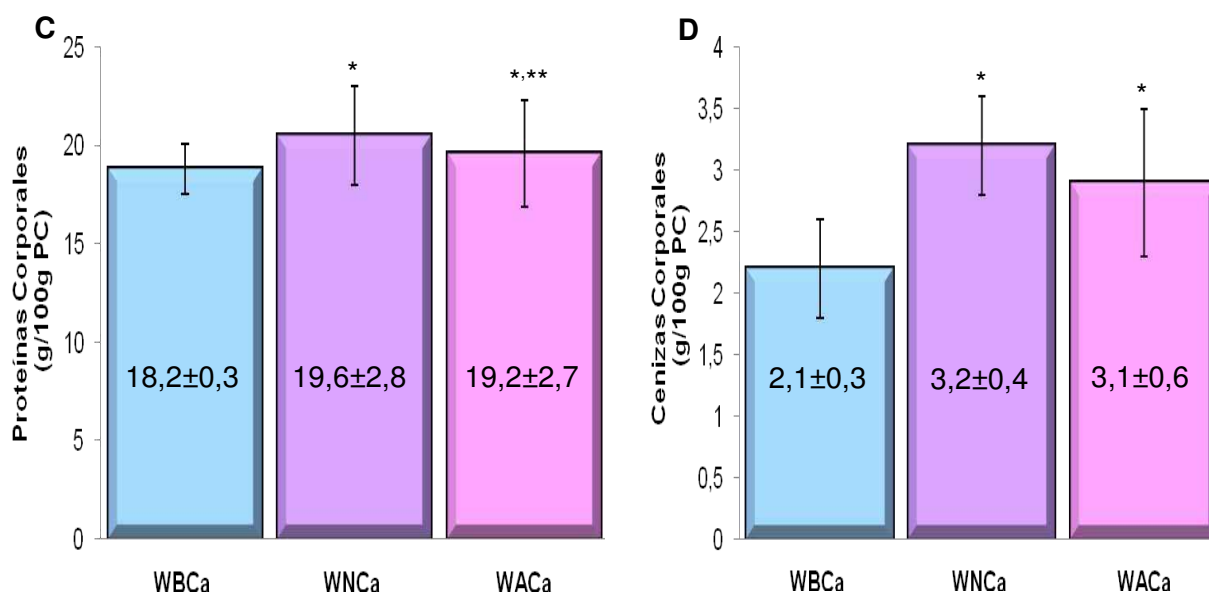
El grupo WBCa mostró el menor contenido de proteínas totales y porcentuales. Mientras que el contenido proteico total sólo alcanzó significancia respecto de WACa ($p < 0.05$), el porcentual fue significativamente menor respecto de WNCa y WACa ($p < 0.05$); asimismo, WNCa presentó una cantidad de proteínas significativamente menor que WACa ($p < 0.01$).

El contenido total de cenizas fue significativamente menor en el grupo WBCa respecto de WNCa y WACa ($p < 0.01$); asimismo, WNCa presentó una cantidad total de cenizas significativamente menor que WACa ($p < 0.01$). El porcentaje de cenizas presentó valores significativamente menores en el grupo WBCa respecto de WNCa y WACa ($p < 0.01$), aunque estos dos grupos no presentaron diferencias significativas entre ellos.



(*): $p < 0.05$ respecto del resto de los grupos.

(*): $p < 0.01$ respecto del resto de los grupos.



(*): $p < 0.05$ respecto de WBCa;
 (**): $p < 0.01$ respecto de WNCa.

(*): $p < 0.01$ respecto de WBCa.

Figura 36.- Composición corporal (g/100g PC) para los tres grupos al final de la experiencia.
 A: Agua; B: Grasa; C: Proteínas; D: Cenizas.

Al graficar los valores individuales de contenido de cenizas respecto de la masa magra de los tres grupos estudiados se obtuvo una correlación significativamente positiva entre ellos ($r = 0.78$ $p < 0.01$); mientras que no se encontró correlación respecto de la masa grasa (Figura 37 A y B).
 Masa magra = PC – contenido total de grasa – contenido total de agua – cenizas totales.

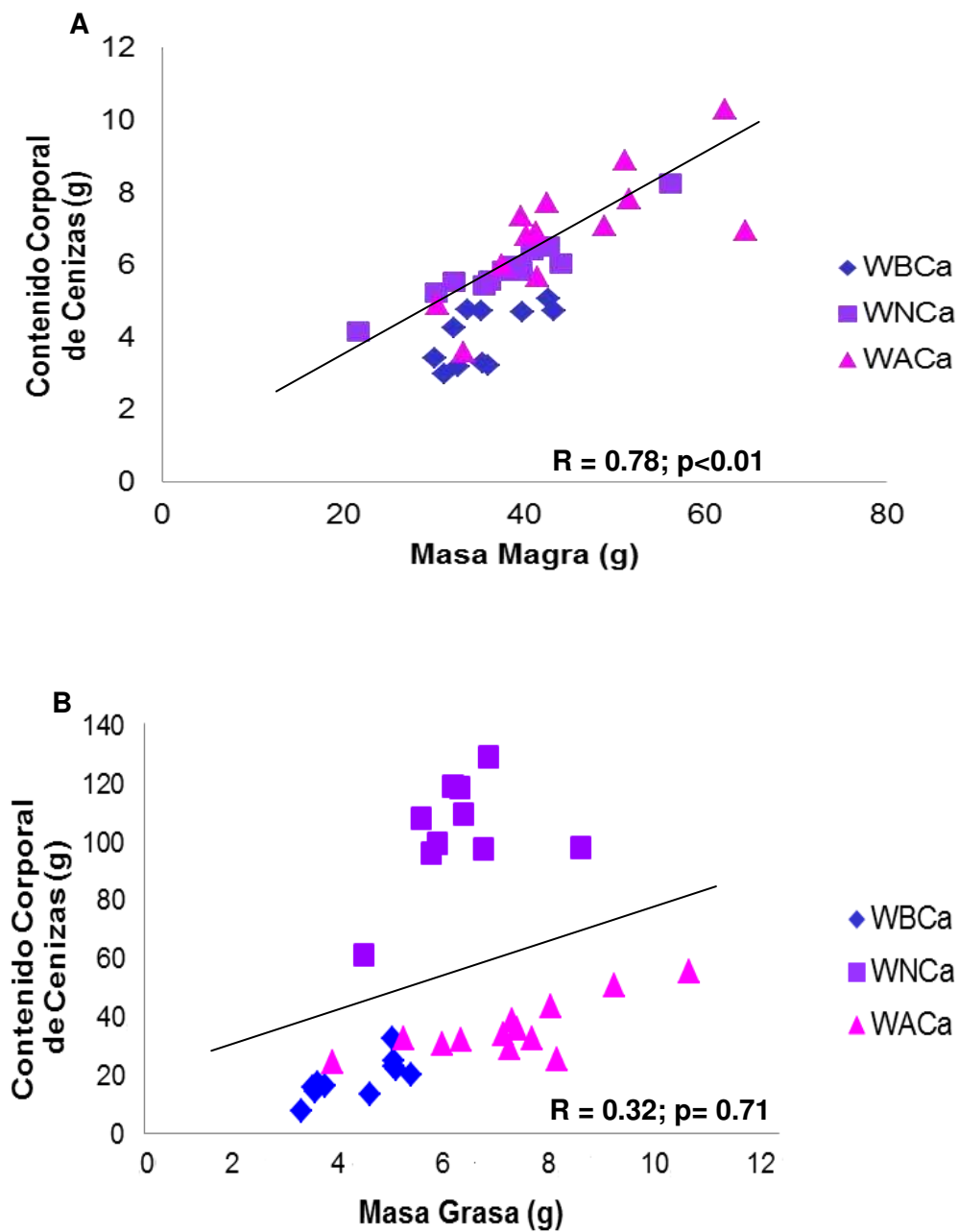


Figura 37.- A: Masa magra vs contenido de cenizas; B: Masa vs contenido de cenizas.

Parámetros relacionados al metabolismo lipídico

Absorción de grasa

La Tabla 24 muestra los resultados de la absorción de grasa durante los últimos tres días de experiencia.

	WBCa	WNCa	WACa
Ingesta de Alimento (g/d)	17,3±2,5	14,3±2,6	19,1±1,4***
Ingesta de Grasas (mg/d)	1211,7±172,4	1004,1±181,2	1337,0±187,3***
Grasa Fecal (mg/d)	2,0±0,6	0,7±0,2*	2,7±0,3**
Absorción de grasa (mg/d)	1191,4±173,7	996,9±179,8	1334,3±203,0***
Absorción de grasa (%)	98,3±1,0	99,3±1,0	99,8±1,0

Tabla 24.- Ingesta de Ca, Ca fecal y urinario y absorción aparente de Ca de los diferentes grupos.
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de ONCa.

Durante el período de balance, el consumo de alimentos y la ingesta de grasas (por ser dietas con el mismo contenido de grasas) presentaron un aumento significativo en el grupo WACa respecto de los otros grupos estudiados ($p < 0.01$); asimismo, existió una tendencia en el grupo WBCa a presentar mayor ingesta que el WNCa ($p = 0.06$), los que no presentaron diferencias entre ellos. La excreción fecal de grasas fue significativamente menor en el grupo WNCa comparado con WBCa y WNCa ($p < 0.01$). La cantidad total de grasa absorbida (mg/d), por haber sido tan pequeña la excreción fecal, mostró un comportamiento similar a la ingesta de grasas. El porcentaje de absorción de grasas no mostró diferencias significativas entre los tres grupos estudiados (p : NS).

Peso del hígado y grasa perigonadal/retroperitoneal

El peso del hígado no presentó diferencias significativas entre los tres grupos estudiados. Tanto la suma total de la grasa perigonadal y retroperitoneal como el porcentaje de dicha suma fueron significativamente mayores en el grupo WACa respecto de los otros dos ($p < 0.01$), entre los cuales no se observaron diferencias significativas (Tabla 25).

	WBCa	WNCa	WACa
Peso del Hígado (g)	8,2±0,8	7,9±0,5	8,7±0,5
Grasa Perig. + Retrop. (g)	2,3±1,0	2,4±1,0	5,4±1,4*,**
% Grasa (Perig.+Retrop.)/PC	1,3±0,4	1,3±0,4	2,6±0,5*,**

Tabla 25.- Peso del hígado y suma de grasa perigonadal y retroperitoneal (g y %) para los grupos estudiados.

(*): $p < 0.01$ respecto de WBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de WNCa.

Determinaciones Bioquímicas

Los niveles séricos de Col T presentaron un valor significativamente menor en el grupo WNCa respecto de los otros dos ($p < 0.01$), los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos. Los niveles de HDL-Col no mostraron valores significativamente diferentes entre los tres grupos estudiados, aunque existió una tendencia a ser mayor en el grupo WBCa respecto de los otros dos grupos ($p = 0.060$). El Col no-HDL no presentó diferencias entre los tres grupos estudiados. Los niveles de TGL mostraron un aumento significativo a medida que aumentó la ICa ($WBCa < WNCa < WACa$; $p < 0.01$) (Tabla 26).

	WBCa	WNCa	WACa
Col T (mg/dl)	67,1±18,2	48,4±25,6*	68,9±16,7**
HDL-Col (mg/dl)	33,0±6,3	28,0±10,4	28,5±6,1
Col no-HDL (mg/dl)	37,4±12,1	31,9±14,7	30,4±19,8
TGL (mg/dl)	75,8±26,2	89,4±39,5*	123,1±55,2***

Tabla 26.- Perfil lipídico de los diferentes grupos estudiados.
(*): $p < 0.01$ respecto de WBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de WNCa.

Parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa

Los niveles de glucosa del grupo WACa fueron significativamente mayores que en WNCa ($p < 0.01$) y que en WBCa, sin alcanzar significancia; asimismo los niveles de glucosa del grupo WBCa fueron significativamente mayores que los del grupo WNCa ($p < 0.01$). Los niveles de insulina fueron significativamente mayores en el grupo WBCa respecto de los otros dos grupos estudiados ($p < 0.01$); similarmente, el grupo WACa presentó niveles de insulina significativamente mayores que el grupo WNCa ($p < 0.01$).

Como resultado de los niveles de glucosa e insulina, se observó un HOMA-IR significativamente mayor en el grupo WBCa respecto de los otros dos grupos ($p < 0.01$) y un nivel significativamente mayor del grupo WACa respecto del WACa ($p < 0.01$) (Tabla 27).

	WBCa	WNCa	WACa
Glucosa (mg/dl)	190,6±35,3	98,7±41,2*	206,7±50,7*,**
Insulina (ng/dl)	1,3±0,9	0,1±0,0*	0,4±0,1*,**
HOMA-IR	12,2±0,9	0,5±0,1*	3,7±1,8*,**

Tabla 27.- Niveles de glucosa e insulina, e índice de resistencia a la insulina de los grupos estudiados.

(*): $p < 0.01$ respecto de WBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de WNCa.

Absorción y Balance de Ca

La ICa durante el período de balance mostró un aumento significativo a medida que aumentó el contenido de Ca de la dieta (WBCa<WNCa<WACa; $p < 0.01$). Datos similares se obtuvieron para la excreción fecal y urinaria (WBCa<WNCa<WACa; $p < 0.01$).

La absorción aparente de Ca % mostró una disminución significativa a medida que aumentó el contenido de Ca de la dieta (WBCa<WNCa<WACa; $p < 0.01$).

Tanto el balance aparente de Ca (B) (mg/d) como la absorción aparente de Ca (A) (m/d) totales correlacionaron en forma directamente significativa con el contenido de Ca de las dietas (WBCa<WNCa<WACa; $p < 0.01$) (Tabla 28).

	WBCa	WNCa	WACa
Ingesta de Ca (mg/d)	25,4±1,6	107,0±1,3*	219,1±1,4*,**
Ca Fecal (mg/d)	4,0±1,2	25,5±8,0*	88,1±16,1*,**
Ca Urinario (mg/d)	0,6±0,2	1,2±0,4*	1,6±0,4*,**
Absorción Aparente de Ca (mg/d)	18,4±5,0	66,6±9,4*	128,6±19,8*,**
% Absorción de Ca	81,7±5,8	71,7±10,7*	59,3±7,9*,**
Balance Aparente de Ca (mg/d)	18,0±5,0	65,9±29,4*	127,4±19,4*,**

Tabla 28.- Ingesta de Ca, Ca fecal y urinario y absorción aparente de Ca de los diferentes grupos.

(*): $p < 0.01$ respecto de WBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de WNCa.

Cuando se graficó el BCa (mg/d) vs la ICa (mg/d) se observó una relación positiva que alcanzó una meseta a valores de ICa cercanos a 200mg/d ($p < 0.001$) (Figura 38).

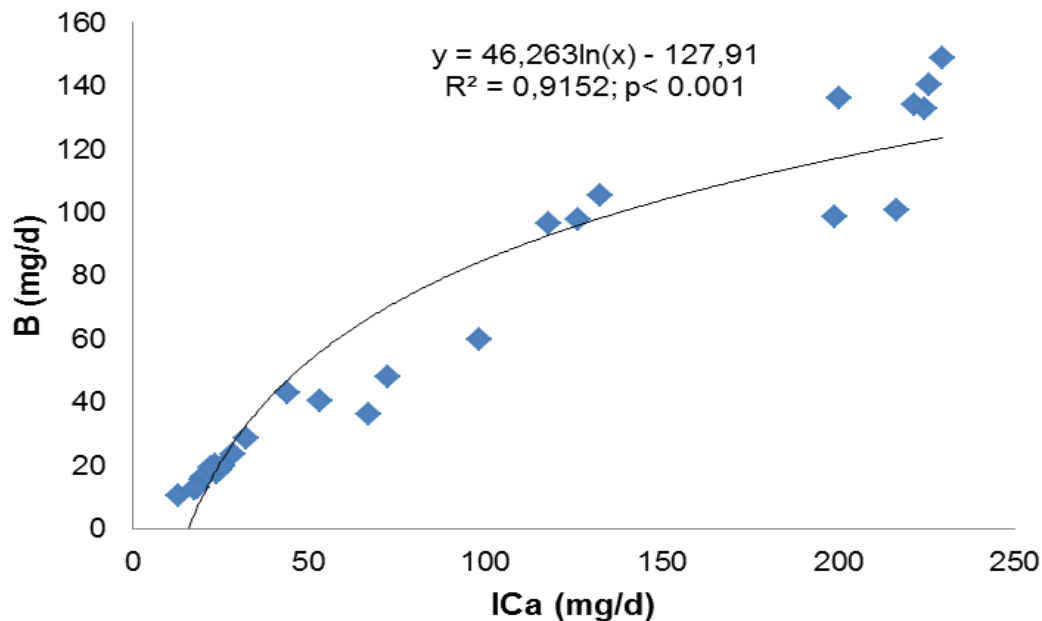
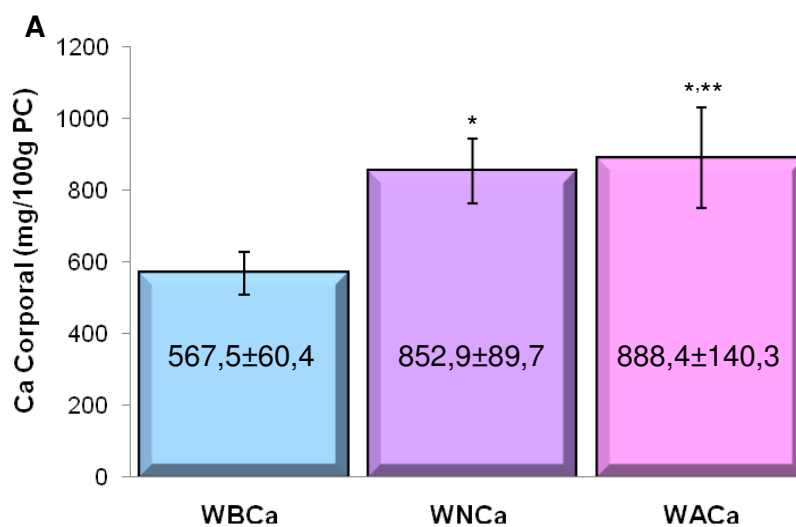


Figura 38.- Balance vs Ingesta para los tres grupos estudiados.

Retención corporal de Ca y P

Los contenidos corporales de Ca y P, tanto totales como normalizados por PC, mostraron un aumento significativo con el aumento de contenido de Ca dietario (WBCa < WNCa < WACa; $p < 0.01$) (Tabla 29 y Figura 39 A y B).



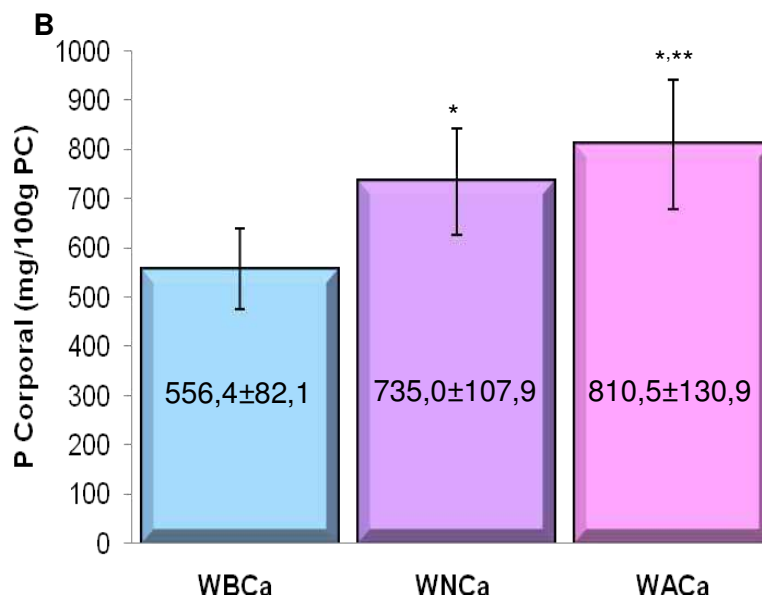


Figura 39.- Ca (A) y P (B) corporales de los diferentes grupos estudiados.
 (*): $p < 0.01$ respecto de WBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de WNCa.

La relación Ca/P mostró valores significativamente mayores en el grupo WNCa, el cual sólo presentó significancia respecto del grupo WBCa ($p < 0.01$); asimismo, el grupo WACa presentó valores significativamente mayores que el grupo WBCa ($p < 0.01$) (Tabla 29).

	WBCa	WNCa	WACa
Ca Corporal Total (mg/rata)	1093,2±258,2	1557,2±328,2*	1916,6±316,2*.**
P Corporal Total (mg/rata)	1162,3±217,1	1344,0±323,8*	1747,7±273,9*.**
Relación Ca/P	0,92±0,10	1,17±0,12*	1,10±0,13*

Tabla 29.- Contenidos corporales de Ca y P, y balance de Ca para los distintos grupos.
 (*): $p < 0.01$ respecto de WBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de WNCa.

Parámetros Densitométricos

El CMO normalizado por PC (g/100g PC) fue significativamente menor en el grupo WBCa comparado tanto respecto de WNCa como respecto de WACa ($p < 0.01$); los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos.

La DMO de esqueleto total no mostró diferencias significativas entre los grupos.

La DMO_{tp} fue mayor en el grupo WNCa respecto de los otros dos grupos ($p < 0.01$); asimismo, el grupo WBCa presentó valores significativamente mayores que WACa. Los valores de DMO_{col} fueron significativamente mayores en el grupo WACa respecto de los otros dos grupos ($p < 0.01$), los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos (Tabla 30).

	WBCa	WNCa	WACa
CMO/PC de Esqueleto Total (g/100g PC)	0,7±0,3	1,5±0,3*	1,34±0,2*
DMO de Esqueleto Total (mg/cm²)	238,0±14,8	229,3±5,4	234,3±5,7
DMO de Tibia Proximal (mg/cm²)	165,0±7,0	180,0±11,0*	136,0±13,0***
DMO de Columna Lumbar (mg/cm²)	97,0±12,0	128,0±17,0	103,0±11,0***

Tabla 30.- Parámetros densitométricos al final de la experiencia.
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa; (**): $p < 0.01$ respecto de ONCa.

Parámetros bioquímicos relacionados al metabolismo fosfocálcico y óseo

En la Tabla 31 se presentan los valores de los parámetros séricos obtenidos para los diferentes grupos.

	WBCa	WNCa	WACa
Cas (mg/dl)	8,4±0,7	8,3±0,8	9,1±0,3*
Ps (mg/dl)	9,2±0,5*	8,2±1,0	8,2±1,1
FAO (UI/L)	81,0±9,0	71,0±6,0*	80,0±9,0
BGP (ng/ml)	1051,0±187,0	840,0±106,0**	742,0±187,0***,***
CTXs (ng/ml)	90,0±10,0	94,0±6,0	123,0±32,0*
25OHD (ng/ml)	13,9±2,2	12,4±2,8	18,5±1,0***

Tabla 31.- Parámetros bioquímicos para los diferentes grupos.
(*): $p < 0.05$ respecto del resto de los grupos; (**): $p < 0.01$ respecto de WBCa; (***): $p < 0.01$ respecto de WNCa.

Los niveles de Ca sérico fueron significativamente mayores en el grupo WACa respecto de los otros dos grupos ($p < 0.05$), los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos. El P sérico fue significativamente mayor en el grupo WBCa al compararlo con los otros dos grupos ($p < 0.05$), los cuales no presentaron diferencias entre ellos.

El grupo WNCa presentó niveles de FAO significativamente menores respecto de los otros dos grupos ($p < 0.05$), los que no presentaron diferencias significativas entre ellos. Los niveles de BGP presentaron una relación inversa y significativa respecto de la ICa ($WACa < WNCa < WBCa$; $p < 0.01$).

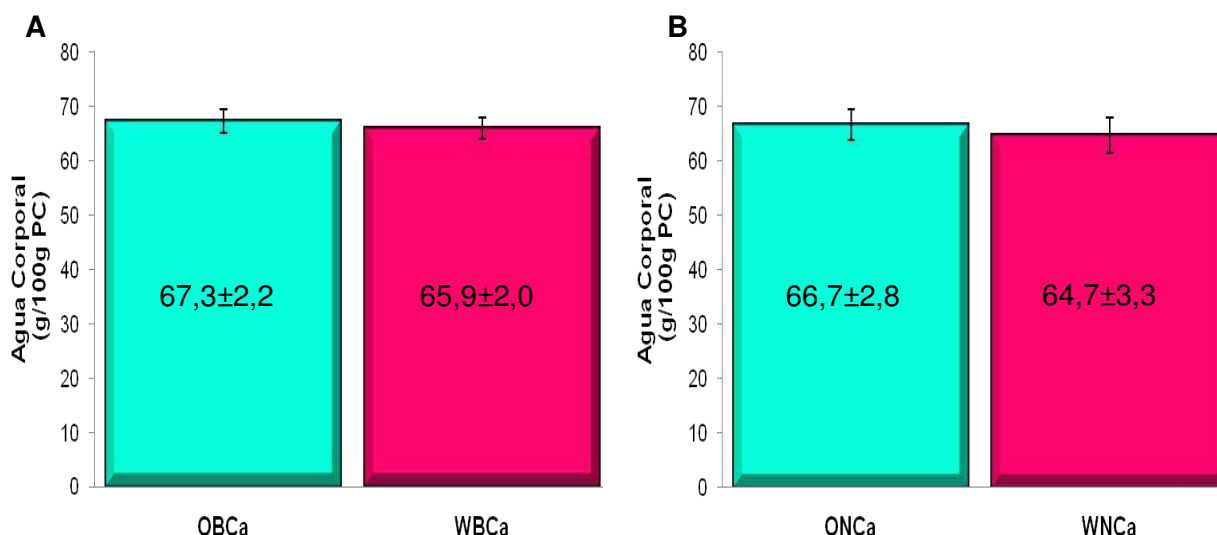
Los niveles de CTXs fueron significativamente mayores en el grupo WACa al compararlo con los otros dos grupos ($p < 0.05$), los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos.

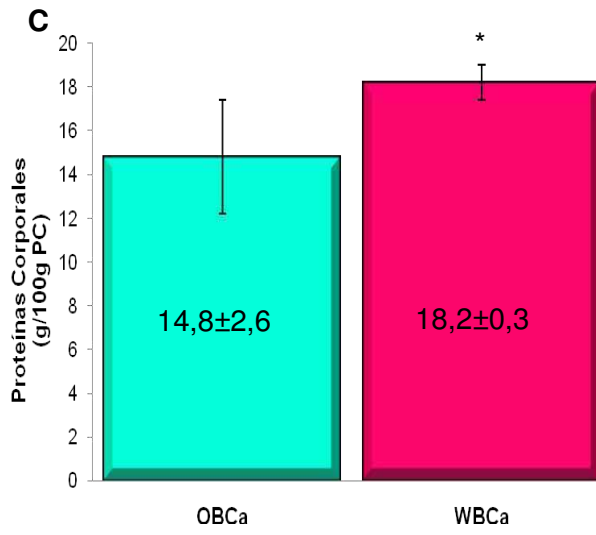
Los niveles de 25OHD fueron significativamente mayores en el grupo WACa comparado con los otros dos grupos ($p < 0.01$), los que no presentaron diferencias entre ellos.

3- Comparación entre ratas Obesas (O) y Wistar (W) alimentadas con niveles de Ca bajo y normal al final de la experiencia

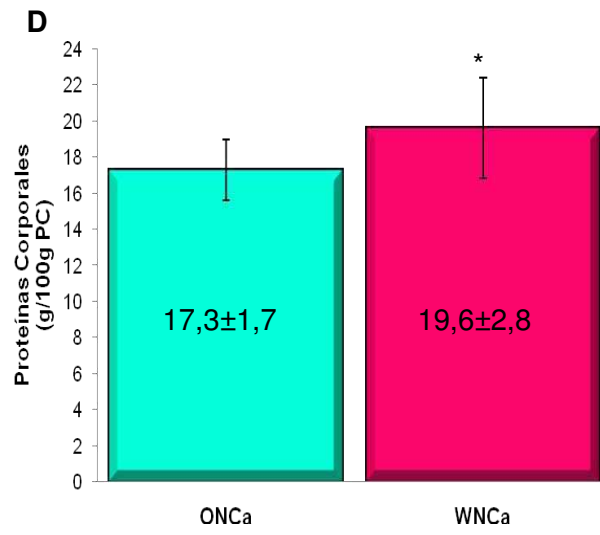
Composición Corporal

Los resultados de las composiciones corporales se muestran en la Figura 40 A-F.

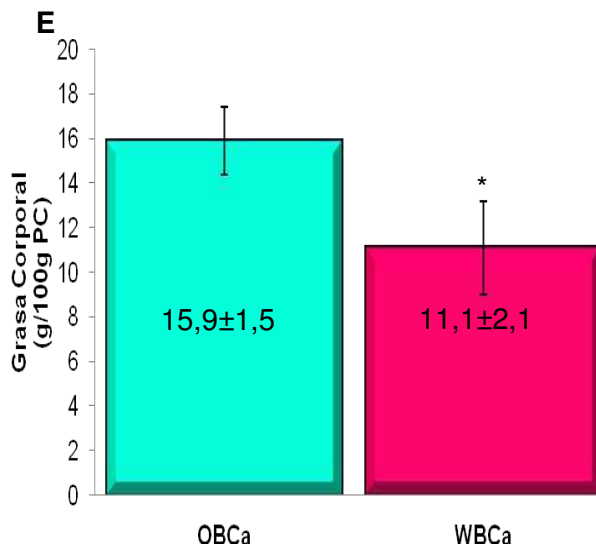




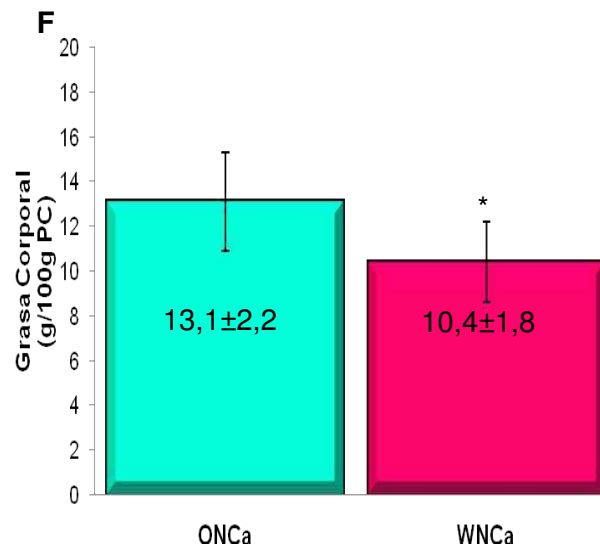
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa.



(*) $p < 0.01$ respecto de ONCa.



(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa.



(*) $p < 0.01$ respecto de ONCa.

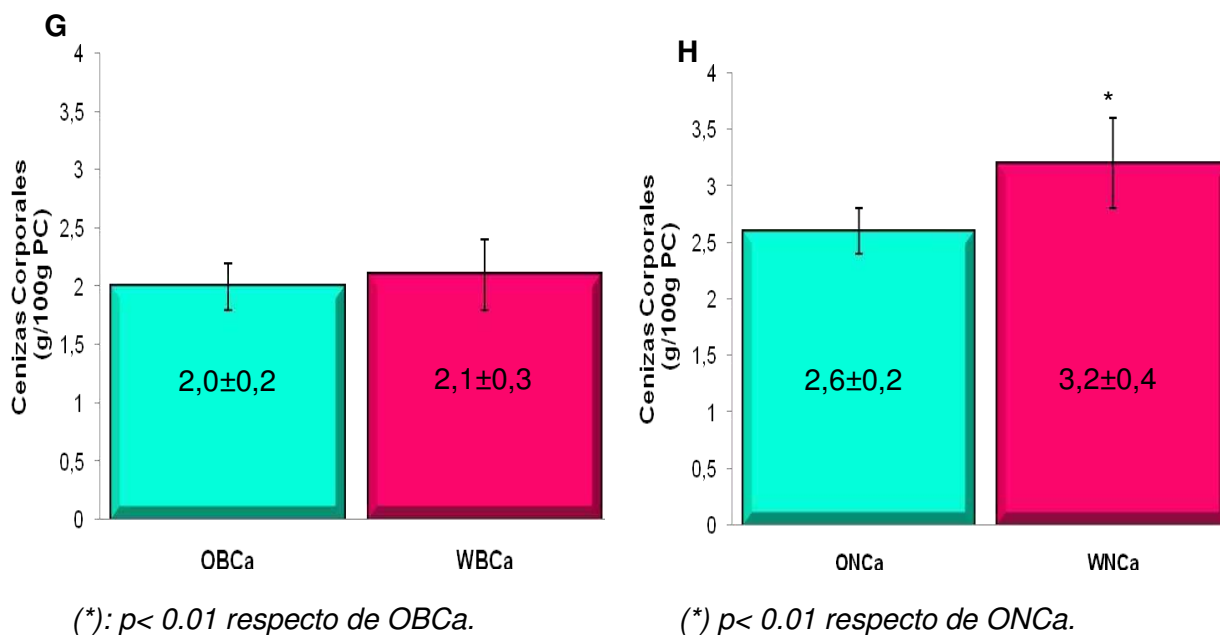


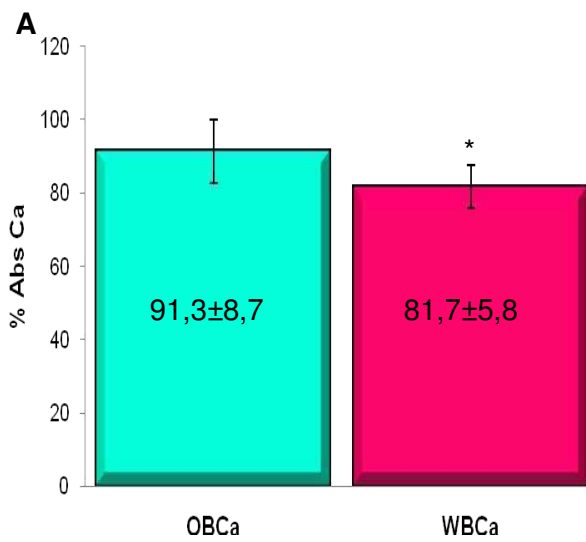
Figura 40-. Composición corporal porcentual para los grupos BCa y NCa al final de la experiencia. A y B: Agua; C y D: Proteínas; D y E: Grasa, F y G: Cenizas.

Cuando los resultados se analizaron para una misma cantidad de Ca en la dieta consumida se observó que en los grupos BCa el porcentaje de agua y cenizas no mostró diferencias significativas entre las ratas obesas y Wistar; sin embargo, el porcentaje de grasa fue mayor y el de proteínas menor en los animales O respecto de los W ($p < 0.01$).

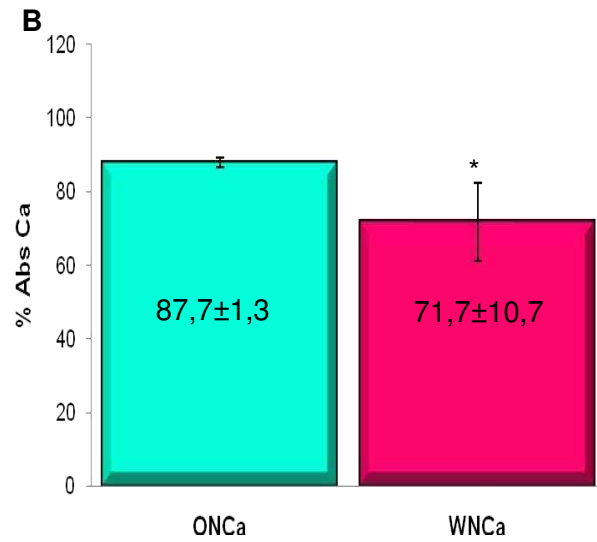
Respecto de los grupos alimentados con la dieta NCa, no se observaron diferencias en el porcentaje de agua; el porcentaje de proteínas y cenizas fue mayor, y el de grasa fue menor en los animales W respecto de los O.

Absorción y retención de Ca

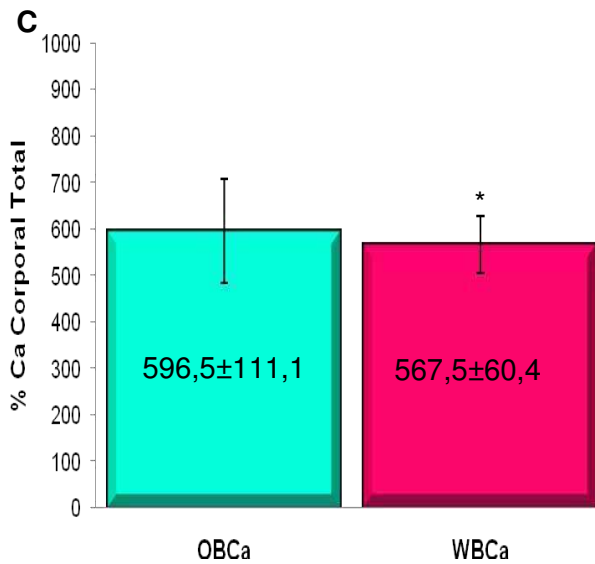
El porcentaje de absorción de Ca y de contenido corporal de Ca para los animales O y W se muestran en la Figura 41.



(*): $p < 0.05$ respecto de OBCa.



(*): $p < 0.05$ respecto de OBCa.



(*): $p < 0.05$ respecto de OBCa.

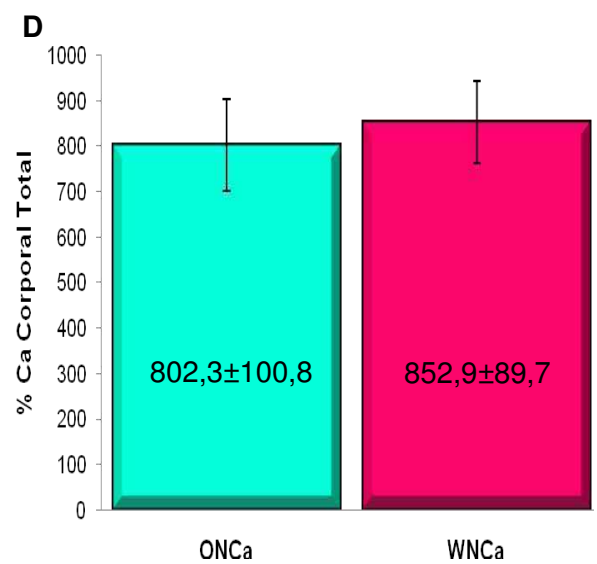


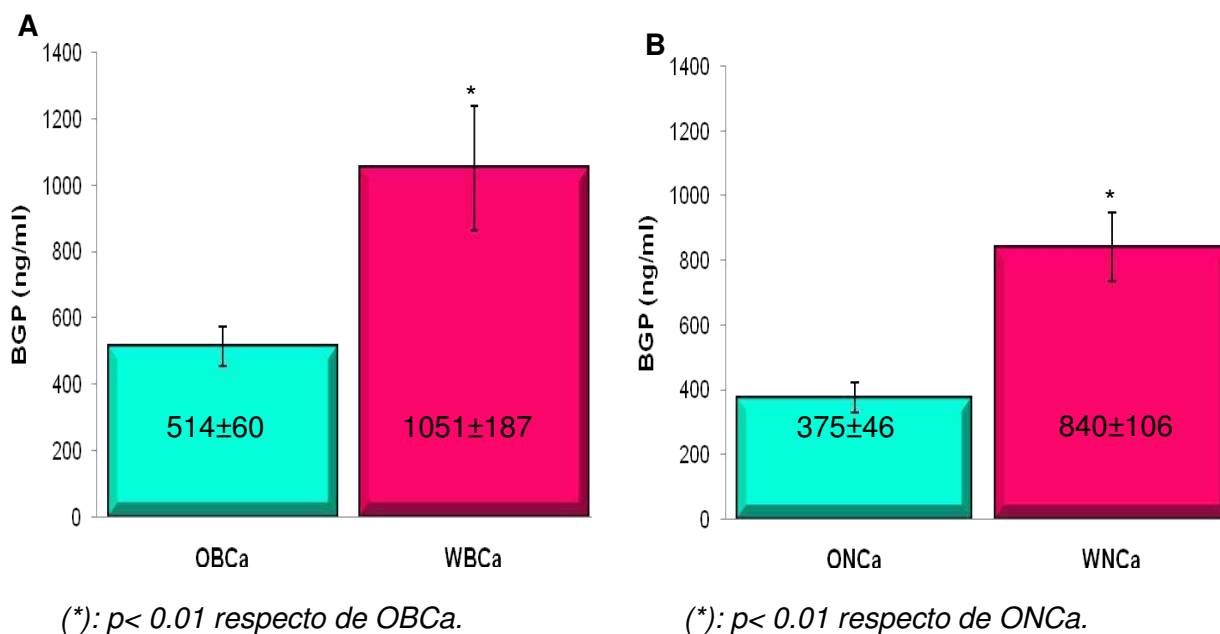
Figura 41.- A y B: % de absorción de Ca; C y D: % de Ca corporal total.

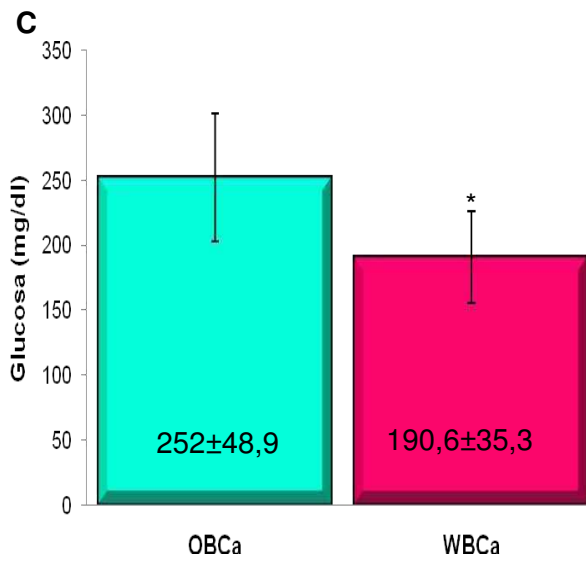
Cuando se analizaron los resultados por el nivel de Ca en la dieta se observó que, en los animales que consumieron BCa, el porcentaje de absorción y la cantidad corporal de Ca fueron significativamente menores en los animales W respecto de los O ($p < 0.05$).

En los grupos que consumieron el nivel normal de Ca, se observó que si bien el porcentaje de absorción de Ca fue significativamente menor ($p < 0.05$), la retención de Ca tendió a ser mayor en los grupos W que en los O.

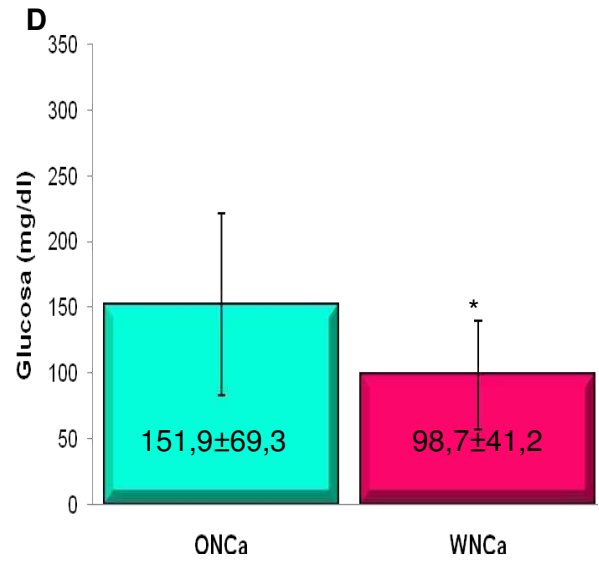
Interrelación entre el metabolismo óseo e indicadores del metabolismo energético

Los gráficos de la Figura 42 (A-N) muestran los niveles de BGP, glucosa, insulina, HOMA-IR, grasa corporal total, HDL-Col y CTX de los grupos alimentados con BCa y NCa.

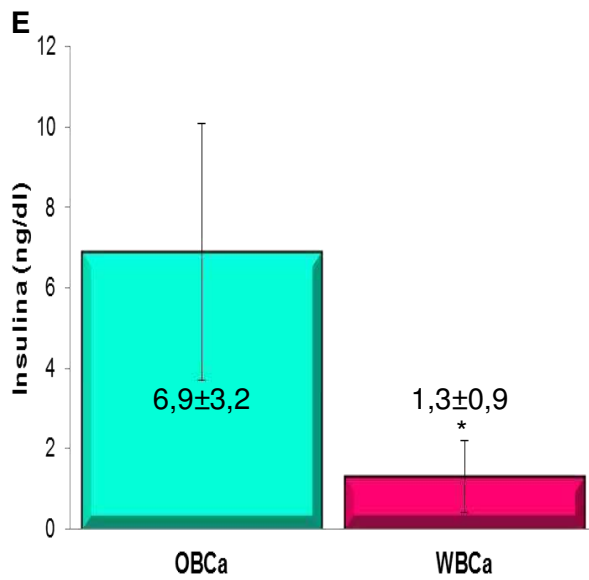




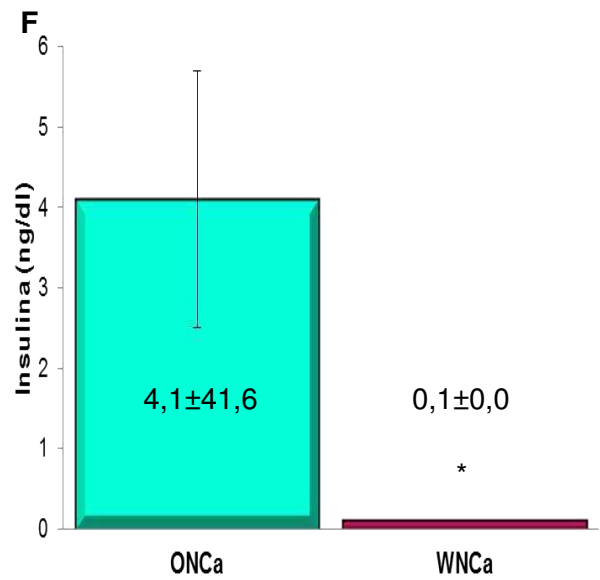
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa.



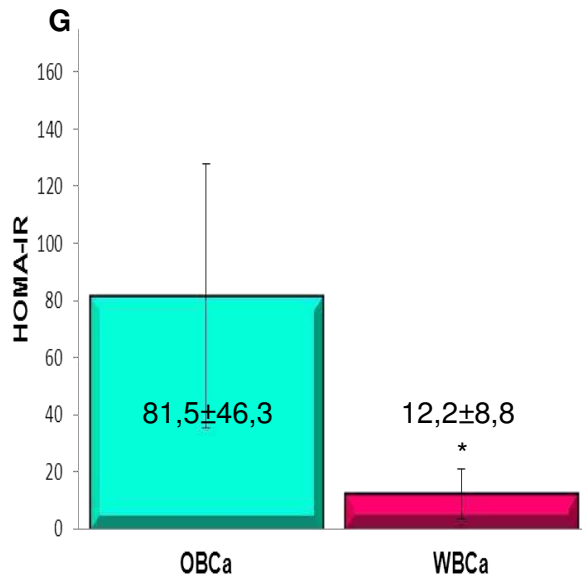
(*): $p < 0.01$ respecto de ONCa.



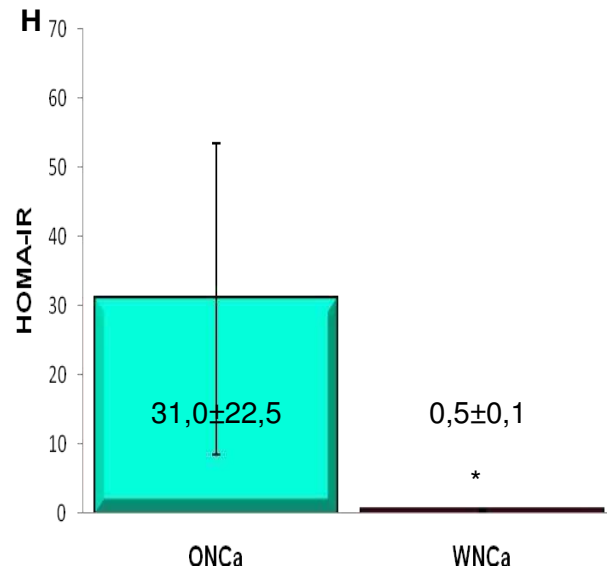
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa.



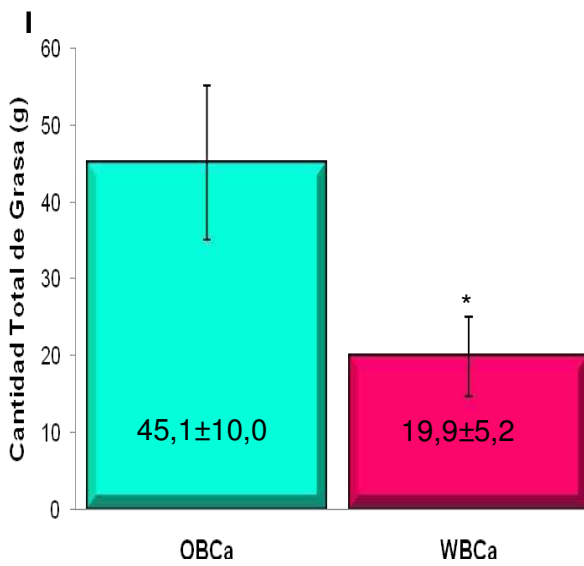
(*): $p < 0.01$ respecto de ONCa.



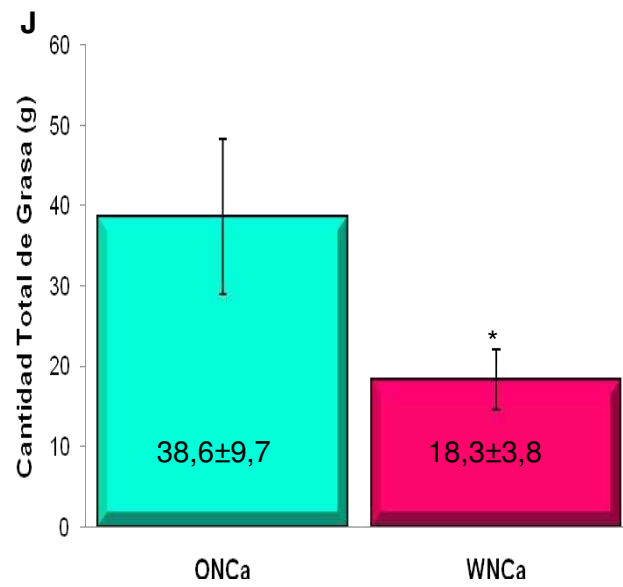
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa.



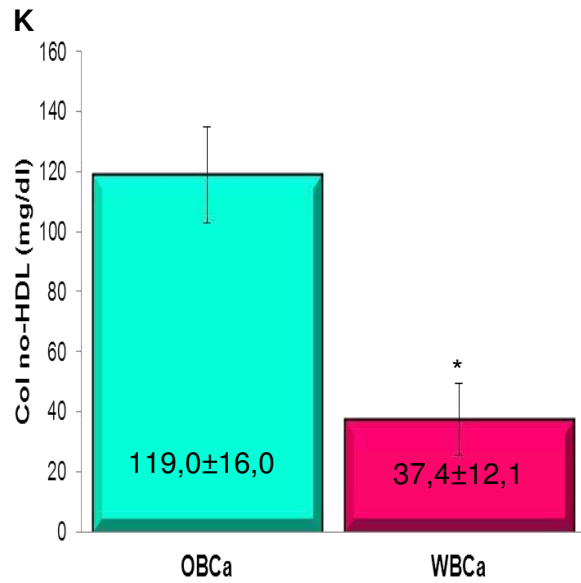
(*): $p < 0.01$ respecto de ONCa.



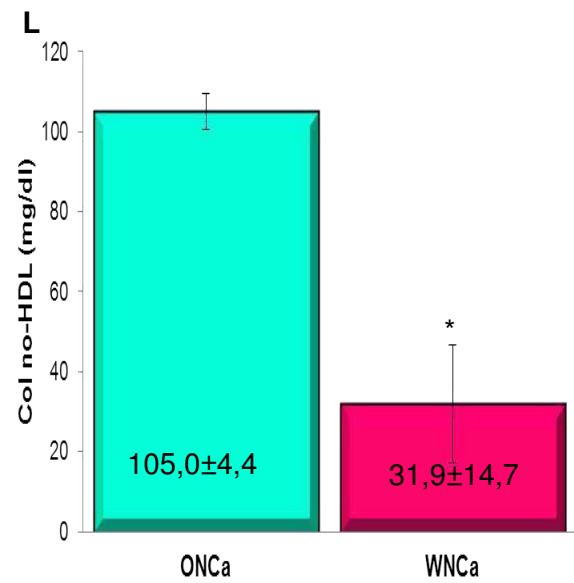
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa.



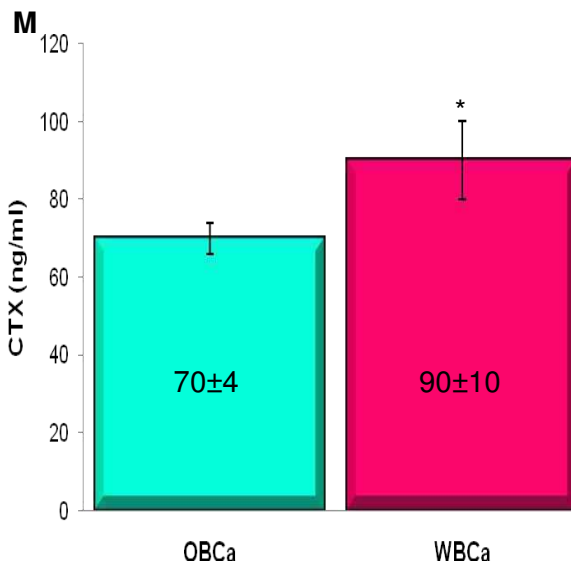
(*): $p < 0.01$ respecto de ONCa.



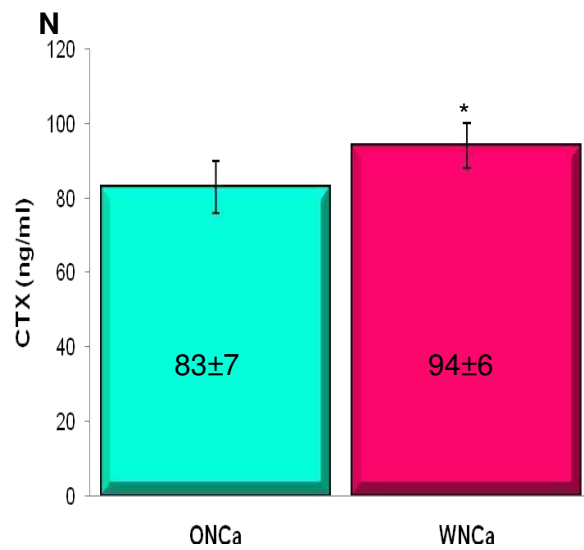
(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa.



(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa.



(*): $p < 0.01$ respecto de OBCa.



(*): $p < 0.01$ respecto de ONCa.

Figura 42.- Niveles de A y B: BGP, C y D: Glucosa, E y F: Insulina, G y H: HOMA-IR, I y J: Grasa corporal total, K y L: Col no - HDL y M y N: CTX para las ratas obesas y las ratas Wistar.

Los niveles de BGP mostraron una relación inversa con los de glucosa, insulina, HOMA-IR, Col no-HDL y cantidad total de grasa corporal, y una relación directa con los niveles de CTX tanto en el BCa como en el NCa, para ambas cepas estudiadas ($p < 0.01$).

Cuando se compararon los parámetros de acuerdo al contenido de Ca en la dieta entre O y W se observó que los niveles de BGP y CTX fueron significativamente mayores y los de glucosa, insulina, HOMA-IR, Col no-HDL y cantidad de grasa corporal significativamente menores en los animales WBCa comparados con los animales OBCa ($p < 0.01$). En los animales alimentados con la dieta NCa se observaron los mismos resultados.

Los niveles de insulina y HOMA-IR mostraron una relación inversa con los niveles de CTX ($p < 0.01$).

DISCUSIÓN

Además del bien establecido rol del Ca sobre el metabolismo óseo y mineral, recientemente ha surgido un interés considerable en la hipótesis de que la ICa modularía los depósitos de grasa, un componente importante del PC total. Los resultados del presente estudio sugieren que, en este último caso, sólo los depósitos de grasa de los animales propensos a padecer obesidad serían afectados por la baja ICa. Asimismo, los resultados muestran que la relación Ca/P dietaria también sería un factor que influye en la composición corporal, independientemente de la propensión a padecer o no obesidad.

Ratas obesas

Dado que las ratas obesas de la cepa IIMb/ β desarrollan obesidad y diabetes tipo II a partir de la etapa puberal, sin importar la ingesta energética, estos animales son un modelo interesante y adecuado para estudiar la interrelación entre obesidad e ingesta dietaria de Ca durante el período de crecimiento.

Impacto sobre la composición corporal

Los resultados obtenidos sugieren que, durante la etapa de crecimiento acelerado de machos de la cepa IIMb/ β , el Ca dietario jugaría un rol importante en la modulación del PC, tal y como se demostrara previamente en ratones transgénicos y “wild type” (Bruckbauer A y col., 2009). Sin embargo, la deficiencia relativa de P, como es aquella producida por un alto contenido de Ca en la dieta, también ejercería un rol en la modificación de la composición corporal.

De acuerdo a los resultados del presente estudio, las ratas alimentadas con la dieta isocalórica BCa exhibieron un aumento significativo de la ganancia de PC, producto de un mayor porcentaje de depósito graso y una disminución en el contenido porcentual de proteínas. Este efecto podría ser atribuido a que los animales alimentados con la dieta BCa presentaron, fundamentalmente al inicio de la experiencia, una mayor ingesta de alimentos; sin embargo este no es el caso, ya que la eficiencia en el consumo de alimentos fue similar en los tres grupos estudiados. Previamente, Zhang Q y col. realizaron un estudio en ratas *Sprague-Dawley* a las que se les permitió elegir entre pares de dietas de energía normal con diferentes niveles de Ca; en dicho estudio, al igual que en el presente, los autores observaron una mayor ingesta de dieta en las ratas alimentadas con el menor contenido de Ca (Zhang Q y col., 2004).

Cabe mencionar que, si bien las diferencias en la composición corporal por el consumo de diferentes dietas comenzaron a evidenciarse al destete, podrían haber existido previamente, durante el período de lactancia. En efecto, las madres recibieron las dietas desde la preñez, y es sabido que las crías comienzan a consumir dieta mixta (leche + alimento sólido) aproximadamente durante la última semana previa al destete (14-17 días de vida) (*Henning SJ, 1981*). Respecto de este punto, es importante tener en cuenta que en un estudio previo se demostró que la composición láctea de las ratas madre de la cepa Wistar no se veía afectada por el consumo de dietas isocalóricas con diferente contenido de Ca (*Weisstaub A y col., 2003*). Dicho estudio demostró además que las ingestas maternas de Ca diferentes durante la preñez no afectaban el tamaño o el PC de las crías al nacimiento (*Zeni SN y col, 2003*), situación esta última que volvió a evidenciarse en la presente investigación. En base a esos resultados previos y a los del presente estudio se podría inferir que las modificaciones en la composición corporal de esta cepa de ratas sería producto de la ingesta de dieta sólida con diferente aporte de Ca.

A pesar de que en los tres grupos estudiados la eficiencia en el consumo fue similar, el porcentaje corporal de proteínas fue menor en el grupo OBCa. En este sentido, se debe tener en cuenta que, si bien los procesos de acumulación de masa grasa y masa magra tienen costos energéticos similares, la masa magra por kg es metabólicamente más activa y requiere mayor utilización energética que la masa grasa. En consecuencia, la menor cantidad de proteínas del grupo OBCa, que ya había comenzado a evidenciarse al destete, habría aumentado la disponibilidad energética para ser acumulada en los depósitos grasos corporales (*Siddiqui SM y col., 2008*). Contrariamente, en los animales normocálcicos la energía de los depósitos de grasa se desviaría hacia la síntesis proteica, con el consecuente aumento del contenido porcentual de masa magra.

Es conocido que la ingesta diaria de alimentos disminuye cuando la dieta es poco palatable. De acuerdo a estudios previos, el aumento en el contenido dietario de Ca como cloruro de Ca es uno de los factores implicados en dicha disminución. En el presente estudio no se observó aversión a la comida, ya que no existieron diferencias en la ingesta de alimento entre las ratas alimentadas con dietas isocalóricas conteniendo los niveles recomendados (0.5%) o moderadamente elevados (0.9%) de Ca. Una explicación podría ser que el mayor aporte de Ca no fue realizado en forma de cloruro, que le confiere cierta amargura a la comida, sino mediante el agregado de carbonato de Ca. Un punto importante a señalar es que, a pesar de que no existieron diferencias en la ingesta de alimentos y eficiencia energética, el grupo que consumió la dieta con 0.9% de Ca mostró una tendencia a presentar menor contenido de grasa y ganancia de PC que el grupo alimentado con la

ingesta recomendada de Ca. Para poder comprender este hallazgo se debe tener en cuenta que la relación inversa entre ICa y ganancia de PC es un punto controversial.

Se han propuesto varios mecanismos que contribuirían potencial y parcialmente a explicar el impacto total del Ca dietario sobre el PC o la masa grasa corporal. Una hipótesis sugerida es que los niveles de Ca dietario podrían afectar el apetito y la ingesta de alimento. Con respecto a eso, los mamíferos podrían haber evolucionado para responder a componentes nutricionales específicos que actuarían como indicadores de disponibilidad dietaria de manera que, cuando la comida es abundante, un nutriente presente en la misma actuaría como una señal para reducir la acumulación de masa grasa corporal (*Teegarden D y col., 2008*). Contrariamente, como se observa en este estudio, el bajo nivel dietario de Ca durante un período de alta tasa de crecimiento serviría como indicador para promover la ingesta, protegiendo así al cuerpo contra tal deficiencia. Este mecanismo es concordante con lo observado en el presente estudio, ya que la ingesta de los animales obesos alimentados con bajo contenido dietario de Ca fue mayor, principalmente durante las primeras dos semanas de experiencia, ya que durante la última semana no se observaron diferencias en el consumo de dieta.

Otro mecanismo propuesto es la disminución en la disponibilidad de energía cuando el Ca y la grasa son provistos conjuntamente. En general se propone que la alta ICa aumenta la excreción fecal de grasa, presumiblemente a través de la formación de jabones insolubles de Ca con ácidos grasos en el intestino o a través de la acción de los ácidos biliares, los cuales disminuyen la formación de micelas. En el presente estudio, si bien hacia el final de la experiencia, durante el período de balance, no se observaron diferencias en el consumo de alimentos y, por ende, en la ingesta de grasas ni en el %A de las mismas, la excreción fecal de grasa aumentó con el contenido de Ca de la dieta. Aunque los cambios observados en la excreción de grasa no modificaron el %A, la menor excreción fecal podría haber inducido en el grupo OBCa un leve incremento en la disponibilidad de grasa el cual, a lo largo de la experiencia, contribuiría al aumento observado en el depósito de tejido adiposo. Por otra parte, el peso del hígado mostró una relación inversa con el Ca de la dieta, lo que sugeriría un mayor grado de lipogénesis en el grupo OBCa que favorecería el mayor contenido de grasa corporal. Este punto se vería reflejado en el incremento de tejido adiposo perigonadal y retroperitoneal y la suma de ambos expresada como porcentaje del PC.

Cuando la grasa es absorbida, entra en la circulación sanguínea en forma de lipoproteínas ricas en TGL derivadas del intestino (quilomicrones) (*Lorenzen JK y col., 2007*). Por lo tanto, si el mayor aporte de Ca inhibe parcialmente la absorción de grasa, se esperaría una disminución de TGL circulantes; contrariamente, sus niveles aumentarían con una dieta que aporta baja cantidad de

Ca. En concordancia con esta hipótesis, en el presente estudio, y aunque todas las ratas obesas de la cepa ensayada desarrollan hipertriacilgliceridemia espontáneamente, los mayores niveles de TGL sanguíneos fueron observados en el grupo OBCa.

En el presente estudio, además de exhibir los niveles de TGL más elevados, el grupo OBCa mostró los mayores niveles de glucosa e insulina en ayunas, de la relación insulina/glucosa y del HOMA-IR. Si bien la cepa de ratas obesas utilizadas desarrolla hipertriacilgliceridemia y resistencia a la insulina de manera espontánea luego de la etapa puberal, ambos factores aumentaron en forma inversa al contenido de Ca de la dieta, concomitantemente a lo observado con el aumento en la ganancia de PC y depósito graso. El hiperinsulinismo y la resistencia a la insulina son característicos de la obesidad, consistentes con una disminución en el número o en la actividad del receptor de insulina o debidas a defectos intracelulares post unión al receptor. El incremento en la relación insulina/glucosa o en el HOMA-IR refleja un aumento en la resistencia a la insulina inducida por el depósito graso el cual, de acuerdo con la severidad de la obesidad y el aumento de hipertriacilgliceridemia, podría contribuir a una mayor síntesis y almacenamiento de tejido adiposo (*Koyama K y col., 1997*).

La correlación negativa observada entre la ICa y los cambios en el PC o en el contenido de lípidos corporales del presente estudio está en concordancia con varios reportes previos (*Zemel MB y col., 2004; Jackmain M y col., 2003; Parra P y col., 2008; Shi H y col., 2001 y Papakonstantinou E y col., 2003*), pero no con todos (*Zhang Q y col., 2004*) los que analizaron el efecto potencial del Ca sobre la grasa corporal. El efecto antiobesidad del Ca fue demostrado en ratones transgénicos que expresan el gen “agouti” en adipocitos, susceptibles a dietas que inducen obesidad (*Xiaocun S y col., 2004*). Dichos ratones no son obesos si se los alimenta según AIN’93 (*Reeves PG y col., 1993*). Sin embargo, si se los alimenta con dietas bajas en Ca (0.4%) y altos niveles de sacarosa y lípidos, presentan acelerado aumento de peso y contenido de grasa corporal (fundamentalmente abdominal, perirrenal, epididimal y subescapular). Si la dieta aporta 1.2% de Ca, se inhibe marcadamente la lipogénesis, se acelera la lipólisis y se aumenta la termogénesis, suprimiendo el aumento de peso y grasa corporal.

El mecanismo biológico de la baja ingesta de Ca propuesto está relacionado con la pérdida de energía, ya sea a través del aumento en la expresión de proteínas desacoplantes (UCP) o en la oxidación lipídica (*Parra P y col., 2008*). Adicionalmente, el mecanismo podría involucrar la estimulación en la expresión y actividad de la enzima ácido graso sintetasa (AGS), necesaria para la lipogénesis “de novo”, por medio de la proteína producto del gen “agouti” (similar al gen asociado a la obesidad humana). Se debe tener en cuenta que la porción C-terminal de dicha proteína presenta una estructura tridimensional que funciona como un canal de Ca^{++} , permitiendo

la entrada del ion a una variedad de células (incluyendo los adipocitos) y manteniendo constante la concentración intracelular de Ca^{++} ($[\text{Ca}^{++}]_i$) (Pansu D y col., 1983 y Xiaocun S y col., 2004). En los últimos años se ha demostrado que el Ca^{++} intracelular es un regulador clave del metabolismo lipídico del adipocito, ya que un incremento del ion estimula la expresión y actividad de genes lipogénicos e inhibe la lipólisis, resultando en un incremento en la acumulación adipocítica de lípidos. En este sentido, el aumento en la $[\text{Ca}^{++}]_i$ estimula la expresión y actividad de la AGS y, al mismo tiempo, aumenta la secreción de insulina por el páncreas, resultando en un depósito excesivo de TGL (Zemel MB y col., 2000; Xiaocun S y col., 2004 y Parra P y col., 2008).

La activación de la UCP mitocondrial jugaría un rol en el sistema de defensa antioxidante; por ello la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) podría estar involucrada en el efecto diabetogénico de las dietas con bajo aporte de Ca (Sonta T y col., 2004 y Atabek ME y col., 2004). La producción de ERO como subproducto de la cadena de transporte de electrones ha sido atribuido a las altas velocidades del metabolismo de los lípidos y la glucosa. El incremento en la masa grasa podría resultar de un mayor reclutamiento de nuevos adipocitos, un incremento en el volumen de los existentes y/o atenuación en la apoptosis (Sun X y col., 2007). Las ERO podrían desencadenar uno o más de dichos procesos, ya que funcionarían como moléculas de señalización específicas involucradas en la proliferación y crecimiento celular (Burdon RH, 2005).

La interrelación entre la regulación en la producción de ERO y su relación con Ca^{++} y el desacople mitocondrial ha sido intensamente estudiada. El aumento en la $[\text{Ca}^{++}]_i$ activa las enzimas que generan ERO pero en forma de un círculo vicioso; al aumentar la producción de ERO se estimula el aumento en la $[\text{Ca}^{++}]_i$ por la activación de canales de membrana y del RER (Volk T y col., 1997).

Como la producción de ERO se encuentra modulada por la homeostasis de $[\text{Ca}^{++}]_i$ y el desacople mitocondrial, ambos regulados por calcitriol, se ha propuesto que la supresión en la síntesis de dicho compuesto jugaría un importante rol en el efecto antiobesidad del Ca dietario. Según estudios previos (Sun X y col., 2007), el metabolito activo de la vit. D estimula el influjo de Ca e inhibe la expresión de UCP-2 en adipocitos, tanto en humanos como en ratas. Por ello, el aumento en la ICa suprimiría los niveles de calcitriol y, en consecuencia, sus efectos sobre el adipocito. Los niveles endócrinos de calcitriol, producto de la actividad de la $1\alpha\text{OH}$ lasa renal, se encuentran extensamente regulados por PTH, entre otros factores. Esta hormona guarda relación inversa con los niveles de 25OHD, marcador de la adecuación en el estado nutricional de vit. D, que según varios estudios se encontrarán reducidos en la obesidad producto de su mayor acumulación en grasa (Teegarden D y col., 2008). En el presente estudio, los animales OBCa presentaron los mayores niveles de 25OHD, por lo cual no se vería afectada la síntesis renal de

calcitriol por deficiencia de sustrato, ni se generará un hiperparatiroidismo secundario. Si bien en el presente estudio no se determinó PTH, la falta de variación en los niveles de Ca y fundamentalmente de P séricos, con niveles reducidos de CTX, sugerirían que los niveles de PTH no estarían aumentados.

Los cambios endócrinos en los niveles de $1.25(\text{OH})_2\text{D}$ son mínimos o inexistentes por la intensa regulación que presenta la enzima renal que la genera; sin embargo el efecto que presenta en la modulación del metabolismo energético y lipídico del adipocito sería a través de su acción auto-parácrina. En este sentido, se debe recordar que el metabolito activo de la vit. D puede generarse intracelularmente en la mayoría de los tejidos, entre ellos el graso, debido a la presencia de la enzima $1\alpha\text{OHLasa}$ de naturaleza extrarrenal. Esta síntesis depende directamente del aporte de 25OHD , que en el presente estudio no presentó diferencias entre los tres grupos y carece de regulación hormonal.

Impacto sobre los metabolismos del Ca y óseo

La absorción de Ca depende no sólo de su concentración intraluminal sino también de la edad. De acuerdo a estudios previos, la absorción de Ca de ratas normales alimentadas con el nivel recomendado de Ca presenta valores elevados al destete, los que disminuyen con la edad hasta alcanzar los más bajos niveles en la vida adulta (*Pansu D y col., 1983*). Las ratas obesas del presente trabajo tenían edades similares correspondientes, al final del período de estudio, a una elevada velocidad de crecimiento; por lo cual, las variaciones producidas en la absorción de Ca sólo se relacionarían con la cantidad de Ca aportado.

La absorción total de Ca estuvo limitada por el aporte de Ca. En este sentido, presentó su nivel más bajo en el grupo alimentado con bajo aporte de Ca y, a medida que aumentó la cantidad de Ca disponible en el intestino, la absorción aparente de Ca también se incrementó. Contrariamente, el %A de Ca presentó un camino inverso, observándose un mayor porcentaje en el siguiente orden: $\text{OBCa} > \text{ONCa} > \text{OACa}$. Estos niveles coinciden con estudios previos en los que se observa que la absorción activa de Ca es mayor a menor cantidad de Ca aportado por la dieta. Por ello, cuando el aporte es reducido, tanto la absorción activa como la pasiva se encuentran activadas; a concentraciones de Ca cada vez mayores llega un momento en que la absorción activa se satura y sólo se produce eficientemente la pasiva (*Tolosa de Talamoni N y col, 1998*).

La excreción urinaria de Ca fue muy baja en todos los grupos, con un rango entre 0.2 y 1.7mg/d, lo cual hizo que no influyera en los niveles del balance de Ca aparente que fue similar al Ca total absorbido. Al graficar el Ca retenido, expresado por el balance aparente en función de la ingesta, se observó una meseta alrededor de los 200mg/d. Este hecho explicaría, parcialmente, los

resultados del contenido mineral observados en los grupos OBCa y OACa al compararlos con el grupo ONCa. En efecto, el menor aporte de Ca del grupo OBCa limitó el contenido porcentual de cenizas corporales, la cantidad corporal de Ca y P, el CMO del esqueleto total y la DMO de tibia y columna, y aunque el %A de Ca fue elevado no pudo mejorar la biodisponibilidad de Ca porque la cantidad de Ca absorbida estuvo limitada. En el caso del grupo OACa se produjo mayor aporte relativo de Ca, y aunque el contenido porcentual de cenizas y de Ca corporal fueron similares, el CMO del esqueleto total y la DMO de tibia proximal y columna fueron más bajos que los observados en el grupo ONCa. Estos resultados se explican, al menos en parte, por el valor máximo alcanzado en la gráfica, por encima del cual un aumento en la ICa parecería no tener efecto adicional. Sin embargo, los menores valores observados en los estudios densitométricos estarían relacionados al aporte dietario de P. En este sentido, si bien el nivel de P dietario fue igual en las tres dietas experimentales, en el grupo OACa la menor relación Ca/P de la dieta suministrada podría haber actuado como un factor limitante para elevar los niveles de masa ósea.

En la actualidad, el aporte relativo de P es considerado como un problema nutricional, ya que una elevada ICa puede afectar negativamente la absorción de P (*Koshihara M y col., 2005*). En el presente estudio, aunque no se evaluó la cantidad de P absorbido, la elevada relación Ca/P corporal obtenida en el grupo OACa contrasta con la baja masa ósea evaluada por densitometría. Este hallazgo podría ser el resultado de una deficiencia relativa de P en dicho grupo. Otro dato importante que se relacionaría a la deficiencia relativa de P fue la reducción en el contenido porcentual proteico obtenido en este grupo respecto del grupo ONCa, que sugiere también una afectación negativa en la retención nitrogenada. Estos hallazgos explicarían, al menos en parte, las diferencias encontradas por otros investigadores tanto en estudios experimentales como epidemiológicos respecto del mayor efecto antiobesidad del Ca de los productos lácteos al compararlos con aquel provisto por los suplementos dietarios, en los cuales el Ca no se encuentra relacionado a la caseína o a otros fosfopéptidos de la leche (*Pereira MA y col., 2002; Xiaocun S y col., 2004 y Zemel MB y col., 2004*).

Ratas Wistar

Los resultados observados en los animales de la cepa IIMB/β no se reprodujeron totalmente en los obtenidos en la cepa Wistar.

Impacto sobre la composición corporal

En machos de la cepa Wistar, durante la etapa de crecimiento acelerado, el bajo nivel de Ca de la dieta no modificó el PC respecto de los animales alimentados con contenido normal de Ca pero sí la composición corporal, la cual también podría verse afectada por la relación Ca/P de la dieta.

Al igual que en los animales obesos, las diferentes ICa maternas no afectaron el tamaño ni el PC de las crías al nacimiento, por lo cual las diferencias observadas en la composición corporal de las crías al destete y al final de la experiencia serían producto de las dietas sólidas consumidas.

Tal como lo evidenciado en los animales obesos de la cepa IIMB/ β , en los animales alimentados con bajo aporte de Ca se observó un mayor depósito porcentual de grasa respecto de los animales normocálcicos; sin embargo, los animales del grupo WACa presentaron un depósito de grasa aún mayor que los del grupo WBCa. Asimismo, los grupos WBCa y WACa presentaron menores porcentajes de proteínas y cenizas corporales respecto de grupo normal, demostrando una alteración en la composición corporal a través de cambios en la masa magra. Por lo tanto, en esta cepa de ratas tanto la reducción en el aporte de Ca como la baja relación Ca/P de la dieta condujo a un aumento significativo del depósito de grasa sin afectar el PC, evidenciando una alteración en la composición corporal.

En el grupo WACa se observó una mayor ingesta de alimentos hacia el final de la experiencia, lo cual podría haber contribuido al mayor depósito de grasa. Si bien el peso del hígado no mostró diferencias significativas, presentó una tendencia a encontrarse incrementado, lo cual podría indicar un leve aumento en la lipogénesis. Este hecho se encuentra en concordancia con el aumento en la cantidad y el porcentaje de grasa perigonadal + retroperitoneal observado en dicho grupo. Asimismo, los niveles circulantes de TGL del grupo WACa fueron superiores a los de los otros dos grupos, sugiriendo una mayor disponibilidad de sustrato para aumentar el depósito de grasa. Por otra parte, cabe destacar que los niveles de glucosa en ayunas también fueron los más altos, que en forma conjunta con un aumento en los niveles de insulina y HOMA-IR, respecto del grupo WNCa sugieren un aumento en la resistencia a la insulina al compararlo con ese grupo, lo cual podría haber contribuido a aumentar la síntesis y el depósito de grasa.

En los animales con bajo aporte de Ca, a pesar del mayor porcentaje de grasa corporal, no se evidenciaron cambios ni en el peso del hígado ni en la suma de grasa perigonadal y retroperitoneal respecto de WNCa. Sin embargo, los resultados sugieren un desequilibrio en el metabolismo energético debido al aumento sustancial en los niveles de glucosa en ayunas y al incremento en los niveles de insulina y en la resistencia a la misma respecto del grupo WNCa. Estos hechos posiblemente afectarían el depósito de grasa en función del tiempo y sólo se verían reflejados parcialmente en la etapa de crecimiento acelerado.

Impacto sobre los metabolismos del Ca y óseo

En ratas Wistar, el efecto de la diferente ICa sobre el metabolismo óseo es conocido, y se cumple en este estudio. Cabe mencionar que este análisis fue llevado a cabo para realizar un estudio comparativo con los resultados obtenidos en la otra cepa de ratas evaluada.

El Ca fecal y el urinario guardaron relación directa con el contenido de Ca de la dieta. Como la excreción urinaria fue muy baja, la A de Ca y el balance cálcico fueron similares.

La absorción aparente y el balance cálcico estuvieron relacionados positivamente, y el %A de Ca estuvo relacionado negativamente con el Ca aportado por la dieta. El Ca retenido, evidenciado por el balance aparente presentó una meseta al graficarlo en función de la ICa, cuyo valor se encontró alrededor de los 180mg/d de ICa. Este valor límite en la retención se evidenció también en el Ca corporal porcentual, ya que los animales WACa presentaron un valor similar a los del grupo WNCa.

En base a lo expresado previamente respecto de la cepa de animales obesos, el menor aporte relativo de P de la dieta A de Ca podría haber limitado el CMO porcentual y la DMO de tibia proximal y columna lumbar a valores similares al grupo WNCa.

Comparación entre animales IIMB/ β (O) y Wistar (W)

En este punto, debido a la meseta observada en la retención de Ca y en la adquisición de masa ósea (posiblemente esto último por la deficiencia relativa de P), sólo se estudiaron comparativamente las dietas BCa y NCa.

Tradicionalmente se suponía que los dos componentes del PC: masa grasa y masa magra se encontraban relacionado en forma directa y positiva con la densidad mineral, por lo cual se consideraba que el mayor depósito de tejido graso era beneficioso para la salud ósea. Este efecto del mayor contenido graso fue atribuido al mayor peso que soporta el individuo y a la acción de la carga mecánica sobre la formación ósea, así como al posible rol de ciertas hormonas liberadas por los adipocitos que influyen positivamente a la densidad mineral (estrógenos, leptina, entre otros) (*Reid IR, 2002; Reid IR, 2008 y Cao JJ, 2011*). Sin embargo, en la actualidad existe notable evidencia de que la adiposidad se relaciona positivamente sólo con uno de los dos componentes del peso corporal (la masa magra) más que con el otro (la masa grasa) y que además un exceso de tejido graso ejercería un efecto negativo sobre el hueso (*Reid IR, 2008*). Respecto de estos estudios, el tejido graso ya no es un mero depósito energético sino que también se lo asocia a cierto grado de inflamación crónica, debido a que se encuentra infiltrado con una elevada cantidad

de macrófagos, fuente importante de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α). Dichas citoquinas son pro-resortivas por lo cual favorecen el aumento de la resorción y por ende la pérdida de hueso (Xu H y col., 2003; Weisberg SP y col., 2003 y Cao JJ, 2011). Por otra parte, la médula del hueso osteoporótico contiene pocas células osteogénicas y muchos adipocitos cuyas progenies provienen de un mismo precursor. Finalmente, el mayor depósito graso es una fuente importante de ERO las que modifican oxidativamente a las LDL y estas reducen la actividad de la FAL y con ello la correcta mineralización del hueso (Wang H y col., 2011).

Estudios recientes demuestran que la grasa no protege al hueso, y más aún que la masa grasa se asocia con baja masa ósea (Cao JJ, 2011). En concordancia con las evidencias actuales, en el presente estudio el contenido porcentual de cenizas se encontró positivamente relacionado con la masa magra en ambas cepas de animales estudiadas; contrariamente, no mostró relación alguna con la masa grasa. Por otra parte, al normalizar el Ca corporal y el contenido mineral óseo por el PC, los animales W alcanzaron niveles superiores de estos dos parámetros respecto de los animales obesos alimentados con la misma cantidad de Ca dietario. Estos resultados sugieren que el depósito de grasa no favorece la retención ósea de Ca.

Las alteraciones observadas en la composición corporal en ambas cepas de ratas (la cantidad porcentual de proteínas fue menor y la de grasa fue mayor en las ratas obesas), sugiere un desbalance hacia la producción de grasa en detrimento de la síntesis de masa magra en animales que presentan predisposición a padecer obesidad. Si bien el bajo aporte de Ca indujo modificaciones en la cantidad de cenizas corporales, cuando los animales recibieron el aporte de Ca normal, la cepa obesa presentó menor contenido de cenizas, sugiriendo una vez más que el mayor depósito de grasa no favorece la mayor retención de minerales.

La hipercolesterolemia e hiperglucemia son signos de síndrome metabólico, en el cual el nivel de Ca de la dieta parecería tener alguna influencia. En el presente estudio, los animales obesos no desarrollan hipercolesterolemia. Sin embargo, para una misma dieta consumida presentaron niveles superiores de Col total y Col no-HDL comparados con los animales de la cepa W encontrándose el mismo perfil respecto de los niveles de glucosa. En base a estos resultados, el menor nivel de Ca de la dieta induciría cambios negativos en los signos de síndrome metabólico.

Por otra parte, además de los niveles de glucosa, los de insulina en ayunas y el HOMA-IR fueron mayores en animales obesos al ser alimentados con el mismo aporte de Ca y, a su vez, la alteración en dichos niveles fue mayor cuando los animales recibieron el menor contenido de Ca en la dieta. Este hecho confirma que la baja ingesta de Ca exacerba el desarrollo de resistencia a la insulina y obesidad en animales predispuestos a padecerla.

Datos recientes de fisiología integrativa han demostrado que el hueso no es sólo un tejido sobre el cual ejercen su acción distintas hormonas, sino que se trata de un órgano de secreción endócrina. En este sentido, el hueso presenta una característica única, y es que contiene al osteoclasto, célula que en condiciones normales es capaz de destruir al hueso de su propio hospedador, dando los marcadores de resorción como el CTX. El hueso contiene también al osteoblasto, que sintetiza y libera BGP, molécula que además de ser un marcador de formación actúa como una hormona reguladora, al menos parcialmente, del metabolismo energético.

La regulación del metabolismo energético por BGP se realiza a través del incremento del catabolismo lipídico, el gasto energético, la capacidad secretora de insulina por el páncreas, la liberación de adiponectina por los adipocitos, a la vez que induce la proliferación y aumento de la función mitocondrial. Para cumplir su función endócrina la BGP debe activarse, y para ello requiere tanto del proceso de degradación ósea como de la actividad del receptor de insulina presente en el osteoblasto. Mediante la unión a dicho receptor, la BGP favorece la liberación de RANKL en detrimento de OPG, disminuyendo la relación OPG/RANKL e induciendo un mayor reclutamiento, diferenciación y actividad osteoclástica. El aumento de la resorción libera a la BGP que se encontraba retenida en hueso al medio ácido de la laguna de resorción con lo cual se activa dicha proteína por medio de su decarboxilación (*Confavreux CB y col., 2009*) (*Figura 43*).

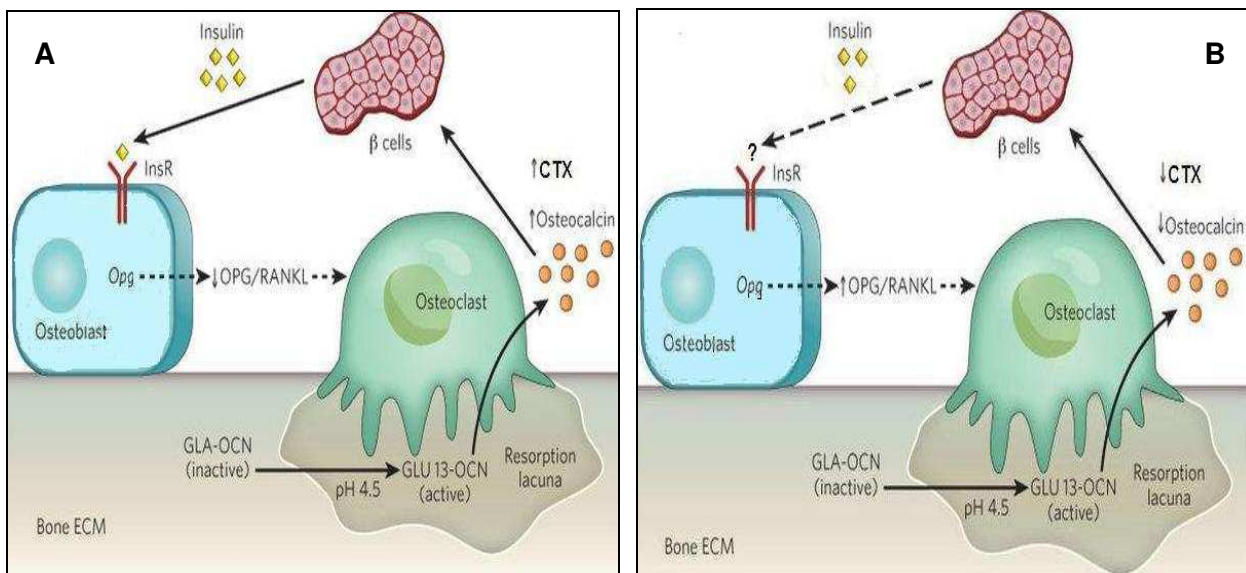


Figura 43: Regulación del metabolismo energético por el osteoblasto. A: condición normal; B: hiperglucemia. Tomado y modificado de Karsenty G y col., 2012.

Estudios previos han demostrado que los niveles de BGP están reducidos en ratas diabéticas (*Motył KJ y col., 2010*); pero además, la BGP parece estar asociada con el metabolismo de la glucosa e insulino-resistencia en sujetos con y sin diabetes (*Kanazawa I y col., 2011*). Contrariamente, la infusión subcutánea de BGP recombinante en ratas “wild type” incrementa la sensibilidad a la insulina, actuando como un secretagogo (*Ducy P, 2011*). En el presente estudio, los niveles de BGP fueron menores en los animales obesos que desarrollan espontáneamente diabetes tipo II. Por otra parte, los niveles de BGP mostraron una relación inversa con los niveles de glucosa e insulina en ayunas y con el HOMA-IR.

Los niveles séricos de BGP se encuentran frecuentemente asociados al metabolismo de los lípidos y a mediciones de adiposidad. En este último caso, en hombres se observó una asociación negativa entre los niveles de BGP y el porcentaje de grasa corporal (*Zhou M y col., 2009*). En concordancia, en el presente estudio tanto en animales obesos como Wistar, los niveles de BGP mostraron una relación inversa con los niveles de col no-HDL y con el contenido de grasa corporal.

Varios estudios han demostrado que el remodelamiento se encuentra disminuido en diabetes (*Shu A y col., 2012*). Estudios “in vivo” e “in vitro” evidenciaron que la hiperglucemia decrece la masa de osteoblastos y posiblemente su función, con lo cual se disminuye la síntesis y secreción de BGP (*Verhaeghe J y col., 1989*). De la misma manera, el presente estudio muestra que los animales obesos presentan niveles de BGP y CTX disminuidos respecto de los de la cepa Wistar para una misma dieta consumida. La disminución en los niveles de CTX es un índice de que la resorción se encuentra inhibida y, por ende, de acuerdo a los estudios citados previamente también se encuentre inhibida la activación de BGP. De acuerdo a las evidencias actuales este hecho contribuiría a incrementar los niveles de glucosa en ayunas y la resistencia a la insulina, tal como se observa en el presente estudio. Por lo tanto, los datos del presente estudio están en concordancia con aquellos que sugieren que la BGP regularía la sensibilidad a la insulina en sus órganos blanco, sugiriendo fuertemente una conexión entre la fisiología esquelética y la resistencia a la insulina.

No hay estudios respecto de la BGP y su relación con indicadores del metabolismo energético en relación al aporte de Ca. Sin embargo, los datos del presente estudio sugieren que el efecto diabetogénico del bajo nivel de BGP es mayor en condiciones de deficiencia de Ca.

CONCLUSIONES

La baja ICa durante el período de crecimiento podría modular el PC induciendo cambios en la composición corporal por variaciones en varios parámetros del metabolismo lipídico, los que podrían conducir a un aumento de la grasa corporal, efecto que aparenta ser superior en los animales propensos a desarrollar obesidad.

Asimismo, el alto contenido de Ca de la dieta, sin modificar el aporte de P, induce un desbalance en la relación Ca/P, dando lugar a una deficiencia relativa de P que, al igual que el bajo aporte de Ca, influiría en modificaciones en la composición corporal y en parámetros del metabolismo energético, conduciendo a un aumento del depósito graso.

El mayor contenido de grasa corporal no sería beneficioso para aumentar la masa ósea; sin embargo, la cantidad de mineral óseo está relacionada a la masa magra, el otro componente importante del PC.

El bajo aporte de Ca induce signos concordantes con el desarrollo de riesgo aterogénico, que también es superior en condiciones favorables al desarrollo de obesidad.

Los niveles de BGP se encuentran negativamente asociados a los de glucosa en ayunas y resistencia a la insulina, lo cual también se vería afectado en mayor medida bajo condiciones de deficiente ingesta de Ca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adami S. Calcitonin. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. MJ Favus Ed., Washington DC, 7th ed. Section V, chap. 52:250-1; 2008.
- Adams J, Bishop N. DXA in Adults and Children. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. MJ Favus Ed., Washington DC, 7th ed. Section V, chap. 29:152-8; 2008.
- Altman R y col. En: *Trombosis. Fisiología, mecanismos de enfermedad y tratamiento. Fisiología, Fisiopatología*. Ed Librería Akadia. Tomo 1, cap. 13:311-29; 2005.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257(1):79-83; 1999.
- Atabek ME, Vatansev H, Erkul I. Oxidative stress in childhood obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 17:1063-8; 2004.
- Bajari TM, Nimpf J, Schneider WJ. Role of leptin in reproduction. *Curr Opin Lipidol* 15(3):315-9; 2004.
- Baron R. Anatomy and Ultrastructure of Bone. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Lippincott Williams and Wilkins Ed., Philadelphia, PA, 4th ed. Section I, chap. 1:3-10; 1999.
- Bianco SD, Peng JB, Takanaga H, Suzuki Y, Crescenzi A, Kos CH, Zhuang L, Freeman MR, Gouvenia CH, Wu J, Luo H, Mauro T, Brown EM, Hediger MA. Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the *Trpv6* calcium channel gene. *J Bone Miner Res* 22(2):274-85; 2007.

- Bonewald LF. Osteocytes. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorder of Mineral Metabolism*. MJ Favus Ed., Washington DC, 7th ed. Section I, chap. 4:22-7; 2008.
- Bozal C. *Biología del osteocito. Actualizaciones en Osteología*. Cap. 2:19-21; 2006.
- Bringurst FD. Calcium and Phosphorus Distribution, Turnover and Metabolic Actions. In: *Endocrinology*, 3rd ed. DeGroot LD Ed. Saunders, Philadelphia. Vol. 2, chap. 6:1015-43; 1995.
- Broadus AE. Mineral Balance and Homeostasis. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Lippincott Williams and Wilkins Ed., Philadelphia, PA., 4th ed. Section III, chap. 12:74-91; 1999.
- Bronner F. Recent developments in intestinal Ca absorption. *Nutr Rev* 67(2):109-13; 2008.
- Brown EM. Homeostatic mechanisms regulating extracellular and intracellular calcium metabolism. In: *The Parathyroids. Basic and Clinical Concepts*. Bilezikian J, Marcus R and Levine MA. Raven Press Ed., San Diego, California. Section I, chap. 2:15-54; 1994.
- Bruckbauer A, Zemel MB. Dietary calcium and dairy modulation of oxidative stress and mortality in *aP2-agouti* and wild-type mice. *Nutrients* 1(1):50-70; 2009.
- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowska I, Pawlik T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol* 56(5):33-55; 2005.
- Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 18:775-94; 1995.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269(5223):546-9; 1995.
- Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med* 357(9):905-16; 2007.

- Cao JJ. *Effects of obesity on bone metabolism. J Orthop Surg Res* 15;6:30; 2011.
- Carafoli E. *Calcium signaling: A tale for all seasons. Proc Natl Acad Sci USA* 99(3):1115-22; 2002.
- Chorev M, Rosenblat M. *Parathyroid Hormone: Structure-Function Relations and Analogue Design. In: Principles of Bone Biology. Bilezikian J, Raisz L and Rodan G. Ac. Press Ed., San Diego, California. Part I, chap. 23:305-23; 1996.*
- Clemens TL, Karsenty G. *The Osteoblast: an Insulin Target Cell Controlling Glucose Homeostasis. J Bone Miner Res* 26(4):677-80; 2011.
- Clowes JA, Khosla S, Eastell R. *Perspective. Potential Role of Pancreatic and Enteric Hormones in Regulating Bone Turnover. J Bone Miner Res* 20(9):1497-1506; 2005.
- Confavreux CB, Levine RL, Karsenty G. *A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms. Mol Cell Endocrinol* 310:21-29; 2009.
- Cornish J, Callon KE, Bava U, Lin C, Naot D, Hill BL, Grey AB, Broom N, Myers DE, Nicholson GC, Reid IR. *Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. J Endocrinol* 175(2):405-415; 2002.
- Cosman F, Herrington B, Himmelstein S, Lindsay R. *Radiographic absorptiometry: a simple method for determination of bone mass. Osteoporos Int* 2(1):34-8; 1991.
- Cowley MA, Grove KL. *Ghrelin-satisfying a hunger for the mechanism. Endocrinology* 145(6):2604-6; 2004.
- D'Amour P. *Circulating PTH molecular forms: what we know and what we don't. Kidney Int Supl* 102(1):S29-S33; 2006.
- DeLuca HF. *Vitamin D revisited. Clin Endocrinol Metab* 9(1):1-26; 2004.

- Deftos LJ. Calcitonin. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Lippincott-Raven Ed., Philadelphia, PA, 3rd ed. Section II, chap. 14:82-7; 1996.
- Delmas PD, Wilson DM, Mann KG, Riggs BL. Effect of renal function on plasma levels of bone Gla-protein. *J Clin Endocrinol Metab* 57(2):1028-30; 1983.
- den Dekker E, Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium* 33(5-6):497-507; 2003.
- Ducy P. The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodeling and energy metabolism. *Diabetologia* 54(6):1291-7; 2011.
- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Renal Physiol* 289(1):F8-28; 2005.
- Eckel RH. Insulin resistance: an adaptation for weight maintenance. *Lancet* 340(8833):1452-3; 1992.
- Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434:514-20; 2005.
- Eleftheriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Kim CA, Ogawa Y, Liu X, Ware SM, Craigen WJ, Robert JJ, Vinson C, Nakao K, Capeau J, Karsenty G. Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(9):3258-63; 2004.
- Farley JR, Hall SL, Ilacas D, Orcutt C, Miller BE, Hill CS, Baylink DJ. Quantification of skeletal alkaline phosphatase in osteoporotic serum by wheat germ agglutinin precipitation, heat inactivation, and a two-site immunoradiometric assay. *Clin Chem* 40(9):1749-56; 1994.
- Favus MJ and Goltzman D. Regulation of Calcium, Magnesium, and Phosphate metabolism. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. MJ Favus Ed., Washington DC, 7th ed. Section II, chap. 21:104-7; 2008.

- Felsenfeld A, Llach F. Parathyroid gland function in chronic renal failure. *Kidney Int* 43(4):771-89; 1993.
- Ferris WF, Crowther NJ. Once fat was fat and that was that: our changing perspectives on adipose tissue. *Cardiovas J Afr* 22(3):147-54; 2011.
- Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 105(13):5266-70; 2008.
- Finkelstein JS. Pharmacological Mechanisms of Therapeutics: Parathyroid Hormone. In: *Principles of Bone Biology*. Bilezikian J, Raisz L and Rodan G. Ac. Press Ed., San Diego, California. Part III, chap. 71:993-05; 1996.
- Fleet, JC. Molecular Regulation of Calcium Metabolism. In: *Calcium in Human Health*. Weaver, CM; Heaney, RP Ed. Humana Press; Totowa, NJ. Chap. 11:163-90; 2006.
- Folch J, Lees M, Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1):497-509; 1957.
- Frayn KN, Humphreys SM, Coppack SW. Net carbon flux across subcutaneous adipose tissues after a standard meal in normal-weight and insulin-resistant obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20(9):795-800; 1996.
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395(6704):763-70; 1998.
- Frost HM. Tetracycline-base histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* 3(3):211-37; 1969.
- Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 20(5):230-6; 2009.

- Fulzele K, Riddle RC, Cao X, Wan C, Chen D, Faugere MC, Aja S, Hussain MA, Brüning J, Clemens TL. *Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. Cell* 142(2):309-19; 2010.
- Gaasbeek A, Meinders AE. *Hypophosphatemia: an update on its aetiology and treatment. Am J Med* 118(10):1094-101; 2005.
- Gandhi A, Beam HA, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. *The effects of local insulin delivery on diabetic fracture healing. Bone* 37(4):482-90; 2005.
- Geneser F. *Histología. Ed Médica Panamericana. Cap. 12:215-245; 1992.*
- Gilg S, Lutz TA. *The orexigenic effect of peripheral ghrelin differs between rats of different age and with different baseline food intake and it may in part be mediated by the area postrema. Physiol Behav* 87(2):353-9; 2006.
- Goltzman D. *Emerging roles for calcium-regulating hormones beyond osteolysis Trends Endocrinol Metab* 21(8):512-8; 2010.
- González M, Torres C, Coronel J, Canaval Hoover BM, Cuadros A, Alfaro S, Echeverry A, Gómez G. *Metabolismo óseo y osteoporosis. Revista de Menopausia, Endocrinología* 14:3; 2008.
- Green DR, Wang R. *Calcium and energy: making the cake and eating it too? Cell* 142(2):200-2; 2010.
- Guéguen L, Pointillart A. *The Bioavailability of Dietary Calcium. J Am Coll Nutr* 19(2):119S-136S; 2000.
- Gulam M, Trotón MM, Hodsworth DW. *Bone Mineral Measurement of Phalanges: comparison of Radiographic Absorptiometry and Area Dual X-ray Absorptiometry. Radiology* 216(2):586-91; 2000.

- Gundberg CM, Nieman SD, Abrams S, Rosen H. Vitamin K status and bone health: an analysis of methods for determination of undercarboxylated osteocalcin. *J Clin Endocrinol Metab* 83(9):3258-66; 1998.
- Hamdy O, Porramatikul S, Al Ozairi E. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev* 2(4):367-73; 2006.
- Heaney RP. *Calcium in Human Health*. Humana Press. Totowa, New Jersey. Cap. 12: 191-207, 2006.
- Henning SJ. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol* 241(3):G199-214; 1981.
- Herrero S, Calvo OM, Garcia-Moreno C, Martin E, San Roman JI, Martin M, Garcia-Talavera JR, Calvo JJ, del Pino-Montes J. Low bone density with normal bone turnover in ovariectomized and streptozotocin-induced diabetic rats. *Calcif Tissue Int* 62(3):260-5; 1998.
- Hinoi E, Gao N, Jung DY, Yadav V, Yoshizawa T, Myers MG Jr, Chua SC Jr, Kim JK, Kaestner KH, Karsenty G. The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J Cell Biol* 183(7):1235-42; 2008.
- Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* 17; 22(4):776-85; 2003.
- Hoenderop JG, Willems PH, Bindels RJ. Toward a comprehensive molecular model of active calcium reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(3):F352-60, 2000.
- Holick MF, DeLuca HF. Metabolism of vitamin D. En: *Vitamin D*. Lawson DEM Ed. Academic, New York. 51-91; 1978.

- Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, Gough TJ, Collier GR, Nicholson GC. *Leptin inhibits osteoclast generation. J Bone Miner Res* 17(2):200-9; 2002.
- *Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences (ILARCLS). Guide for the care and use of laboratory animals. National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.*
- Ituarte EA, Halstead LR, Iida-Klein A, Ituarte HG, Hahn TJ. *Glucose transport system in UMR-106-01 osteoblastic osteosarcoma cells: regulation by insulin. Calcif Tissue Int* 45(1):27-33; 1989.
- Jackmain M, Doucet E, Despres JP, Bouchard C, Tremblay A. *Calcium intake, body composition, and lipoprotein-lipid concentrations in adults. Am J Clin Nutr* 77(6):1448-52; 2003.
- Janghorbani M, Feskanich D, Willett WC, Hu F. *Prospective study of diabetes and risk of hip fracture: the Nurses' Health Study. Diabetes Care* 29(7):1573-8; 2006.
- Kanazawa I, Yamaguchi T, Tada Y, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T. *Serum osteocalcin level is positively associated with insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes. Bone* 48:720-725, 2011.
- Karsenty G. *Convergence between bone and energy homeostasis: leptin regulation of bone mass. Cell Metab* 4(5):341-8; 2006.
- Karsenty G, Ferron M. *The contribution of bone to whole-organism physiology. Nature* 481(7381):314-20; 2012.
- Kaur T, Zhang ZF. *Obesity, breast cancer and the role of adipocytokines. Asian Pac J Cancer Prev* 6(4):547-52; 2005.
- Kawakami, Y., Rodriguez-Leon, J., and Belmonte, J.C. *The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis. Curr Opin Cell Biol* 18(6):723-9, 2006.

- Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JA, Smals AG. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest* 23(5):295-303; 2000.
- Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest* 118(2):421-8; 2008.
- Kitaura H, Zhao P, Novack DV, Ross FP, Teitelbaum SL. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. *J Clin Invest* 115(12):3418-27; 2005.
- Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin-the classical, resistin-the controversial, adiponectin-the promising and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19(4):525-46; 2005.
- Konishi M, Asaki T, Koike N, Miwa H, Miyake A, Itoh N. Role of Fgf10 in cell proliferation in white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 218:119-28; 2004.
- Konturek PC, Brzozowski T, Burnat G, Kwiecien S, Pawlik T, Hahn EG, Konturek SJ. Role of brain-gut axis in healing of gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol* 55 (1 Pt 2):179-92; 2004.
- Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Braingut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol* 55:137-154; 2004.
- Koshihara M, Katsumata S-I, Uehara M, Suzuki K. Effects of dietary phosphorus intake on bone mineralization and calcium absorption in adult female rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 69(5):1025-1028; 2005.
- Koyama K, Chen G, Lee Y, Unger RH. Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *Am J Physiol* 273(4 Pt 1):E708-E713; 1997.
- Krause C, de Porter DJJ, Karperien M, ten Dijke P. Signal Transduction Cascades Controlling Osteoblast Differentiation. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and*

- Disorders of Mineral Metabolism. Favus Ed., Washington, DC, 7th ed. Section I, chap. 2:10-11; 2008.*
- *Kream BE, Smith MD, Canalis E, Raisz LG. Characterization of the effects of insulin on collagen synthesis in fetal rat bone. Endocrinology 116(1):296-302; 1985.*
 - *Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. Clin Sci (Lond) 109(3):243-56; 2005.*
 - *Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehman JM, Manolagas SC, Jilka RL. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. Endocrinology 143(6):2376-84; 2002.*
 - *Lee NK, Karsenty G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. Trends Endocrinol Metab 19(5):161-6; 2008.*
 - *Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. Cell 130(3):456-69; 2007.*
 - *Lemann J Jr, Favus MJ. The Intestinal Absorption of Calcium, Magnesium, and Phosphate. En: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorder of Mineral Metabolism. Lippincott Williams and Wilkins Ed., Philadelphia, PA, 4th ed. Section III, chap. 10:63-7; 1999.*
 - *Loder RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. Clin Orthop Relat Res (232)210-6; 1988.*
 - *Lorenzen JK, Nielsen S, Holst JJ, Tetens I, Rehfeld JF, Astrup A. Effects of dairy calcium or supplementary calcium intake on postprandial fat metabolism, appetite, and subsequent energy intake. Am J Clin Nutr 85(3):678-687; 2007.*
 - *Maccarinelli G, Sibilio V, Torsello A, Raimondo F, Pitto M, Giustina A, Netti C, Cocchi D. Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. J Endocrinol 184(1):249-56; 2005.*

- Manolagas S. *Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis*. *Endocr Rev* 21(2):115-37; 2000.
- Marks SC, Hermey DC. *The Structure and Development of Bone*. In: *Principles of Bone Biology*. Bilezikian J, Raisz L and Rodan G. Ac. Press. San Diego, California. Part I, chap. 1:3-15; 1996.
- Mastaglia SR, Pellegrini GG, Mandalunis PM, Gonzales Chaves MM, Friedman SM, Zeni SN. *Vitamin D insufficiency reduces the protective effect of bisphosphonate on ovariectomy-induced bone loss in rats*. *Bone* 39(4):837-44; 2006.
- Mautalen CA. *Métodos para evaluar la masa ósea*. *Medicina Ecuatoriana* 1:73; 1987.
- McKenna, MJ. *Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly*. *Am J Med* 93(1):69-77; 1992.
- McKenna MJ, Freaney R. *Secondary hyperparathyroidism in the elderly: means to defining hypovitaminosis D*. *Osteoporosis Int* 8 (2):3-6; 1998.
- Motyl KJ, McCabe LR, Schwarz AV. *Bone and Glucose Metabolism: A Two-Way Street*. *Arch Biochem Biophys* 503(1):2-10; 2010.
- Mundy GR, Chen D and Oyajobi BO. *Bone Remodeling*. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 5th ed. Lippincott-Raven. Chicago. Illinois. Section I, chap 7:46-58; 2003.
- Mundy GR. *Bone Resorbing Cells*. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Favus Ed. Raven Press. New York, 2nd ed. Section I, chap 5:25-32; 1996.
- Nawrot-Porabka K, Jaworek J, Leja-Szpak A, Palonek M, Szklarczyk J, Konturek SJ, Pawlik WW. *Leptin is able to stimulate pancreatic enzyme secretion via activation of duodeno-pancreatic reflex and CCK release*. *J Physiol Pharmacol* 55(2):47-57; 2004.

- Negri A L. y Fradinger E. New factors which regulate renal vitamin D1 alfa hydroxylase. *Nefrología* 25(6):602-4,606-7; 2005.
- Nelson DL, Cox MM. Biosíntesis de lípidos. En: *Principios de Bioquímica (4ª ed.)* Lehninger Ed Omega. Cap. 21:820-5; 2005.
- Nijenhuis T, Hoenderop JG, Bindels RJ. TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca (2+) entry at the gate. *Pflugers Arch* 451(1):181-92; 2005.
- Nilsson O, Marino R, De Luca F, Moshe P. Endocrine Regulation of the Growth Plate. *Horm Res* 64(4):157-65; 2005.
- Nisselson RA, Jüppner H. Parathyroid Hormone: In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. MJ Favus Ed., Washington DC, 7th ed. Section III, chap. 25:123-7; 2008.
- Nottestad SY, Baumel JJ, Kimmel DB, Recker RR, Heaney RP. The proportion of trabecular bone in human vertebrae. *J Bone Miner Res* 2(3):221-9; 1987.
- Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol* 4(3):290-4; 2004.
- Olguin MC, Calderari SA, Zingale MI, Posadas M, Gayol MC, Revelant GC, Laboudette V, Marinozzi D. Effects of dietary fatty acid composition on fat distribution and glucose tolerance of diabetic B rats. *Diab Nutr Metab* 11(1998):314-319.
- Pacifici R, Rupich R, Griffin M, Chines A, Susman N, Avioli LV. Dual energy radiography versus quantitative computer tomography for the diagnosis of osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metabol* 70(3):705-10; 1990.
- Packard CJ, Rader DJ. *Lipids and Atherosclerosis*. Greek Edition by Hatzitolios AI, Savopoulos CI. Mendor Publications, Athens; 2008.

- Pansu D, Bellaton C, Bronner F. Developmental changes in the mechanism of duodenal calcium transport in the rat. *Am J Physiol* 244(1):G20-6; 1983.
- Papakonstantinou E, Flatt WP, Huth PJ, Harris RB. High dietary calcium reduces body fat content, digestibility of fat, and serum vitamin D in rats. *Obes Res* 11(3):387-394; 2003.
- Parfitt AM, Drezner M, Glorieux F, Kanis J, Malluche H, Meunier P, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. *J Bone Miner Res* 2(6):595-610; 1987.
- Parra P, Bruni G, Palou A, Serra F. Dietary calcium attenuation of body fat gain during high-fat feeding in mice. *J Nutr Biochem* 19(2):109-7; 2008.
- Pereira MA, Jacobs DR, Van Horn L, Slattery ML, Kartashov AI, Ludwig DS. Dairy consumption, obesity, and the insulin resistance syndrome in young adults. The CARDIA study. *JAMA Eur J Nutr* 287(16):2081-9; 2002.
- Perera RJ, Marcusson EG, Koo S, Kang X, Kim Y, White N, et al. Identification of novel PPAR γ target genes in primary human adipocytes. *Gene* 369:90-9; 2006.
- Pérez AV, Picotto G, Carpentieri A, Rivoira MA, Peralta López ME, Tolosa de Talamoni NG. Minireview on Regulation of Intestinal Calcium Absorption. *Digestion* 77(1):22-34; 2008.
- Pérez Mayorga M. El adipocito como órgano endocrino. Implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Revista Med* 15(2):225-42; 2007.
- Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104(10):1363-74; 1999.
- Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of

- the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. Circulation 113(6):898-918; 2006.*
- *Pun KK, Lau P, Ho PW. The characterization, regulation, and function of insulin receptors on osteoblast- like clonal osteosarcoma cell line. J Bone Miner Res 4(6):853-62; 1989.*
 - *Quintana L, zur Nieden NI, Semino CE. Morphogenetic and Regulatory Mechanisms During Developmental Chondrogenesis: New Paradigms for Cartilage Tissue Engineering. Tissue Engineering Part B 15(1)29:41; 2009.*
 - *Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. 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(11):1939-51; 1993.*
 - *Reddy Vanga SR, Good M, Howard PA, Vacek JL. Role of vitamin D in cardiovascular health. Am J Cardiol 106(6):798-805; 2010.*
 - *Reynaga Montecinos B, Zeni SN. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica. Acta Bioquím Clín Latinoam 43:177-93; 2009.*
 - *Riancho Moral JA, González Macías J. Manual práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral. Madrid: Jarpyo Ed. 89-92; 2004.*
 - *Robey PG, Boskey AL. The Composition of Bone. In: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorder of Mineral Metabolism. 7th ed. Seeman Ed. Lippincott-Raven. Chicago. Illinois. Section I, chap. 6:32-8; 2008.*
 - *Robinson CJ, Alanis MC, Wagner CL, Hollis BW, Johnson DD. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels in early-onset severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 203(4)-366. e1-6; 2010.*
 - *Rosen DM, Luben RA. Multiple hormonal mechanisms for the control of collagen synthesis in an osteoblast-like cell line, MMB-1. Endocrinology 112(3):992-999; 1983.*

- Ross FP. *Osteoclast Biology and Bone Resorption*. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorder of Mineral Metabolism*. 7th ed. Seeman Ed. Lippincott-Raven. Chicago. Illinois. Cap. 3:16-22; 2008.
- Savopoulos Ch, Dokos Ch, Kaiafa G, Hatzitolios A. *Adipogenesis and osteoblastogenesis: trans-differentiation in the pathophysiology of bone disorders* HIPPOKRATIA 15(1):18-21; 2011.
- Schlatter E. *Who Wins the Competition: TRPV5 or Calbindin-D_{28K}?* J Am Soc Nephrol 17: 2954-6; 2006.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. *Central nervous system control of food intake*. Nature 404(6778):661-671; 2000.
- Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. *Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part I*. Circulation 104(19):2376-2383; 2001.
- Shetty, S; Kusmiminski, CM; Scherer, PE. *Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies*. Trends in Pharmacol Sci 30(5)234-239; 2009.
- Shi H, Dirienzo D, Zemel MB. *Effects of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted aP2-agouti transgenic mice*. FASEB J 15(2):291-293; 2001.
- Shu A, Yin MT, Stein E, Cremers S, Dworakowski E, Ives R, Rubin MR. *Bone structure and turnover in type 2 diabetes mellitus*. Osteoporos Int 23:635–641; 2012.
- Siddiqui SM, Chang E, Li J, Burlage C, Zou M, Buhman KK, Koser S, Donkin SS, Teegarden D. *Dietary intervention with vitamin D, calcium, and whey protein reduced fat mass and increased lean mass in rats*. Nutr Res 28(11):783-790; 2008.
- Silha, JV; Weiler, HA; Murphy, LJ. *Plasma Adipokines and Body Composition in Response to Modest Dietary Manipulations in the Mouse*. Obesity 14(8)1320-1328; 2006.

- Singh MK, Elefteriou F, Karsenty G. (Cocaine and amphetamine-regulated transcript may regulate bone remodeling as a circulating molecule. *Endocrinology* 149(8):3933-3941; 2008.
- Singla Parul, Bardoloi Animesh, Parkash Anuj A. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes* 1(3):76-88; 2010.
- Slepchenko BM, Bronner F. Modeling of transcellular Ca transport in rat duodenum points to coexistence of two mechanisms of apical entry. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(1):C270-C281; 2001.
- Sonta T, Inoguchi T, Tsubouchi H, et al. Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radic Biol Med* 37:115-23; 2004.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409(6818):307-312; 2001.
- Steppan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke H, Swick AG. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regul Pept* 92(1-3):73-78; 2000.
- Strewler G, Nissenson R. Parathyroid-Hormone-related Protein. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorder of Mineral Metabolism*. 3rd ed. Favus Ed. Lippincott-Raven. Chicago. Illinois. Section II, chap. 12:71-3; 1996.
- Strushkevich N, Usanov SA, Plotnikov AN, Jones G, Park HW. Structural analysis of CYP2R1 in complex with vitamin D3. *J Mol Biol* 380(1):95-106; 2008.
- Sun X, Zemel MB. 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 modulation of adipocyte reactive oxygen species production. *Obesity (Silver Spring)* 15(8):1944-53; 2007.
- Swinburn BA, Nyomba BL, Saad MF, Zurlo F, Raz I, Knowler WC, et al. Insulin resistance associated with lower rates of weight gain in Pima Indians. *J Clin Invest* 88(1):168-173; 1991.

- Talbott SM, Shapses SA. Dietary restriction of energy and calcium alters bone turnover and density in younger and older female rats. *J Nutr* 128(3):640-645; 1998.
- Teegarden D, Gunther CW. Can the controversial relationship between dietary calcium and body weight be mechanistically explained by alterations in appetite and food intake? *Nutr Rev* 66(10):601-605; 2008.
- Thomas T, Martin A. Bone metabolism and energy balance: role for leptin. *Joint Bone Spine* 72(6):471-473; 2005.
- Thrailkill KM. Insulin-like growth factor-I in diabetes mellitus: its physiology, metabolic effects, and potential clinical utility. *Diabetes Technol Ther* 2(1):69-80; 2000.
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6(10):772-783; 2006.
- Tolosa de Talamoni N, Pérez A, Alisio A. Effect of cholecalciferol on intestinal epithelial cells. *Trends Comp Biochem Physiol* 5:179-85; 1998.
- Tresguerres JAF. *Fisiología humana*. 3ª edición. Ed. Mc Graw Hill. Cap. 76:966; 2005.
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407(6806):908-913; 2000.
- Vanga SR, Good M, Howard PA, Vacek JL. Role of vitamin D in cardiovascular health. *Am J Cardiol* 106(6):798-805; 2010.
- Verhaeghe J, Suiker AM, Nyomba BL, Visser WJ, Einhorn TA, Dequeker J & Bouillon R. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. II. Impaired bone turnover and decreased osteocalcin synthesis. *Endocrinology* 1124: 573-582; 989
- Volk T, Hensel M, Kox WJ. Transient Ca²⁺ changes in endothelial cells induced by low doses of reactive oxygen species: role of hydrogen peroxide. *Mol Cell Biochem* 171:11-21; 1997.

- Walters JR, Balesaria S, Chavele KM, Taylor V, Berry JL, Khair U, Barley NF, van Heel DA, Field J, Hayat JO, Bhattacharjee A, Jeffery R, Poulosom R. Calcium channel TRPV6 expression in human duodenum: different relationships to the vitamin D system and aging in men and women. *J Bone Miner Res* 21(1):1770-7; 2006.
- Wang H, Peng DQ. New insights into the mechanism of low high density lipoprotein cholesterol in obesity. *Lipids in Health and Disease* 10:176; 2011.
- Wang X, Rader DJ. Molecular regulation of macrophage reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol* 22(4):368-372; 2007.
- Weaver CM, Heaney RP. Cellular Functions and Fluxes of Calcium. In: *Calcium in Human Health*. Human Press. Totowa, New Jersey. Chap 3; 13; 2006.
- Weaver CM, Heaney RP. Molecular Regulation of Calcium Metabolism. In: *Calcium in Human Health*. Human Press. Totowa, New Jersey. Chap 11:163-89; 2006.
- Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G, Lofton-Day CE, Prunkard DE, Raymond C, Kujiper JL. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest* 96(4):2065-2070; 1995.
- Weisstaub A, Ronayne de Ferrer P, Zeni SN, de Portela ML. Influence of low dietary calcium during pregnancy and lactation on zinc levels in maternal blood and bone in rats. *J Trace Elem Med Biol* 17(1):27-32; 2003.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D Jr. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282(5738):503-505; 1979.
- Xiaocun S, Zemel MB. Calcium and dairy products inhibit weight and fat regain during ad libitum consumption following energy restriction in Ap2-Agouti transgenic mice. *J Nutr* 134(1):3054-3060; 2004.

- Yang DC, Tsay HJ, Lin SY, Chiou SH, Li MJ, Chang TJ, et al. cAMP/PKA regulates osteogenesis, adipogenesis and ratio of RANKL/OPG mRNA expression in mesenchymal stem cells by suppressing leptin. *PLoS One* 3(2):e1540; 2008.
- Zhang Q, Tordoff MG. No effects of dietary calcium on body weight of lean and obese mice and rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(4):R669-R677; 2004.
- Zemel MB, Miller SL. Dietary calcium and dairy modulation of adiposity and obesity risk. *Nutr Rev* 62(4):125-131; 2004.
- Zemel MB, Shi H, Greer B, Dirienzo D, Zemel PC. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J* 14(9):1132-1138; 2000.
- Zeni SN, Ortela Soler CR, Lazzari A, López L, Suárez M, Di Gregorio S, Somoza JI, de Portela ML. Interrelationship between bone turnover markers and dietary calcium intake. *Bone* 33(4):606-13; 2003.
- Zeni SN, Weisstaub A, Di Gregorio S, Ronayne de Ferrer PA, Portela ML. Bone mass changes "in vivo" during the entire reproductive cycle in rats feeding different dietary calcium and calcium/phosphorus content USA. *Calc Tiss Int* 73:594-600; 2003.
- Zhou M, Ma X, Li H, Pan X, Tang J, Gao Y, Hou X, Lu H, Bao Y, Jia W. Serum osteocalcin concentrations in relation to glucose and lipid metabolism in Chinese individuals. *Eur J Endocrinol* 161:723-729; 2009.
- Zuscik MJ, Hilton MJ, Zhang X, Chen D and O'Keefe RJ. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stresses. *J Clin Invest* 118(2):429-437; 2008.