



**UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA  
Unidad Iztapalapa**

**“EFECTO DE LA INGESTA DE INULINA TIPO AGAVE EN LAS  
CONCENTRACIONES DE CALCIO Y FÓSFORO EN SANGRE EN UNA  
POBLACIÓN DE MONOS RHESUS CON DENSIDAD ÓSEA CONOCIDA  
MEDIANTE TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTARIZADA (TAC)”**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud

**P R E S E N T A**

**Salvador Abraham Solís Chávez**

Cotutores

Dra. Marcela Arteaga Silva

Dr. Manuel Arnoldo Castillo Rivera

Asesor

Dr. Emilio Sacristán Rock

Ciudad de México, a 06 de noviembre de 2020

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó Salvador Abraham Solís Chávez el 06 de noviembre del año de 2020.

Sinodales:

Presidenta Dra. Marcela Arteaga Silva



Secretario Dr. Manuel Amoldo Castillo Rivera



Vocal Dr. Emilio Sacristán Rock



Vocal Dra. Pilar Durán Hernández



Vocal Dr. Manuel Alejandro Cruz Aguilar



El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93"

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, mis mayores logros dedicados a ustedes. Gracias por estar, gracias por hacerme existir, gracias por su apoyo, gracias por todo. ¡Los amo!

A Antonio Solis, gracias por tu gran compañía siempre y tus mejores consejos. Por hacerme la vida más ligera.

A Elena Chávez, gracias por tu siempre incondicional e invaluable apoyo y presencia.

A Itzel Solis, te amo, ¡gracias por siempre estar y yo estaré siempre para ti!

A Stephane, te amo, ¡gracias por tanto apoyo y por tanto esfuerzo para mejorar juntos!

A Estefanía, gracias por siempre preocuparte por mí, por estar en mi vida y por todo el camino que hemos recorrido juntos y por ser mi partner.

A mi amiga y colega Gala Castro por tu invaluable ayuda para concluir esta tesis, estoy muy orgulloso de ti porque eres una gran bióloga.

A mis co-directores, Dra. Arteaga, Dr. Castillo, por aceptar la tutoría y apoyarme a pesar de las diversas dificultades que se me presentaron en el camino.

A mi asesor, Dr. Sacristán por su aceptación en la asesoría de mi trabajo y apoyo con la TAC.

A mis sinodales, Dra. Durán y Dr. Cruz por aceptar realizar las revisiones y evaluación de este trabajo.

Gracias al Centro de Investigación en Instrumentación e Imagenología Médica (CI3M) por el acceso al uso del equipo de TAC

Gracias a todos aquellos animales de laboratorio que han aportado a este trabajo y a miles de avances científicos más.

## RESUMEN

La osteoporosis es una enfermedad crónica caracterizada por baja masa ósea y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo que incrementa la fragilidad del mismo, aumentando el riesgo de fractura; debido a que el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es fundamental para la mineralización de huesos y dientes, se recomienda una ingesta diaria adecuada como medida preventiva y tratamiento de enfermedades esqueléticas. El microbioma intestinal es un factor determinante en la absorción de minerales y existe evidencia que el consumo de fructooligosacáridos, como la inulina del agave, incrementan la presencia de microbiota benéfica en el tracto gastrointestinal. Las similitudes fisiológicas y la proximidad filogenética entre el humano y los monos Rhesus, los vuelven un excelente modelo para el estudio de enfermedades asociadas a la edad y sus posibles tratamientos. Además, las poblaciones de macacos en cautiverio son una alternativa ventajosa en estudios de larga duración ya que las historias clínicas están completas, los individuos se encuentran bajo observación constante y variables como la dieta y el consumo general de alimentos están estrictamente controladas. Objetivo: Evaluar las concentraciones de calcio y fósforo en sangre antes y después de la suplementación de inulina tipo agave en la dieta de una población de monos Rhesus con densidad ósea conocida mediante Tomografía Axial Computarizada (TAC). Material y métodos: Se utilizaron 32 macacos (*Macaca mulatta*) divididos en grupos etarios (juveniles de 5-9, adultos de 10-19 y seniles de 20-28 años), se realizó una tomografía axial computarizada (TAC) para medir la densidad media ósea (DMO) femoral y categorizarlos en sanos, osteopénicos y osteoporóticos. También se

extrajeron muestras de sangre para realizar bioquímica sanguínea, en donde se evaluaron los niveles de calcio (Ca), fósforo (P) y fosfatasa alcalina (FosAl). La población se dividió en dos grupos: control (n=11) y experimental (n=21) de acuerdo a sus clanes familiares. Al grupo experimental se le suministró un producto comercial de inulina de agave (Metlin®) a una concentración de 1 gr/ml asegurando una ingesta de al menos 8g de inulina al día. Transcurridos 22 meses, se realizó nuevamente un análisis de sangre. Los resultados de la TAC fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA y prueba de Tukey para determinar diferencias en la densidad ósea de los individuos. Para determinar diferencias en las concentraciones de Ca, P y FosAl, se usó ANOVA para las concentraciones iniciales y ANOVA de 3 vías para las concentraciones finales y sus relaciones con las variables. Resultados: Se obtuvo la DMO de la población, y las proporciones de hueso trabecular y hueso cortical para cada grupo de edad, también se determinaron 7 sujetos osteopénicos. Tanto en el grupo control y grupo experimental no presentaron diferencias significativas en las concentraciones iniciales de Ca, P y FosAl. En las concentraciones finales se observaron diferencias significativas en Ca y P, no así en FosAl. Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que en monos Rhesus, la ingesta de inulina como suplemento alimenticio tiene un efecto positivo en la salud ósea favoreciendo la homeostasis del Ca a través de su absorción y consecuente incremento en biodisponibilidad, potencialmente deteniendo los procesos de resorción ósea. Se recomienda la realización de estudios más específicos para comprobar el efecto de este prebiótico en la salud ósea.

Palabras claves: Densidad mineral ósea (DMO), calcio, fósforo, inulina del agave, prebiótico, primates no humanos, osteoporosis, tomografía axial computarizada (TAC).

## ABSTRACT

Osteoporosis is a chronic skeletal disease characterized by low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue with a consequent increase in bone fragility and fracture risk. An adequate calcium (Ca<sup>2+</sup>) daily intake is recommended to prevent and treat bone diseases, since it is critical to bone and teeth mineralization. Gut microbiome is a determinant factor on the absorption of minerals and there is evidence that the consumption of fructooligosaccharides like agave inulin increases the presence of beneficial microbiota in the gastrointestinal tract. The physiological similarities and the close phylogenetic relation between humans and Rhesus monkeys, make them an excellent model to study age-related diseases and possible treatments. Captive macaque populations are an advantageous alternative in long-term studies because their individual clinical history is well documented, the individuals are under constant observation and variables such as diet and overall food intake are controlled. Objective: To evaluate the concentrations of calcium and phosphorus serum before and after the supplementation of agave-type inulin in the diet of a population of Rhesus monkeys with known bone density through of Computed Axial Tomography (CT). Material and methods: 32 macaques (*Macaca mulatta*) were used, divided in three age groups (youth 5-9, adults 10-19 and senile 20-28 years old), an axial computer tomography (CT scan) was performed to assess femoral bone mineral density (BMD) and categorized them into healthy, osteopenic and osteoporotic. Blood samples were also extracted to run blood biochemistry test, where the levels of calcium (Ca), phosphorus (P) and alkaline phosphatase (FosAl) were evaluated. For the

experimental phase, subjects were sorted out in two groups: control (n=11) and experimental (n=21) according to their troops. The experimental group was supplied with a commercial product of agave inulin (Metlin®) at a concentration of 1gr/ml ensuring an intake of at least 8 gr of inulin per day. After 22 months, a blood test was performed again. The results of the CT scan were statistically analyzed by ANOVA and Tukey's test to determine differences in the bone density of the individuals. To determine differences in Ca, P and FosAl concentrations, ANOVA was used for the initial concentrations and 3-way ANOVA for the final concentrations and their interaction with the variables. Results: The BMD of the population was obtained, and the proportions of trabecular bone and cortical bone for each age group, 7 osteopenic subjects were also determined. Both the control group and the experimental group did not show significant differences in the initial concentrations of Ca, P and FosAl. In the final concentrations, significant differences were observed in Ca and P, but not in FosAl. Conclusions: Our results suggest that in Rhesus monkeys, inulin intake as a dietary supplement has a positive effect on bone health, favoring Ca homeostasis through its absorption and consequent increase in bioavailability, potentially stopping bone resorption processes. More specific studies are recommended to verify the effect of this prebiotic on bone health. Key words: Bone Mineral Density, calcium, agave inulin, prebiotics, non-human primates, Rhesus macaques.

## CONTENIDO

CONTENIDO .....	ix
Lista de Tablas.....	xi
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Gráficas .....	xiii
Lista de abreviaturas .....	xiv
I.  INTRODUCCIÓN.....	1
II.  ANTECEDENTES.....	8
1  La importancia del calcio (Ca) como nutriente.....	8
1.2  Metabolismo del Ca .....	9
2  Remodelación y densidad ósea.....	12
3  Osteoporosis.....	14
3.1  Fisiopatología .....	15
3.2  Epidemiología.....	18
3.3  Factores de riesgo.....	20
3.4  Clasificación de la osteoporosis.....	22
3.5  Técnicas de diagnóstico .....	24
3.6  Tomografía Axial Computarizada (TAC) .....	25
4  Prebióticos .....	27
4.1  Fructooligosacáridos (FOS).....	32
4.2  Inulina.....	34
4.3  El papel de los prebióticos tipo inulina en la absorción de Ca .....	38
4.4  Modelos animales.....	43
5  Los primates no humanos (PNH) como modelo en el estudio de la osteoporosis.....	46
III.  PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	50
IV.  HIPÓTESIS .....	50
V.  OBJETIVOS .....	50
1  Objetivo General .....	50
2  Objetivos Específicos.....	50
VI.  MATERIAL Y MÉTODOS .....	51
1  Modelo de estudio.....	52
2  Tomografía axial computarizada .....	54
3  Determinación ósea y osteoporosis.....	55

4	Bioquímica sanguínea.....	56
5	Inulina .....	56
6	Análisis estadísticos.....	57
VII.	RESULTADOS .....	59
1	Tomografía axial computarizada .....	59
2	Determinación de Osteopenia y Osteoporosis en los individuos de la muestra .....	65
3	Bioquímica sanguínea.....	65
3.1	Efectos en los niveles de Ca con relación al tratamiento, al grupo de edad y al sexo..	66
3.2	Efectos en los niveles de P con relación al tratamiento, al grupo de edad y al sexo....	71
3.3	Efectos en los niveles de Fos Al con relación al tratamiento, al grupo de edad y al sexo. .....	76
3.4	Efecto del tratamiento en los sujetos osteopénicos. ....	78
VIII.	DISCUSIÓN.....	79
IX.	CONCLUSIONES .....	98
X.	RECOMENDACIONES.....	102
XI.	REFERENCIAS .....	103
XII.	ANEXOS.....	131

## Lista de Tablas

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de osteoporosis (OMS)

Tabla 2. UH de hueso completo en la población estudiada

Tabla 3. Proporción de hueso cortical y hueso trabecular por grupo

Tabla 4. Hueso Compacto (UH>700) en individuos osteopénicos

Tabla 5. Niveles iniciales en los grupos control y experimental

Tabla 6. Estadística Descriptiva para Ca

Tabla 7. ANOVA de tres vías para diferencia en las concentraciones de Ca

Tabla 8. Estadística Descriptiva para P

Tabla 9. ANOVA de tres vías para diferencia en las concentraciones de P

Tabla 10. Estadística Descriptiva para FosAl

Tabla 11. ANOVA de tres vías para diferencia en las concentraciones de FosAl

Tabla 12. Estadística descriptiva para sujetos osteopénicos.

Tabla 13. T-student en sujetos osteopénicos.

## Lista de Figuras

Fig. 1 Homeostasis del Calcio en un adulto sano a lo largo de 24 horas

Fig. 2. Estructura química de la inulina

Fig. 3. Estructura molecular de la inulina del agave

Fig. 4. Mecanismos a través de los cuales el microbioma intestinal puede beneficiar al hueso

Fig. 5. Repartición de grupos de acuerdo a tratamiento, grupo de edad y sexo.

Fig. 6. Línea del tiempo de las actividades realizadas durante el proyecto

Fig. 7. Segmentación de UH en el fémur

Fig. 8. Renderización del método de aproximación triangular para el hueso cortical

Fig. 9. Fémur segmentado

Fig. 10. Media y desviación estándar de UH de fémur completo

Fig. 11. Media y desviación estándar de hueso trabecular

Fig. 12. Media y desviación estándar de hueso cortical

## Lista de Gráficas

Gráf 1. Diferencia de Ca x tratamiento

Gráf 2. Diferencia de Ca x tratamiento x grupo de edad

Gráf 3. Diferencia de Ca x tratamiento x grupo de edad

Gráf 4. Diferencia de Ca x sexo x grupo de edad

Gráf 5. Diferencia de P x tratamiento

Gráf 6. Diferencia de P x grupo de edad

Gráf 7. Diferencia de P x tratamiento x sexo

Gráf 8. Diferencia de P x sexo x grupo de edad

## Lista de abreviaturas

AGCC	Ácidos Carboxílicos de Cadena Corta
AMMOM	Asociación Mexicana de Metabolismo Óseo y Mineral
APREXBIO	Applied Research in Experimental Biomedicine S.A. de C.V.
Ca	Calcio
Cb	Hueso Cortical
CI3M	Centro de Investigación en Instrumentación e Imagenología Médica
CICUAL	Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
DE	Desviación estándar
DEXA	Densitometría ósea con rayos X
DMO	Densidad Mineral Ósea
DPA	Densitometría Fotónica Dual
DPD	Deoxipiridinolina excretada
ENT	Enfermedades Crónicas no Trasmisibles
FOS	Fructooligosacáridos
FosAl	Fosfatasa Alcalina
GP	Grado de Polimerización
HU	Unidades Housfield
IDR	Ingesta Diaria Recomendada
IOF	Fundación Internacional de Osteoporosis
IPS	International Primatological Society
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
NIH	National Institutes of Health Consensus

OMS	Organización Mundial de la Salud
OPG	Osteoprotegerina
P	Fósforo
pH	Potencial de Hidrógeno
PNH	Primates No Humanos
PTH	Paratohormona
RANK	Receptor activador para el factor nuclear kappa B
RANKL	Ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa B
SXA	Densitometría Radiológica Monoenergética
TAC	Tomografía Axial Computarizada
Tb	Hueso Trabecular

## I. INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es la enfermedad ósea más común en los humanos, representando un creciente y serio problema en la salud pública mundial (Khosla y Hofbauer, 2017). El debilitamiento óseo coadyuva a un mayor riesgo de fractura; las fracturas osteoporóticas están asociadas a una mayor morbilidad y mortalidad (Aziziyeh y cols., 2019). Su prevalencia se incrementa con la edad principalmente en la vejez y es particularmente elevada en las mujeres postmenopáusicas, aumentando su incidencia proporcionalmente a la transición demográfica mundial (Vijayakumar R y Büsselberg D, 2016; Cabrera-Pivaral y cols., 2018; Aziziyeh y cols., 2019). Se estima que alrededor del 40% de las mujeres y el 14% de los hombres mayores a 50 años, presentarán una fractura osteoporótica en el resto de su vida (Cheng y cols., 2019).

Si bien el proceso de envejecimiento poblacional ocurrió en un lapso de dos siglos en países industrializados y desarrollados, está sucediendo muy rápido en México. La expectativa de vida al nacimiento aumentó casi 39 años en promedio en las últimas siete décadas (de 36,2 a 75 años). La población del segmento etario de 60 años y más, que actualmente asciende a 10,7 millones, aumentará a 36,4 millones en 2050. En ese momento, la expectativa de vida promedio de México será de 82 años (Zanchetta José y cols., 2012).

Las recomendaciones universalmente aceptadas para el manejo clínico incluyen: Proporcionar información sobre el riesgo de desarrollar este padecimiento; recomendar ingesta adecuada de calcio (Ca) (1000 mg/día para hombres 50-70 años; 1200 mg/día para mujeres mayores de 51 años y hombres mayores de 71) y de

vitamina D (800-1000 IU/día); recomendar ejercitarse regularmente; evaluar factores de riesgo y ofrecer alternativas (incluyendo el monitoreo cuidadoso de medicamentos antidepresivos y/o antihipertensivos y de correctores visuales) y aconsejar dejar de fumar y disminuir la ingesta de alcohol; para el diagnóstico se recomienda medir la estatura anualmente, evaluar la densidad mineral ósea (DMO) y analizar marcadores bioquímicos de resorción ósea; una vez confirmada la patología se comienza la terapia farmacológica (Cosman y cols, 2014; NICE, 2017; Rizzoli, 2019a). En México hay disponibles varios tipos de medicamentos para el tratamiento de la osteoporosis, sin embargo, hay tan solo un programa oficial para la prevención de la osteoporosis dirigido a los derechohabientes del IMSS, el cual considera estos lineamientos generales no farmacológicos (Torres-Arreola y cols., 2018). Sin embargo, este protocolo está dirigido a mujeres peri y postmenopáusicas y a hombres mayores de 60 años, sin enfatizar la importancia de estas medidas preventivas para el resto de la población.

La osteoporosis ha sido definida operacionalmente con base en la DMO siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) basados en el T-Score, los cuales han sido ampliamente aceptados dado que proveen tanto un diagnóstico como un umbral para determinar la severidad de la pérdida de DMO, implicando que la DMO debe ser evaluada antes de considerar cualquier tratamiento (OMS, 2007).

La técnica de evaluación no invasiva mayormente empleada es la densitometría ósea por rayos X (DXA), introducida comercialmente a partir de 1987, sin embargo, los resultados arrojados son calculados a partir de una imagen bidimensional por lo que

no reflejan la densidad volumétrica real sino la densidad general de un área (Genant y cols., 2009). Nuestro grupo de trabajo ha probado la eficiencia y precisión de la Tomografía Axial Computarizada (TAC) para la investigación, así como la posibilidad de usar los valores de UH obtenidos como unidad de medida para evaluar la densidad ósea (Solís-Chávez y cols., 2018),

Los estudios sobre la ingesta promedio de Ca y estado general de la salud ósea en México son escasos. A nivel federal se cuenta con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), y aunque sus resultados son utilizados como una herramienta diagnóstica para permitir al gobierno federal la implementación de nuevas acciones en temas de Salud Pública (Shamah y cols., 2017), los cuestionarios son modificados cada vez que son aplicados. De esta manera, la ENSANUT del 2012 tuvo un marcado enfoque hacia la nutrición de la población mexicana y, a partir de ella se determinó que la ingesta de Ca fue inadecuada en 25.6% de los infantes entre 1-4 años; en el 60% en infantes de entre 5-11 años, siendo aún mayor la deficiencia en niñas (74.6%) particularmente en condiciones de pobreza (55.2%); en adolescentes se presentó la mayor deficiencia en ingesta con un 88.1% para mujeres y 71.8% para hombres y en adultos mayores de 20 años, fue de un 90% en mujeres y 54% para hombres (Sánchez-Pimienta y cols., 2016). A pesar de estos resultados, el enfoque de la ENSANUT-MC 2016 fue medir el desempeño de la Estrategia Nacional para la Prevención y Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes, por lo cual, la ingesta de Ca y problemas relacionados no fueron considerados. Finalmente, aunque aún no han publicado los documentos analíticos sobre la ENSANUT 2018, la cual incluye a

toda la población, en el diseño conceptual y los cuestionarios aplicados, no se hace referencia a: Osteoporosis, Fracturas, Ingesta de Ca como suplemento ni ingesta de Ca en general (Shamah y cols., 2017) no obstante, en los análisis ya publicados sobre la ENSANUT 2018-100K, la cual tiene representatividad en localidades menores de 100,000 habitantes, principalmente indígenas y de escasos recursos; los resultados sobre prevalencia de anemia señalan a un 23% de niños entre 1-4 años (De la Cruz-Góngora y cols., 2019) y un 34.3% de las mujeres entre 12-49 años (Mejía-Rodríguez y cols., 2019), esto es importante ya que algunas investigaciones señalan que el Ca juega un papel importante en la modulación de la absorción de otros nutrientes (Skibsted, 2016; Boranat y cols., 2017). Asimismo, de acuerdo al análisis de los resultados derivados de la ENSANUT 2018-100K, con respecto a las lesiones accidentales no fatales, los resultados indican que dentro de la población mayor a 60 años 6.27% de los hombres y 6.57% de las mujeres reportaron “Caídas” (caída a nivel piso o caída de un nivel a otro), aunque estos resultados no determinan el grado de la lesión derivado del evento, los datos analizados representaron a 64,027,104 personas las cuales componen el 52% del total de la población en México; esta población se compuso por un 48.30% de hombres y 51.6% mujeres y, dentro del grupo etario de mayores de 60 años, 13.15% de los encuestados fueron hombres y 12.45% mujeres (Hidalgo-Solórzano y cols., 2019) esto indica que en poco más de la mitad de la población, alrededor de 261,793 hombres mayores de 60 años en México y 270,736 mujeres pertenecientes a un grupo etario con riesgo de fracturas, han sufrido lesiones no mortales por caídas.

El tracto gastrointestinal tiene un papel importante en la salud del sistema esquelético pues es aquí donde se lleva a cabo la absorción de Ca. Se ha demostrado que el microbioma intestinal puede afectar la densidad ósea y, por ende, la fuerza del hueso (McCabe y cols., 2015) debido a sus efectos en el metabolismo del hospedero, en la función inmune y en la secreción hormonal (Li y cols., 2019). Estas funciones del microbioma intestinal se observan en todos los humanos, sin embargo, la composición y equilibrio, en cuanto a diversidad y proporción, es única para cada individuo (Rinninella y cols., 2019). La disbiosis se refiere a la alteración de este equilibrio, ya sea por el tipo de nacimiento, genética, la ingesta de agentes patógenos, el uso de antibióticos y otras interacciones medicamentosas, estrés, envejecimiento o hábitos dietéticos (Walker, 2017), lo cual puede provocar un malfuncionamiento y ha sido asociada a procesos inflamatorios y enfermedades crónicas como síndrome de colon irritable, cáncer colorrectal, enfermedad celíaca, problemas cardiovasculares, obesidad, diabetes tipo II, Alzheimer, Parkinson, encefalopatía hepática, síndrome de ovario poliquístico y osteoporosis (Brown y cols., 2012; Butel y cols., 2012; Walker, 2017, Li y cols., 2019; Rinninella y cols., 2019; He y cols, 2020).

Con respecto a la salud ósea, se ha observado que la abundancia de actinobacterias del género *Bifidobacterium*, se relaciona positivamente con la densidad ósea, misma que ha sido asociada negativamente ante la abundancia de Firmicutes o Endobacterias cuya proliferación desencadena respuestas inflamatorias y la activación de osteoclastos promoviendo la resorción ósea (Yatsonky II y cols, 2019). Asimismo, algunas investigaciones indican que los cambios en el microbioma intestinal derivado

de la ingesta de prebióticos y de probióticos, tiene efectos positivos en la absorción y transporte de Vitamina D, Ca y la reducción de marcadores de resorción ósea como la paratohormona (PTH), lo cual podría sugerir que la adición de éstos a la dieta, reduciría el riesgo de desarrollar osteoporosis (Rizzoli, 2019). Es por esto que se ha propuesto para la prevención y tratamiento contra la disminución de la densidad mineral ósea la ingesta de fructooligosacáridos (FOS) incluyendo fructanos tipo inulina, los cuales al ser fermentados por el microbioma intestinal, incrementan la cantidad de ácidos grasos de cadena corta, reducen del pH intestinal disminuyendo la cantidad de bacterias asociadas a procesos inflamatorios como *Ruminococcus sp.*, y favorecen la proliferación de bacterias benéficas, particularmente actinobacterias (*Bifidobacterium sp.*) (Holscher y cols., 2015) las que a su vez promueven la absorción de minerales, incrementado la biodisponibilidad de Ca (Yang y cols., 2013, Yatsonky II y cols, 2019) y aumentando su absorción entre 10- 25% (Madrigal y Sangronis, 2007).

Por otro lado, el empleo de los Primates No Humanos (PNH) como modelo biológico en las ciencias biomédicas y de la salud pública ha sido un elemento medular (Cruzen y Colman, 2009). Particularmente, la especie más utilizada en la investigación biomédica es el mono Rhesus (*Macaca mulatta*); se estima que la esperanza de vida en condiciones de cautiverio para estos primates es de aproximadamente de 30 años (Ibáñez-Contreras y cols., 2011). Aproximadamente el 93% del material genético es compartido con el del humano, así como múltiples características fisiológicas, anatómicas, neurológicas, endocrinológicas e inmunológicas son análogas a con *Homo sapiens* y los procesos de envejecimiento son similares (Mattison y cols., 2017),

lo cual facilita y complementa los estudios de tipo longitudinal para el conocimiento de procesos tales como desarrollo, maduración y envejecimiento, así como la fisiopatología de ciertas enfermedades tanto congénitas como propias del periodo ontogénico (Cruzen y Colman, 2009; Hernández-Godínez y cols., 2011).

Es por lo anterior es que, los PNH son un excelente modelo para el estudio de los efectos del consumo de la inulina de agave en la concentración de Ca plasmático, además de que el proceso fisiopatológico de la osteoporosis es similar en ambas especies (Cerroni y cols., 2003; Hernández-Godínez y cols., 2010; 2012). En poblaciones en cautiverio, hay un control estricto sobre las variables y la historia clínica de los individuos es conocida, estas características son factores importantes para establecer la eficacia de los tratamientos y podrían ser clave para dilucidar los mecanismos conexos a la absorción de minerales relacionados con la salud ósea. En relación a ello, el objetivo de esta investigación fue evaluar las concentraciones de calcio y fósforo en sangre antes y después de la suplementación de inulina tipo agave en la dieta de una población de monos Rhesus con densidad ósea conocida mediante Tomografía Axial Computarizada (TAC).

## II. ANTECEDENTES

### 1 La importancia del calcio (Ca) como nutriente

El Ca es el mineral más abundante en el cuerpo, más del 99% (1 -1.2 kg) de éste, se encuentra contenido en el sistema óseo y dientes. Menos del 1% es encontrado en suero (Beto, 2015). Además de proporcionar dureza al tejido óseo, es crítico en numerosos procesos biológicos como la permeabilidad de membranas, excitabilidad y conducción nerviosa, vasoconstricción y vasodilatación, actividad enzimática, mecanismos de secreción glandular y hormonal, por mencionar los más importantes (Fernández y cols., 2011). El Ca contenido en el tejido óseo, principalmente como cristales de hidroxapatita, sirve como reservorio y fuente de Ca para las necesidades metabólicas críticas mencionadas antes, a través del proceso de remodelado óseo (Ross y cols., 2011). A su vez el Ca plasmático se encuentra fraccionado en: a) Ca plasmático no difusible: representando el 46% del Ca plasmático, unido a albúmina y globulinas y b) Ca plasmático difusible en sus fracciones ionizada y no ionizada. El Ca ionizado representa el 47.5% del total del Ca plasmático y es la porción biológicamente activa, participa en los intercambios con hueso, riñón y tubo digestivo. Mientras que el Ca difusible no ionizado es el 6.5% del total del Ca plasmático y se encuentra formando complejos con bicarbonatos, fosfatos, citratos y sulfatos (Fernández y cols., 2011). En el caso de los complejos amorfos formados por fosfato de Calcio (CaP) se ha observado que, en sus enlaces con Magnesio (Mg), son importantes no solo como precursores de la apatita, imprescindible para la

mineralización de huesos y dientes, sino que también en el intestino delgado (en la zona distal del yeyuno e íleo), estas partículas tienen una función en el sistema inmune como la capacidad de atrapar macromoléculas o regular la acción de las células T y su unión con proteínas, como al albúmina, puede evitar la formación de agregados de calcio en órganos como el corazón o los riñones (Gelli y cols., 2019).

La regulación de las concentraciones extracelulares de Ca se encuentra bajo un control endocrino complejo por hormonas calciotropas como la 1,25 dihidroxi vitamina D (1,25[OH]<sub>2</sub>D) y la paratohormona (PTH), que influye sobre su entrada y absorción en el intestino, la excreción regulada por los riñones, y al mismo tiempo mantiene el reservorio esquelético con potencial de extracción (Tierney y cols., 1999). La homeostasis del Ca se refiere al proceso en el que el cuerpo mantiene sistemáticamente las concentraciones de Ca en suero, bajo un rango muy estrecho (9-10 mg/dL) a través de absorción intestinal, renal y deposición ósea (Weaver y Peacock, 2019).

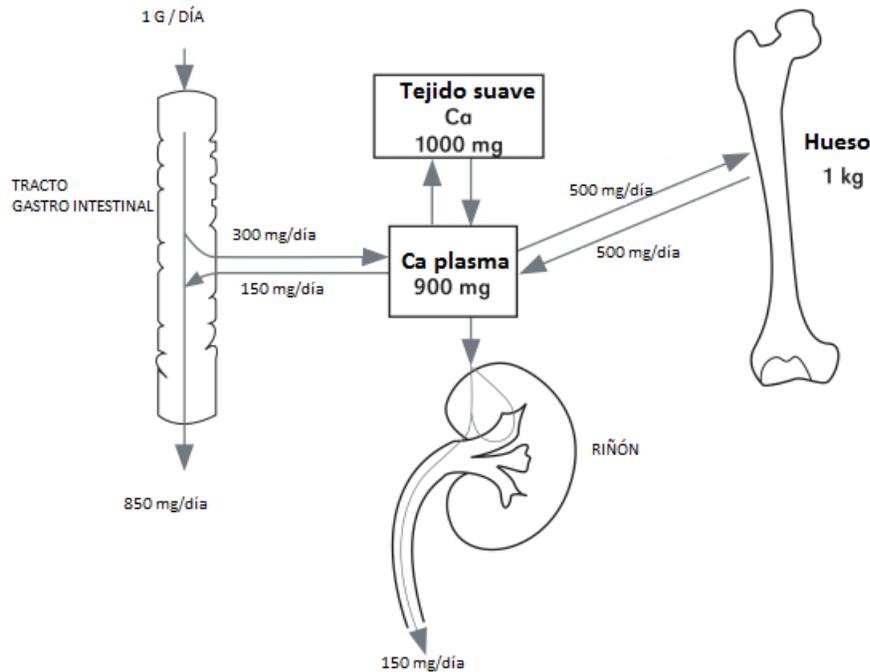
## 1.2 Metabolismo del Calcio

La única fuente de Ca es a través de su ingesta en los alimentos, y posteriormente es absorbido en el tracto gastrointestinal (Figura 1). Esta absorción es indispensable para mantener la homeostasis debido a que facilita el transporte desde el lumen intestinal hasta el espacio extracelular (Cao y cols., 2020). Una dieta promedio balanceada aporta de 600mg – 1000mg al día (Ross y cols., 2011) y otros 200 mg pertenecen a secreciones endógenas (Cao y cols., 2020); la eficacia en la

absorción diaria es alrededor del 30% (200-300 mg) en adultos jóvenes (Awumey y cols., 2006), aunque este porcentaje puede variar dependiendo de distintos factores fisiológicos, como el embarazo donde, debido a los requerimientos del feto, el porcentaje de absorción aumenta (Beto, 2015) o el tipo de alimentos consumidos, ya que la biodisponibilidad aumenta cuando el Ca está bien solubilizado y es inhibida en presencia de agentes que se unen al Ca o forman sales insolubles (Gelli y cols., 2019). Si un alimento contiene compuestos que se unen al Ca o interfieren con la absorción de éste, como el ácido oxálico (presente en espinacas, remolachas y frutas) y el ácido fítico (presente en leguminosas, granos y frutos secos), entonces, se considera que la fuente de alimento es pobre en Ca (Ross y cols., 2011, Weaver y Peacock, 2019). Por otra parte, en los riñones el Ca es reabsorbido eficientemente gracias a la filtración renal, ya que de 10g filtrados al día, sólo se excretan alrededor de 150-200mg (Mundy y Guise, 1999; Cao y cols., 2020).

Si la concentración de Ca en suero baja del rango normal (8.5 a 10.2 mg/dL), rápidamente se activa una respuesta de emergencia para evitar hipocalcemia, interviniendo para esto, el intestino delgado proximal, los riñones y el hueso, regulados principalmente por la hormona paratoidea, la calcitonina y la vitamina D o calcitriol (Fernández y cols., 2011). El recambio de Ca óseo representa aproximadamente la mitad del recambio de Ca total en una persona adulta a través del proceso de modelado y remodelado óseo, siendo este mecanismo altamente sensible y de pronta respuesta para el mantenimiento homeostático (Peacock, 2010) Se ha demostrado que en mujeres adolescentes, los procesos de remodelado óseo responden a la

ingesta diaria de Ca, así pues, en dietas deficientes o excesivas, la formación de hueso se mantiene constante pero la resorción ósea es inversamente proporcional a la ingesta (Cao y cols., 2020).



**Fig. 1 Homeostasis del Calcio en un adulto sano a lo largo de 24 horas.**

Por lo general, la acumulación de mineral óseo es igual a la reabsorción mineral del esqueleto, y el contenido de calcio en la orina se aproxima al de la absorción intestinal neta. Al ingerir 1g de calcio al día, el 30% es absorbido en el tracto gastrointestinal. Debido a que la secreción intestinal de calcio es relativamente constante a 150 mg por día, la absorción neta de calcio es de aproximadamente 150 mg por día para un adulto sano con un balance de calcio normal. El calcio absorbido desde el intestino entra en la sangre y es filtrado por el riñón. La mayoría del calcio filtrado (> 98%) se reabsorbe en los túbulos renales proximales; Así, solo se excretan 150 mg por día en individuos sanos (Adaptada de Mundy y Guise, 1999).

## 2 Remodelación y densidad ósea

El sistema óseo es un tejido dinámico que posee la capacidad de adaptarse a las influencias mecánicas a las que se encuentra sometido, variando tanto su microestructura interna como su forma externa (Luque, 2009). Este proceso de formación-resorción ósea es denominado remodelación ósea y permite 1) asegurar la adaptación esquelética en cuanto a su forma y función; 2) reparar las microfracturas; 3) mantener la homeostasis de Ca en suero (Ferrari, 2019).

La composición en peso de la matriz ósea es de un 10% de agua, 65% de minerales como fosfato y carbonato de calcio y 20% de materia orgánica, principalmente colágeno y fibronectina. Los minerales que forman parte de la matriz ósea se encuentran depositados en una red formada por las fibras de colágeno. El proceso por el cual estas sales minerales se depositan y cristalizan en la red, se denomina calcificación (Luque, 2009). Esta combinación de colágeno y Ca hace que el hueso sea fuerte para soportar cargas y a la vez flexible, además funge como reserva en tanto que contiene más del 99% del Ca en el cuerpo; el restante 1% circula en sangre; siendo este último responsable para determinar la remodelación ósea (Hardam y Limbird, 2003) mediante la actividad de osteoblastos, osteoclastos (Dempster, 2003) y el conjunto parathormona - vitamina D, principales encargadas de la regulación del Ca en el cuerpo (absorción, excreción o agregación al hueso) (Roschger y cols., 2003; Zhou y cols., 2003).

La diferencia entre el volumen de hueso formado y el de hueso resorbido, por unidad de tiempo, se denomina balance óseo. Si la resorción y formación son idénticas

el balance es igual a cero y el volumen total del hueso (masa ósea) no variará en función del tiempo. Si la formación y la reabsorción no son iguales, la masa ósea se modificará en sentido positivo o negativo (Luque, 2009).

El modelamiento óseo ocurre durante toda la vida, sin embargo, en humanos, es sólo hacia la tercera década de edad que el remodelamiento óseo es balanceado. La masa ósea alcanza su densidad máxima en la tercera década de edad (Kini y Nandeesh, 2013), acumulando por un periodo de alrededor de 20 años una tasa promedio de 97 mg por día o 35 g por año; a partir de los 40 años se instaura un balance negativo y la masa ósea disminuye de manera progresiva comenzando el decaimiento del Ca en la matriz ósea. En el hombre, la pérdida se realiza a una velocidad constante (0.5% anual) mientras que en la mujer se acelera tras la menopausia (Bosscher y cols., 2006; Luque, 2009) por consiguiente la edad, el género y la raza son factores clave no modificables, que intervienen en la pérdida de densidad mineral ósea. Dentro de los factores modificables se encuentran la ingesta de Ca, desórdenes hormonales, falta de exposición al sol, tratamiento con corticosteroides y condiciones intestinales que disminuyen la capacidad de absorción de nutrientes que influyen en la mineralización del hueso y que pueden derivar en el desarrollo de osteopatologías como la osteoporosis (Kini y Nandeesh, 2013; McCabe y cols., 2015; Cao y cols., 2020)

### 3 Osteoporosis

La osteoporosis es un trastorno común en el que los huesos se debilitan, principalmente a medida que envejecen las personas (Kanis, 2002; 2008; 2019). De acuerdo con el National Institutes of Health Consensus (NIH) (2001), la osteoporosis se define como un trastorno esquelético caracterizado por baja masa ósea, y por una microarquitectura ósea deteriorada, con el consecuente incremento de la fragilidad ósea y un mayor riesgo de fractura. La osteoporosis representa la enfermedad metabólica ósea más frecuente y constituye un problema de salud pública mundial. Su importancia clínica radica en las fracturas y consecuencias médicas, sociales y económicas asociadas a la enfermedad que ocasionan un gran impacto en la calidad de vida e independencia funcional de hombres y mujeres (Torres-Arreola y cols., 2013). Algunas deficiencias dietéticas como una pobre ingesta de Ca, déficit o exceso de fósforo (P) y déficit de vitamina D, tasas de resorción ósea mayores a la formación de hueso; cambios hormonales y la combinación de estas distintas afecciones pueden promover una estructura ósea debilitada (Office of the Surgeon General (OSG), 2004). También se ha observado que el microbioma intestinal puede tener funciones críticas en el metabolismo óseo, en cuanto a la absorción y transporte de nutrientes (como Ca y vitamina D), sistema inmune y actuando sobre el sistema endócrino (Xu y cols., 2017; Li y cols., 2018; Zhang y cols., 2018).

El estado intermedio entre el hueso sano y el hueso frágil es denominado osteopenia, definida como la disminución en la masa ósea sin llegar a ser crítica como en la osteoporosis (Cosman y cols., 2014). En México, se ha reportado que el 30% de

los hombres y el 43% de las mujeres presentan osteopenia en la columna lumbar, y el 56% y 41% de hombres y mujeres, respectivamente, presentan osteopenia femoral (International Osteoporosis Foundation (IOF), 2012).

El criterio para la caracterización de la osteoporosis y osteopenia, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (1994) se basa en la densidad mineral ósea (DMO) a partir de la densitometría ósea con rayos X (DEXA) y se expresa como DMO absoluta (g/cm<sup>3</sup>) (Cummings y cols., 2002). Se clasifica de acuerdo a la desviación estándar (DE) respecto al promedio normal de una población; para lo cual se utiliza como referencia la escala "T-score" (Tabla 1).

**Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de osteoporosis (OMS)**

<b>Valoración</b>	<b>Valor de DMO*</b>
Normal	T-score >-1 DE
Osteopenia o densidad ósea baja	T-score < -1 y >2.49 DE
Osteoporosis	T-score <-2.5 DE
Osteoporosis grave	T-score <-2.5 DE + fractura

\*T-score: Valor de DMO comparado con valor medio del adulto joven expresado en términos de desviación estándar (DE) (OMS, 1994).

### 3.1 Fisiopatología

En la osteoporosis, la tasa neta de resorción ósea supera a la de formación del hueso, provocando una reducción de la masa ósea y alteraciones en la microestructura ósea, particularmente la reducción o el debilitamiento de la trabécula, disminuyendo el

número de puentes trabeculares, provocando el adelgazamiento cortical y aumentando la porosidad cortical (Ferrari, 2019).

Estas alteraciones son principalmente el resultado del remodelamiento óseo que, como se mencionó con anterioridad, responde tanto a la adquisición y mantenimiento de la masa ósea, como a la regulación de las concentraciones de Ca extracelular. Además del complejo vitamina D-PTH, las hormonas sexuales también son extremadamente importantes en la regulación del crecimiento esquelético y el mantenimiento de la masa ósea y la fuerza del hueso. Los estrógenos favorecen el crecimiento óseo y actúan sobre los osteoclastos y osteoblastos para inhibir la resorción del hueso durante todas las etapas de la vida y es posible que también estimulen la formación ósea. En mujeres, el descenso de estrógeno en sangre después de la menopausia se acompaña de una pérdida acelerada de hueso; en hombres, el envejecimiento también provoca un descenso tanto de estrógenos como testosterona afectando la salud ósea (OSG, 2004).

A nivel celular, los osteoclastos son células multinucleadas osteoespecíficas que se diferencian de células madre hematopoyéticas similares a las que dan origen a los macrófagos. Los osteoclastos, se adhieren a la superficie del hueso produciendo y secretando ácido clorhídrico (HCl) y enzimas proteolíticas (particularmente metaloproteasas) y catepsina K, acidificando y digiriendo la matriz ósea y liberando minerales y colágeno; la señalización necesaria para inducir la diferenciación de osteoclastos son el Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa B (RANKL) (citoquina regulada por

acción de los estrógenos) la cual se une a su receptor RANK. Para controlar la diferenciación de osteoclastos, los osteoblastos producen osteoprotegerina (OPG), un receptor que actúa como señuelo uniéndose al RANKL y, por lo tanto, regulando inversamente la osteoclastogénesis (Eghbali-Fatourechí y cols., 2003, Ferrari, 2019).

La hormona paratiroidea (PTH) es otra de las principales hormonas implicadas en la pérdida ósea, sus receptores PTH/PTHrP se expresan en los osteoblastos y son parte de la señalización para la promoción de la osteoclastogénesis. Las concentraciones de esta hormona se elevan cuando hay una ingesta deficiente de Ca, deficiencia de Vitamina D, falla renal crónica o hiperparatiroidismo (Ferrari, 2019).

Los osteoblastos son las células óseas que, una vez que están totalmente diferenciadas, sintetizan la matriz ósea (principalmente constituida por colágeno tipo I) y la mineralizan por la activación de la deposición de cristales de hidroxapatita, la cual a su vez se activa por la fosfatasa alcalina (FosAl). Aún no hay suficiente evidencia para asegurar que la senescencia afecta la capacidad de estas células para activar dicha señalización (Seeman, 2005).

Aunque el control hormonal es indispensable para entender la homeostasis del Ca, también hay intercambios físico-químicos entre el fluido óseo y el plasma, los cuales pueden ser importantes para determinar el punto de equilibrio (concentración neta de Ca en suero estable) amortiguando la fluctuación causada, por ejemplo, por las cargas de Ca en dieta o por la destrucción ósea causada por enfermedad (OSG, 2004).

### 3.2 Epidemiología

La osteoporosis, cuando es diagnosticada a tiempo, es prevenible y tratable, pero la falta de signos de alerta previos a la aparición de fracturas conlleva a que pocos pacientes sean diagnosticados en fases tempranas y tratados adecuadamente (Castel y cols., 2001).

A nivel mundial los estudios epidemiológicos consideran la prevalencia de la osteoporosis como un problema de salud pública importante, ya que representa la enfermedad metabólica ósea más frecuente, la cual pertenece al grupo de enfermedades crónicas no transmisibles (ENT) y su importancia radica en las fracturas y consecuencias médicas, que ocasionan un grave impacto en la calidad de vida e independencia funcional del paciente, costos de atención e incremento en la mortalidad de los pacientes (Hervás, 2006; Cosman y cols., 2014).

Se calcula, que a nivel mundial aproximadamente 200 millones de personas padecen osteoporosis (Schurman y cols., 2013), por ende, la OMS la ha clasificado como el quinto problema de salud a nivel global (OMS, 1994; 1996).

La osteoporosis está relacionada con 8.9 millones de fracturas al año a nivel mundial (Johnell y Kanis, 2006), de las cuales 4.5 millones ocurren en América Latina y Europa, además las fracturas están asociadas con una morbilidad significativa. Las implicaciones socioeconómicas de la osteoporosis adquieren trascendencia clínica, considerando que las fracturas de cadera tienen una tasa de mortalidad del 20% al primer año, mientras que las fracturas vertebrales tienen una prevalencia de 19.5% e incremento de la mortalidad a 5 años (Mendoza-Romo 2003; González y cols., 2009).

Por otro lado, México está enfrentando una transición demográfica con un aumento de población etaria mayor de 60 años y un incremento en la esperanza de vida. De acuerdo con las estimaciones para el año 2050 el 37% de la población superará los 50 años y el 14% tendrá 70 años o más; por lo cual se estima un aumento del 531% en fracturas osteoporóticas de cadera en un periodo de 50 años, representando en cifras 20,725 casos en 2005 a 110,055 casos en 2050 implicando un incremento en el costo en salud pública (Clark y cols. 2010; Torres-Arreola y cols. 2013; Clark y cols., 2018) que podría llegar a ser insostenible. Es por ello que el 6 de septiembre del 2017 se publicó en el Diario Oficial de la Federación, como parte del Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018 y del Programa sectorial de Salud (2013-2018) el Proyecto de Norma Oficial Mexicana para la Prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica de la osteoporosis (PROY-NOM-049-SSA2-2017). Siendo este el primer paso oficial en donde México reconoce la osteoporosis como un problema de salud pública.

De acuerdo a la proyección económica de Aziziyeh y cols. (2019), el costo económico para México relacionado a las fracturas osteoporóticas será alrededor de 411 millones de dólares anuales para 2022 (al tipo de cambio promedio de marzo del 2018) dividiéndose en: costos de hospitalización (~211 millones USD); pérdidas en productividad (~71.5 millones USD); cirugías (~68.7 millones USD); pruebas diagnósticas (~37 millones USD); medicamentos (~22.5 millones USD).

### 3.3 Factores de riesgo

La osteoporosis es un padecimiento multifactorial, por lo cual la incidencia a padecerla está determinada por diversas condiciones como la edad, sexo, déficit estrogénico, etnicidad, peso, alimentación, ubicación geográfica, congenicidad (Rosen, 2017), y de manera secundaria por factores tales como tratamientos con glucocorticoides, tabaquismo, obesidad, desórdenes intestinales (incluyendo insuficiencias y fallas), diabetes mellitus, artritis reumatoide, enfermedades del hígado, intolerancia al gluten, mieloma múltiple y otros desórdenes hematológicos (Nygaard y cols., 2017).

La densidad ósea muestra diferencias con relación al sexo, las mujeres presentan una densidad ósea menor que los hombres de la misma raza y después de la menopausia comienza un decremento más acelerado de dicha densidad ósea. Además, la incidencia de fracturas es dos a tres veces mayor que en los hombres (González y cols., 2009; Schurman y cols., 2013), mientras que aproximadamente 30% de fracturas de cadera y 20% de fracturas vertebrales por osteoporosis se encuentran en los hombres (Ducharme, 2010).

La edad es el factor de riesgo más importante, ya que la probabilidad de sufrir algún tipo de fractura aumenta a partir de los 50 años; la mayoría de las mujeres menores de 50 años presenta una DMO normal, a la edad de 80 el 27% desarrolla osteopenia y el 70% padece de osteoporosis en cadera, columna lumbar o antebrazo (González y cols., 2009). El riesgo de fractura en hombres de más de 50 años en el resto de su vida es entre 13-30% y la proporción de mortalidad como consecuencia de

fracturas de cadera en hombres mayores de 70 años es tres veces más grande que en mujeres (Geunsens y van den Bergh, 2019).

Se han reconocido factores de riesgo relacionados con el estilo de vida, como la baja ingesta de calcio y vitamina D, además del sedentarismo (González y cols., 2009; Schurman y cols., 2013). Por otro lado, una baja exposición a la luz solar lleva a una disminución del metabolismo de vitamina D y, por tanto, una disminución en la fijación de calcio en huesos (OSG, 2004). Se ha reportado que, algunos fármacos pueden ocasionar osteoporosis secundaria, como los glucocorticoides, que causan desmineralización en el hueso trabecular durante el primer año de tratamiento (Soen, 2009).

En la población mexicana, los niveles de vitamina D y de Ca se conocen sólo parcialmente; Clark y cols. (2010) reportaron que, tras la evaluación de cuestionarios en estudios epidemiológicos, los mexicanos consumen, en promedio, mucho menos Ca que lo establecido por las recomendaciones internacionales para este tipo de nutriente. Respecto a la vitamina D, diversos estudios han mostrado que, en México, entre el 23-62% de los pacientes pediátricos presentan insuficiencia y entre el 16- 20% deficiencia y en la población mayor de 14 años se descubrió que el 46.8% presentaba deficiencia y el 43.6% insuficiencia (IOF, 2012).

La Asociación Mexicana de Metabolismo Óseo y Mineral (AMMOM) y la Fundación Internacional de Osteoporosis (IOF) estimaron que 1 de cada 3 mujeres y 1 de cada 8 hombres mayores de 50 años están en riesgo de sufrir alguna alteración en la DMO (Lago y cols., 2008) y que la DMO varía significativamente de acuerdo con

la región de la población estudiada (IOF, 2012). De igual forma, se ha reportado que en México la prevalencia de osteoporosis en adultos es del 17.9% de los cuales el 79.8% son mujeres y el 20.1% son hombres. En esa misma muestra, se observó osteopenia en el 34.5% de los pacientes (76.1% mujeres y 23.8% hombres) de los cuales 39% correspondieron a mayores de 60 años. Lo anterior brinda un panorama del alcance del problema en nuestro país (Lago y cols., 2008). La fragilidad y las fracturas en huesos que derivan de la osteoporosis ocupan el segundo lugar de atención quirúrgica en el Instituto Mexicano del Seguro Social (Lago y cols., 2008).

En la población mexicana se ha encontrado una predisposición familiar a este padecimiento; un estudio realizado a tres generaciones encontró que existía una asociación entre las densidades óseas de cada una de las generaciones, con una tendencia a ser iguales en las mujeres relacionadas (Lazcano-Ponce y cols., 2009). Incluso se ha señalado a la pobreza y al estrato social, durante la historia de vida de una persona, como predisponentes para presentar osteoporosis en la adultez (Clark y cols., 2005).

### 3.4 Clasificación de la osteoporosis

La osteoporosis generalizada, también llamada sistémica o primaria, es el tipo más frecuente. A pesar de su nombre, no afecta la totalidad del esqueleto, pero sí presenta una distribución simétrica. Se clasifica en primaria y secundaria. La forma primaria, constituye el grupo más amplio, llamada “osteoporosis involutiva”, comienza en la etapa media de vida volviéndose más común con el incremento de la edad.

Existen tres tipos de osteoporosis primaria: osteoporosis idiopática juvenil y del adulto joven, osteoporosis postmenopáusica tipo I y osteoporosis senil tipo II (Mendoza-Romo, 2003; Bartl y Bartl, 2019).

La osteoporosis idiopática juvenil afecta a niños y adolescentes de 8 a 14 años, se manifiesta por lo general por fracturas de compresión en las vértebras acompañada de dolor de espalda severo; el trastorno remite por sí solo en muchos casos y la recuperación ocurre de forma espontánea en el transcurso de 4-5 años. La osteoporosis ideopática del adulto joven afecta a individuos de ambos sexos con función gonadal normal, entre 30-50 años de edad, aunque se presenta con mayor frecuencia en varones, usualmente fumadores crónicos. Presentan disminución de la DMO del hueso trabecular que puede permanecer a bajos niveles durante varios años. La evolución de la patología es variable (Mendoza-Romo, 2003; Bartl y Bartl, 2019).

Osteoporosis postmenopáusica. Tipo I: Ocurre en el subgrupo de mujeres posmenopáusicas de 51 a 75 años, se relaciona directamente con la pérdida de función gonadal y se caracteriza por una pérdida acelerada y desproporcionada de hueso trabecular en comparación con hueso cortical. Las fracturas vertebrales y del radio son complicaciones frecuentes. Hay disminución de la actividad de la hormona paratiroidea para compensar el aumento de la resorción ósea (Mendoza-Romo, 2003).

Osteoporosis senil. Tipo II: Se detecta en algunas mujeres y varones de más de 70 años como consecuencia de un déficit de la función de los osteoblastos. Otros factores etiopatogénicos son: sedentarismo-inmovilización, mala absorción de calcio, menor insolación y trastornos nutricionales que ocasionan déficit de vitamina D e

hiperparatiroidismo secundario. Se asocia con fracturas de cuello femoral, porción proximal del húmero y pelvis, por afectarse tanto el hueso cortical como el trabecular.

La osteoporosis secundaria, también llamada osteoporosis regional o localizada, representa menos del 5% de los casos. En este grupo están todos aquellos casos de osteoporosis que son una consecuencia o bien una manifestación concomitante de otras enfermedades o de sus tratamientos (Mendoza-Romo, 2003) como inactividad/inmovilización; síndrome de edema de médula ósea; síndrome de Gorham-Stout o enfermedad del hueso evanescente, entre otros síndromes osteolíticos (Bartl y Bartl, 2019).

### 3.5 Técnicas de diagnóstico

La resistencia ósea puede ser definida analizando la DMO y la calidad del hueso. Actualmente no es posible analizar el grado de deterioro del tejido óseo en un entorno clínico, por lo cual, el diagnóstico de la osteoporosis se establece mediante la medición de la DMO, que puede predecir hasta el 70% del riesgo de fractura (Moyad, 2003), o por la ocurrencia de fracturas espontáneas en ausencia de traumatismos mayores (Sözen y cols., 2017).

La masa ósea puede evaluarse a través de métodos directos e indirectos. La histomorfometría es el método directo más antiguo pero sus limitaciones respecto a ser un método restringido, invasivo, lento y costoso lo han relegado de la práctica clínica. Los métodos indirectos de evaluación de la masa ósea pueden ser cualitativos

(radiología simple), semicuantitativos (índices radiológicos), radiogrametría (índices de Nordin-Barnet) y cuantitativos a través de técnicas densitométricas axiales como la densitometría fotónica dual (DPA), la tomografía axial computarizada (TAC) y la densitometría radiológica de doble energía (DXA) o periféricas como la densitometría radiológica monoenergética (SXA) (Gómez Alonso y cols. 2004).

La radiología simple, es ineficaz en la detección temprana de osteopenias ya que, para que la pérdida de masa ósea sea visible debe ser del 30-35% (Reich y Seidelman, 1976), mientras que todas las técnicas de evaluación indirecta cuantitativa tanto axiales como periféricas han mostrado capacidad para predecir el riesgo de fractura (Marshall y cols., 1996).

### 3.6 Tomografía Axial Computarizada (TAC)

El principio básico de la TAC, es que la estructura interna de un objeto puede reconstruirse a partir de múltiples proyecciones del mismo (Corbo Pereira, 2004). La obtención de imágenes mediante TAC se basa en la tomografía básica, con la diferencia que en vez de un pase único (o complejo) del emisor de rayos-X sobre la región de interés, se realizan múltiples pases desde distintos ángulos sobre el paciente y son grabados por uno o más elementos detectores circunferenciales los cuales son posteriormente reconstruidos por una computadora de acuerdo con sus distintos valores de atenuación en un corte axial (Wesolowski y Lev, 2005). En la TAC las imágenes son obtenidas a través de la transformación del coeficiente de atenuación original, calibrado de tal forma que el agua destilada (a condiciones normales de

temperatura y presión) se define como 0 HU, mientras que el aire se define como -1000 HU bajo las mismas condiciones, por lo tanto, la densidad de cada voxel (unidad de información gráfica que define un punto en 3D) representa la cantidad de rayos X absorbidos por un fragmento pequeño de tejido. La absorción es calculada y medida en unidades Hounsfield (HU) (Snyder y cols., 1991), en honor de uno de los creadores de esta técnica, Godfrey Hounsfield (Wesolowski y Lev., 2005).

Los coeficientes de absorción de los tejidos suaves, así como del hueso trabecular y cortical son diferentes y pueden ser usados para identificar y etiquetar cada voxel como tejido blando ( $HU < 300$ ), hueso trabecular ( $300 \geq HU \leq 700$ ) o hueso cortical ( $HU > 700$ ); usando estos umbrales, es posible segmentar y caracterizar automáticamente el hueso (Adams, 2009; Lim Fat y cols., 2011). En otras palabras, las HU son indicadores de la DMO. En las imágenes obtenidas a partir de esta técnica, el hueso cortical se observa brillante, delimitando un área más oscura, la cual corresponde a otros tipos de tejido óseo por lo cual esta técnica de diagnóstico es apropiada y altamente precisa en la detección de patologías óseas relacionadas con la disminución de la DMO (Marinova y cols., 2015).

Rüesegger y cols. propusieron la cuantificación de la densidad ósea mediante TAC en 1974 para hueso cortical y en 1976 para hueso trabecular. No obstante, la DXA se ha impuesto como la técnica más utilizada para el diagnóstico dado que los índices de radiación ionizante necesarios son menores, por lo que puede ser utilizada también para monitorear la evolución y tratamiento de la enfermedad ya que el estudio es repetible hasta cada 6 meses (en casos especiales), sin que represente un riesgo

para el paciente (Giner Ruiz y cols. 2014) y su menor costo sin sacrificar su alta precisión. Sin embargo, algunas investigaciones han mostrado que, en algunos casos, como los pacientes con osteoartritis, el diagnóstico con DXA sobreestima la DMO (Dalle Carbonare y cols. 2000); mientras que, en pacientes con obesidad mórbida o niños en edad de crecimiento, puede ser subestimada (Bachrach, 2000). Actualmente, la tecnología de diagnóstico por imágenes ha avanzado rápidamente y el tiempo de exposición a la radiación, así como la dosis necesaria para la TAC ha disminuido por lo que su uso se ha incrementado notablemente en la práctica clínica (Goo, 2012) y las ventajas de esta técnica sobre la DXA han resurgido de tal forma que varios autores han probado que es posible la determinación de la DMO de manera oportunista en pacientes que, por otros motivos, son sometidos a este estudio sin necesidad de exponerlos a una mayor radiación (Brett y Brown, 2015; Ziemlewicz y cols., 2016; Hoel y cols., 2017).

#### 4 Prebióticos

Mediante el sistema digestivo, el organismo se relaciona con el ambiente por la ingesta de alimento y la deglución accidental de células extrañas y partículas como bacterias, virus y hongos, que entran al cuerpo y se vuelven parte del microbiota intestinal, el cual se define como el material genético completo del microbioma intestinal (McCabe y cols. 2015). El tracto gastrointestinal es un tejido altamente inervado que media la digestión y absorción del contenido de los alimentos, facilitando la comunicación con los tejidos periféricos a través de diferentes vías de señalización

activadas por las moléculas generadas por el microbioma intestinal (Wishner y Castillo, 2018). En los humanos, únicamente ~10% de las células y menos del 1% de los genes son humanos, el resto proviene de los trillones de microbios que habitan el tracto digestivo (Fontana y Patridge, 2015; Rizzoli, 2019a). El microbioma intestinal juega muchos papeles esenciales en la salud humana y animal, sin embargo, su papel en la fisiología fue por un largo tiempo ignorado, por lo que se le llamó, hasta años recientes un órgano olvidado (O'Hara y Shanahan, 2006), actualmente ha sido reconocido como el mayor componente del sistema endócrino humano cuyas secreciones y actividades digestivas tienen una profunda influencia en la mayoría de los órganos (Uhr y cols., 2019), esta abundante y diversa comunidad de microorganismos con características estables y resilientes, interactúan de manera simbiótica con el hospedero realizando funciones metabólicas como la extracción, síntesis y absorción de nutrientes e inmunológicas previniendo la colonización de bacterias patógenas a través de diversos procesos de competencia interespecífica al inhibir su crecimiento consumiendo los nutrientes disponibles, produciendo bacteriocinas y secreciones peptídicas antimicrobianas, cambiando el pH intestinal y manteniendo la integridad del epitelio intestinal; igualmente, se ha identificado que actúan directamente sobre el sistema inmune del hospedero ya que poseen funciones regulatorias sobre el desarrollo, homeostasis y funciones de las células inmunes tanto innatas como adaptativas (Rinninella y cols., 2019)

La proliferación bacteriana intestinal es influenciada por la dieta, edad del individuo, sexo, condiciones de vida, localización geográfica (Rizzoli, 2019b) genética,

interacciones medicamentosas, enfermedades subyacentes y por el tiempo, considerando en este último, desde los ciclos circadianos diarios hasta la especiación y evolución, durante milenios, del microbioma asociado a una especie (Zarrinpar, 2014). El microbioma intestinal se adquiere desde el desarrollo embrionario cambiando progresivamente de acuerdo a la integración de nuevos elementos a la dieta infantil continuando estos cambios hasta la vida adulta cuando su composición se mantiene relativamente estable (Rizzoli, 2019a). Si bien esta composición es única para cada individuo, se ha observado que los phyla Firmicutes y Bacteroidetes representan el 90% de la diversidad bacteriana intestinal, mientras que el otro 10% está representado por especies de los phyla Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia (Rinninella y cols., 2019). Cualquier alteración al equilibrio de esta microbiota, se denomina disbiosis e implica cambios como a) la pérdida de microorganismos benéficos, b) la expresión de agentes patógenos o benéficos y c) la pérdida de diversidad (Walker, 2017).

Se ha descubierto que la calidad de vida en la vejez así como las condiciones asociadas a la misma, pueden ser mejoradas mediante la intervención de cambios en la dieta e intervenciones farmacológicas, esto ha permitido que se expanda la investigación en temas de medicina preventiva para enfermedades asociadas a la edad; algunos de estos estudios, tanto en animales como en humanos, han mostrado que alteraciones específicas en la dieta como: restricciones, ayunos intermitentes, frecuencia de ingesta de alimentos y consumo de prebióticos y probióticos; conllevan a cambios benéficos en la salud (Fontana y Partridge, 2015).

Los prebióticos son alimentos funcionales que se encuentran presentes naturalmente en las comidas vegetales o producidas sintéticamente por la conversión enzimática de azúcares. Las fibras prebióticas son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado y sirven como sustratos para el microbioma intestinal, dichos sustratos se hidrolizan y fermentan en la parte final del tracto digestivo (Cao y cols., 2020). Los oligosacáridos como los fructanos tipo inulina y los galactooligosacáridos son las fibras prebióticas insolubles más conocidas y más estudiadas (Wishner y Castillo, 2018).

Aunque históricamente la ingesta de oligosacáridos se ha usado para potenciar beneficios en la salud en civilizaciones antiguas en América y principalmente en Asia (Leach y Sobolik, 2010; Gibson y cols., 2017) en función de hasta 135g/día en poblaciones cazadoras-recolectoras, la agricultura trajo consigo cambios importantes en la alimentación y actualmente el consumo promedio en las civilizaciones occidentales ha caído dramáticamente, siendo de 1-4g/día en Estados Unidos y 3-11 g/día en Europa Occidental (Wishner y Castillo, 2018).

En 1907 el microbiólogo Elie Metchnikov en su libro “Sobre la prolongación de la vida: Estudios optimistas” fue uno de los pioneros en la historia moderna en atender la importancia de la microbiota intestinal, a la que denominó “microbios benéficos” así, durante la primera mitad del siglo XX se estudiaron los probióticos como *Lactobacillus* sp (Butel y cols., 2012); no fue sino hasta 1995 que se acuñó el término prebiótico para definir la actividad de esta clase de componentes como “aquellos ingredientes comestibles no digeribles que afectan benéficamente al hospedero al estimular

selectivamente el crecimiento o actividad de una o un limitado número de bacterias residentes del colon” (Gibson y Roberfroid, 1995). Tras más de 20 años de investigación en esta materia, la definición de prebiótico fue ampliada recientemente a: “Sustrato que es utilizado de manera selectiva por los microorganismos huéspedes, confiriendo un beneficio a la salud”. Aunque esta nueva definición permite la integración de otras sustancias y otros sitios de aplicación, es importante recalcar que los prebióticos intestinales, deben ser no digeribles por el hospedero, pero metabolizados por el microbioma asociada a él (Gibson y cols., 2017).

El efecto de los prebióticos intestinales, deriva en el mantenimiento del estado de salud y en la disminución en el riesgo del desarrollo de patologías, así su ingesta constituye una oportunidad de contribuir a mejorar la calidad de la dieta y la selección de alimentos que afecten positivamente en la salud y el bienestar del individuo (Abrams y cols. 2005; Abhari y cols. 2015). Coadyuvan al mejoramiento de las funciones gastrointestinales (por ejemplo, inhibición de patógenos y estimulación del movimiento intestinal), acción sobre el sistema redox y antioxidante, modulación del sistema inmune (Cagigas-Reing y Blanco-Anesto, 2002), cardiometabolismo, salud mental, prevención del cáncer, la absorción de minerales, metabolismo y biodisponibilidad de macronutrientes (principalmente glúcidos, proteínas y lípidos) y micronutrientes (vitaminas y minerales), entre otros (Gibson y cols., 2017).

La generación de productos metabólicos por acción del microbioma intestinal considerada benéfica depende de la disponibilidad de sustrato, el cual se provee en parte por los prebióticos (McCabe y cols. 2015) los cuales tienen como efecto

potencializar la actividad y proliferación de bacterias benéficas como bifidobacterias y lactobacilos (Roberfroid y cols., 2010), que producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el acetato, propionato, butirato, isobutirato; ácido láctico y otros componentes que son reconocidos por tener un papel benéfico sobre la salud; disminuyendo el pH en el colon y creando un ambiente donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer y desarrollarse (Bosscher y cols., 2006; McCabe y cols., 2015), es por ello que los prebióticos modulan positivamente la fisiología del sistema gastrointestinal. En las últimas décadas también se estudian otros efectos, como la estimulación del sistema inmunológico, la reducción del riesgo de cáncer de colon y el impacto en el aumento de la absorción de Ca y fosfatos para la salud ósea (Roberfroid, 2000; Cagigas-Reig y Blanco-Anesto 2002; McCabe y cols., 2015).

Los prebióticos son seguros y se ha demostrado que pueden ser incorporados a la dieta desde los 5 meses de edad siendo los únicos efectos adversos observados distensión abdominal, gas y mayores movimientos intestinales (Locantore y cols., 2020)

#### 4.1 Fructooligosacáridos (FOS)

En la actualidad existe una gran variedad de compuestos prebióticos que incluyen una variedad de estructuras: polidextrosa, fructo-oligosacáridos (el primer prebiótico, definido en 1995), inulina (que contiene fructo-oligosacáridos), xylo-

oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, oligosacáridos de soya, fibra dietética, entre otros (Cagigas-Reig y Blanco-Anesto 2002; McCabe y cols., 2015).

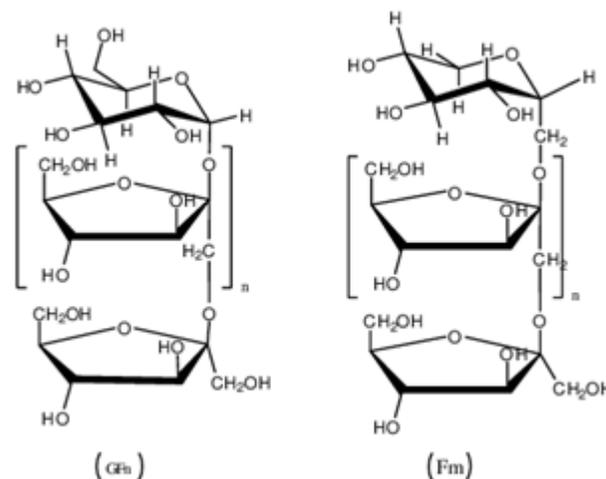
Los oligosacáridos más estudiados y reconocidos con actividad prebiótica intestinal en la actualidad son los fructanos, grupo que incluye a oligo o polisacáridos de origen vegetal o bacteriano, comprendidos por cualquier carbohidrato en el cual una o más uniones fructosil-fructuosa predominan dentro de las uniones glucosídicas (Olagnero y cols., 2007). Entre ellos los más estudiados y de mayor uso a nivel industrial son la inulina, la oligofruktosa y los fructooligosacaridos (FOS), caracterizados por sus enlaces de tipo  $\beta$ -(2-1) en el monómero terminal entre las unidades de fructosa, con un grado de polimerización (GP) típicamente de 2 a 10 unidades pero que pueden contener hasta 60 unidades, siendo el GP promedio (GPprom) de 10 a 12; presentando una estructura polimérica predominantemente lineal. Son considerados carbohidratos de cadena corta o de bajo GP (Velázquez-Martínez y cols., 2014).

Estos tipos de polisacáridos no estructurales, aunque pueden ser sintetizados químicamente, son los más abundantes encontrados en la naturaleza después del almidón y están presentes en plantas monocotiledóneas de las familias *Liliaceae*, *Agavaceae*, *Amaryllidaceae* e *Iridaceae*, así como también en algunas dicotiledóneas de las familias *Compositae*, *Boraginaceae*, *Malpighiaceae*, *Primulaceae*, *Styracaceae* y *Violaceae*, además en hongos tipo *Aspergillus* spp. y en bacterias, en las cuales prevalece el fructano del tipo levano, también llamadas flevínas (Meier y Reid, 2012).

## 4.2 Inulina

La inulina es un fructano polidisperso que consiste en una mezcla de oligómeros y polímeros mayores formados por uniones  $\beta$ -(2-1) o  $\beta$ -(2-6) fructosil-fructosa (Petkova y cols., 2013).

Es un carbohidrato de reserva energética presente en más de 36,000 especies de plantas, siendo uno de los mejores oligosacáridos utilizados por su efecto sobre las bifidobacterias intestinales (Abou-Arab y cols., 2011; Weaver, 2015), encontrados en raíces de achicoria, cebollas, alcachofas y agaves (García-Vieyra y cols., 2014).



**Fig 2. Estructura química de la inulina.**

La inulina es un polisacárido polidisperso de la familia de los fructanos, que consiste principalmente en unidades  $\beta$ -(2-1) (F<sub>m</sub>) y una unidad terminal  $\alpha$ -glicopiranososa (1→2) (GF<sub>n</sub>). (Petkova y cols., 2013)

Una de las principales características que posee la inulina es que no puede ser hidrolizada por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal en los humanos y animales, se comporta como fibra dietética, aportando un contenido calórico reducido

(1,5 kcal/g) en comparación con los carbohidratos digeribles (4kcal/g) (Flamm y cols. 2001; Roberfroid 2007), siendo metabolizada y fermentada en el intestino grueso a través de bacterias benéficas, por ejemplo, Actinobacterias, del colon, resultando en la producción de gases (H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>) y metabolitos como el formiato, ácidos carboxílicos de cadena corta, principalmente ácido acético, propiónico y butírico, que disminuyen el pH del lumen intestinal incrementando la solubilidad de minerales como calcio, hierro y zinc (Roberfroid y cols., 1999; 2000; 2002; Cagigas–Reig y Blanco-Anesto, 2002; Coxam, 2007), siendo estos minerales de suma importancia para tejidos corporales, particularmente el Ca en la composición del tejido óseo y su dinámica de desarrollo.

La inulina se encuentra presente en plantas, vegetales, frutas y cereales, se obtiene generalmente de la raíz de la achicoria y más recientemente del agave; posee una reserva de carbohidratos polímeros de fructosa, en lugar de glucosa, más pequeños que las moléculas de almidón con una mayor solubilidad en agua (Bautista-Justo y cols., 2001). La utilización de la inulina ha sido ampliamente estudiada, siendo una de las propiedades más documentadas su comportamiento como prebiótico, estimulando el aumento de bifidobacterias y lactobacilos en el colón, con la consecuente disminución de especies como *E. coli* y *Clostridium* spp. que pueden resultar perjudiciales para el huésped (Madrigal y Sangronis 2007; Velázquez-Martínez y cols., 2014).

En México se encuentran aproximadamente 150 de las 200 especies de agave que hay en el mundo; en las piñas del agave se encuentra un alto contenido de fructosa

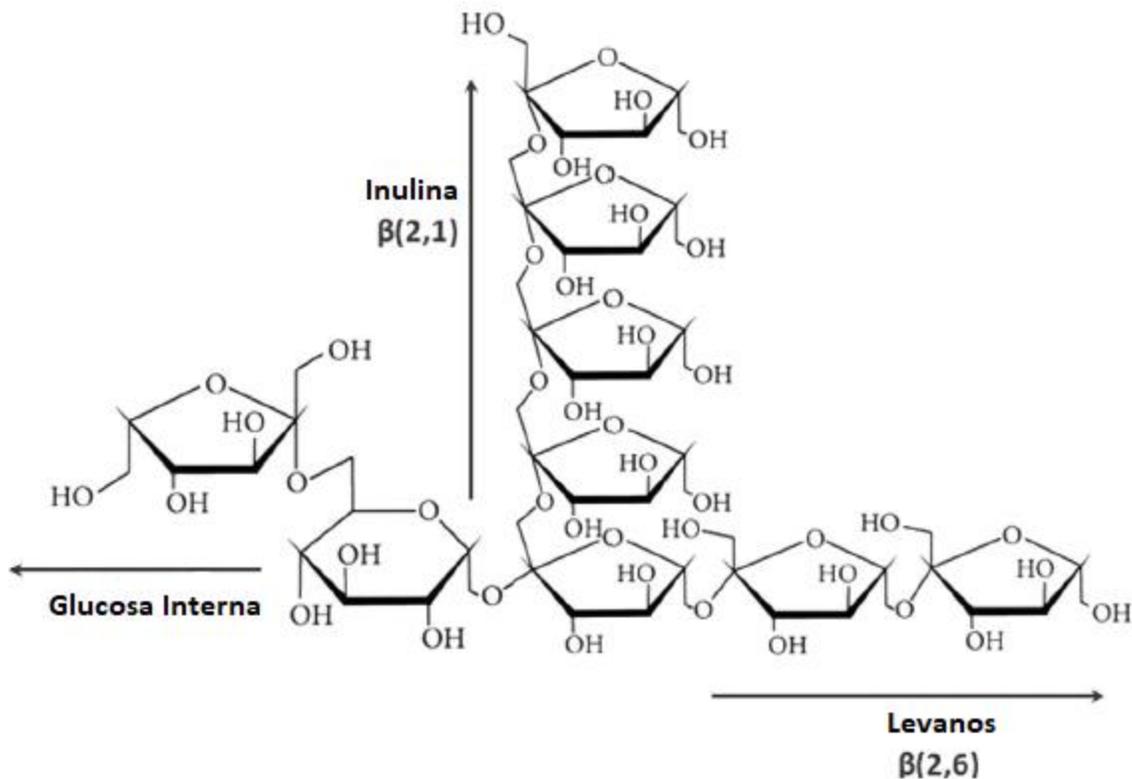
y, particularmente el agave azul (*Agave tequilana* Weaver var. azul) es una fuente de inulina ya que el 25% de la planta presenta este fructano (Rivera-Huerta, 2017b).

Macilla-Margalli y López (2006) acuñaron el término agavina para definir la inulina del agave y propusieron la estructura molecular de la misma (Figura 3). La composición de las uniones glicosídicas en los fructanos de *A. tequilana* varían de acuerdo a la edad de la planta (Mellado-Mojica y López, 2012), con un grado de polimerización (DP) de 2-60 siendo la media 16; la importancia de tener una descripción precisa de la estructura química de estos componentes radica en que dicha estructura dicta las propiedades de los materiales derivados (Toriz y cols., 2007).

Los fructanos presentes en el agave poseen una estructura cuya molécula presenta: inulina, levanos y neoinulina. La concentración de fructanos en una planta de 6 años es de aproximadamente el 27% en la piña y en la parte inferior de las hojas. Estudios preliminares en ratones indican que este tipo de fructanos poseen características funcionales aún mayores que los de la inulina obtenida comercialmente a partir de la achicoria (Roberfroid y cols., 2000; 2002).

A nivel comercial, la empresa Nekutli S.A. de C.V. llevó a cabo la caracterización de los fructanos presentes en el Agave azul, haciendo el registro de marca de dos grupos de moléculas: FOS con un GP de 3-11 registrado como Metlos e Inulina con un GP de 12 a 60 registrada como Metlin (Rivera-Huerta, 2017b), producto usado en esta investigación.

Las propiedades físicas de los productos comerciales derivados de fructanos, se relacionan con la calidad del material crudo usado para producirlos, por lo cual, las prácticas agrícolas, las condiciones de crecimiento, el tiempo de cosecha así como las condiciones de almacenaje y procesamiento, influyen en las propiedades fisicoquímicas del producto final; así pues, la solubilidad, densidad aparente, viscosidad de la solución, dulzor relativo y apariencia, están directamente relacionadas con el grado de polimerización y las ramificaciones moleculares de la materia prima (Tungland, 2018). La inulina del agave es altamente soluble en agua (del 70-80% a temperatura ambiente y hasta el 14% a 4°C); el dulzor relativo corresponde al 10% del perceptible en la sacarosa y es termoestable al calor a un pH > 4 (Glibowski y Bukowska, 2011).



**Fig 3. Estructura molecular de la inulina del agave**

Los fructanos pertenecientes al agave, son complejos y poseen una gran cantidad de uniones glicosídicas  $\beta(2-1)$  y  $\beta(2-6)$  ramificadas, especialmente en las plantas maduras. Adaptado de: Mancilla-Margalli y López, 2006.

#### 4.3 El papel de los prebióticos tipo inulina en la absorción de Ca

Aunque los estudios, tanto en animales como en humanos demostraron que la ingesta de prebióticos conllevan claros beneficios a la salud ósea a través del mejoramiento del metabolismo de Ca, el cual fue correlacionado de una forma positiva con los cambios en las comunidades de microbiota intestinal, los mecanismos específicos por los cuales el microbioma intestinal mejora directamente la salud ósea o indirectamente a través de los cambios en el tipo de bacterias, aún están pobremente entendidos (Cao y cols., 2020).

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que las fibras prebióticas (fibro-dextrina, inulina, fructano oligosacáridos y fructanos del agave) incrementan el contenido de ácidos carboxílicos de cadena corta (AGCC) como acetato, propionato, butirato, isocutirato, valcerato e isovolerato (Trinidad y cols., 1996; Ohta y cols.; 1998; Yang y cols., 2013; García-Vieyra y cols., 2014; Weaver, 2015; Locantore y cols., 2020). Estos AGCC pueden influenciar directamente en el metabolismo óseo; se ha observado que la adición de éstos al agua incrementa el volumen trabecular y reducen el número de osteoclastos y de marcadores de resorción ósea en roedores (Rizzoli, 2019). El butirato, el cual es el sustrato energético utilizado para el metabolismo, proliferación y diferenciación celular en la mucosa intestinal (Rivera-Huerta, 2017), ha probado ser también clave en la salud ósea ya que actúa como inhibidor de la histona deacetilasa, y estimula la diferenciación de osteoblastos e incrementa la producción de sialoproteína ósea y osteoprotegerina (Rizzoli, 2019).

Existen varias propuestas dentro de los mecanismos conocidos en los que los AGCC pueden influir en la absorción de Ca (Figura 4.). En el primer mecanismo, y el más fuertemente aceptado es la producción de AGCC acidifica el pH del lumen intestinal y en consecuencia se reduce la formación de sales y compuestos, permitiendo la circulación libre de minerales solos como el Ca, Mg, Fe y Zn (Scholz-Ahrens y cols., 2007; Yang y cols, 2013; McCabe y cols. 2015; Wishner y Castillo, 2017; Cao y cols., 2020), ha sido sugerido que el sitio donde actúan los metabolitos prebióticos dentro del intestino puede tener una relación importante respecto a los beneficios directos en la salud ósea (Weaver y cols., 2010; McCabe y cols.; 2015;).

Por ejemplo, el tratamiento con fructanos del agave o inulina incrementa los niveles de una variedad de ácidos grasos de cadena corta en el ciego, pero solo acetato, propionato y butirato en el colon (Garcia-Vieyra y cols., 2014).

Como segundo mecanismo, los AGCC pueden tener una influencia directa sobre el epitelio para incrementar la absorción del Ca. La privación de hormonas sexuales incrementan la permeabilidad intestinal, permitiendo el ingreso de bacterias y antígenos a la mucosa intestinal; se ha reportado que los prebióticos incrementan el grosor y superficie de las paredes intestinales (Rizzoli, 2019), esto puede ser medido como el incremento de peso del ciego y/o histológicamente por el incremento de los *villus* intestinales en el ciego los cuales maximizan la superficie y la absorción pudiendo favorecer el transporte paracelular del Ca y aumentar las proteínas de unión para la expresión de Ca (McCabe y cols. 2015; Wishner y Castillo, 2017).

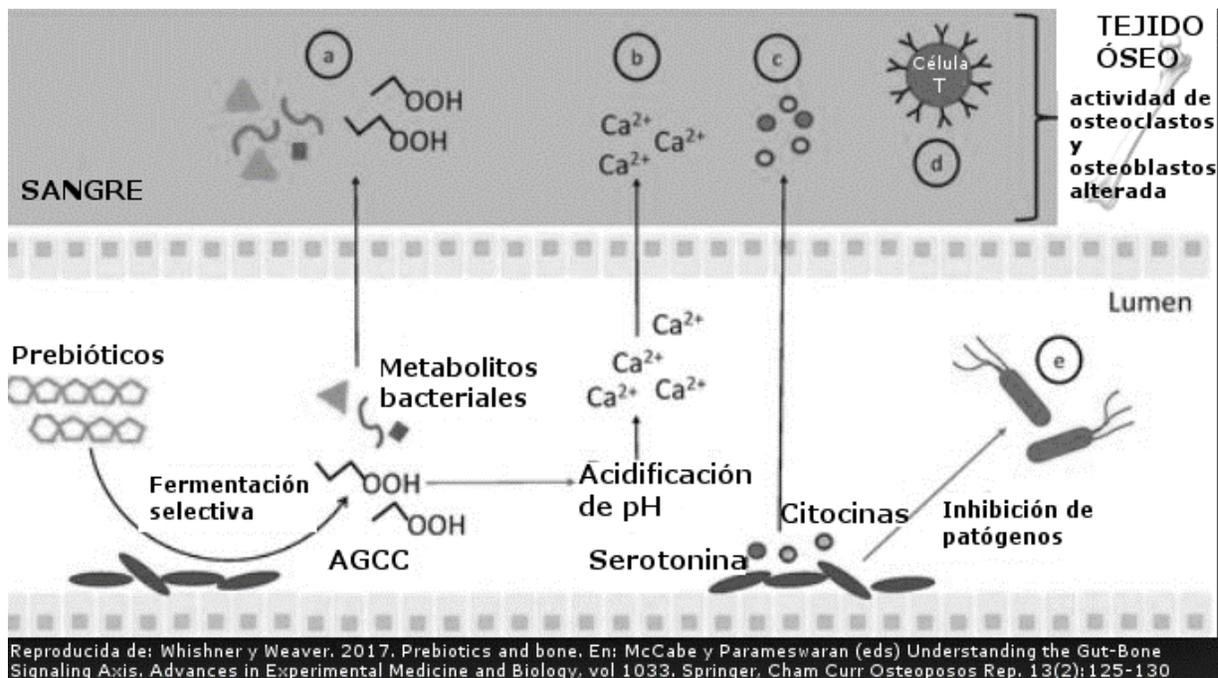
Otro mecanismo propuesto es la regulación del sistema inmune, en estudios con animales libres de gérmenes, se ha observado que éstos presentan un sistema inmune en mucosa inmaduro con menos células CD4-T, sugiriendo que el microbioma puede modular el desarrollo del sistema inmune, aunque hasta el momento no existe suficiente evidencia para relacionar directamente la relación entre estos mecanismos de señalización con los cambios inducidos con la ingesta de prebióticos (Wishner y Castillo, 2017; Rizzoli, 2019).

Asimismo, el microbioma intestinal tiene una influencia en la señalización endócrina; el incremento en la absorción de Ca reduce la producción de PTH y por lo tanto disminuye la resorción ósea; se ha demostrado en roedores libres de gérmenes

que hay una menor secreción de serotonina, la cual está relacionada a una menor formación ósea y, también, en roedores convencionales tratados con antibióticos, se presenta un decremento en marcadores de formación ósea, sin embargo, tras recibir suplementos de AGCC, reestablecieron sus niveles óseos (Wishner y Castillo, 2017; Rizzoli, 2019).

La inulina y los FOS han demostrado que cambian los números de diferentes especies de bacterias tanto en el intestino proximal como en el distal; incrementando significativamente las bifidobacterias y lactobacilos en intestino proximal, así como, incrementando las eubacterias, y disminuyendo clostridias en el intestino distal (Langlands y cols., 2004). Se cree que la estimulación de los niveles de bifidobacterias conlleva a un incremento en la escisión de conjugados de isoflavona liberando sus metabolitos, incrementando de esta forma la biodisponibilidad de fitoestrógenos (McCabe y cols., 2015).

Se sabe que la deficiencia estrogénica reduce la absorción del Ca es por ello que el efecto de los prebióticos en roedores ha sido estudiado. En ratas ovariectomizadas, tras recibir un tratamiento con FOS por un periodo de 6 semanas, se observó que no previno la pérdida ósea y al suministrarles un conjugado de FOS con isoflavonas se observó un efecto aditivo en el hueso trabecular y en la parte distal del fémur, y un incremento en actividad de la beta-glucosidasa cecal y la producción de daidzeína sugiriendo así que los FOS aumentan la biodisponibilidad de isoflavonas, dando lugar a efectos cooperativos en la prevención de la osteopenia (Ohta y cols., 2002).



**Fig. 4. Mecanismos a través de los cuales el microbioma intestinal puede beneficiar al hueso.** Las interacciones con los prebióticos pueden modificar (a) la síntesis de células inmunológicas, (b) absorción de ácidos de cadena corta, (c) producción de metabolitos benéficos o inhibitorios, (d) producción de serotonina y citocinas. La presencia de estos metabolitos en el sistema circulatorio puede influir la expresión genética en células óseas y de igual manera interactúa con las vías de señalización neuronal que afectan el tejido óseo a través de la señalización inmunológica.

En ratas Wistar, se verificó el efecto de los fructanos del agave azul al ser añadidos como suplementos a dietas con niveles normales, insuficientes y deficientes de calcio; los resultados mostraron que los iones de Ca y P se mantuvieron relativamente constantes en sangre, siendo ligeramente mayor en presencia de fructanos del agave; el contenido de Ca en hueso incrementó claramente en los grupos con este suplemento y mostraron mayor estabilidad y densidad ósea en el hueso, particularmente en el grupo con ingesta insuficiente de calcio; sugiriendo que los

fructanos de agave azul pueden ser útiles en prevenir la pérdida de densidad ósea y fuerza y en consecuencia prevenir la osteoporosis (Cieslik y cols., 2012).

García-Vieyra y su equipo (2014), demostraron que en ratas ovariectomizadas, las concentraciones de Ca en plasma y hueso, así como la osteocalcina aumentaron tras añadir en la dieta un 10% de fructanos de agave, concluyendo que el uso de este suplemento alimenticio previene pérdida ósea y promueve la formación de hueso.

#### 4.4 Modelos animales

La mayor parte de la literatura disponible que apoya los efectos benéficos que los prebióticos tienen sobre el hueso, está basada en investigaciones con animales en todas las fases del ciclo de vida en estudios *in vivo* y en cultivos celulares *in vitro* (Wishner y Castillo, 2017). En su trabajo, éstos autores presentan una revisión sobre algunas de las investigaciones con roedores, orientadas al efecto de la ingesta de prebióticos tipo inulina sobre el metabolismo del Ca y la salud ósea, los resultados mayormente reportados son los siguientes: Mayor absorción de Ca (Levrat y cols., 1991; Younes y cols., 2001; Coudray y cols., 2003 y 2005; Zafar y cols., 2004; Raschka y cols., 2005; Demigné y cols., 2008; Lobo y cols., 2009; Legette y cols., 2011 y 2012; Yang y cols., 2013; García-Vieyra, 2014; Krupa-Kozak y cols., 2017), otros resultados reportados en estas investigaciones incluyen mayor absorción de Mg, acidificación de pH intestinal, menor resorción ósea, mayor disponibilidad de AGCC, mayor peso del ciego, mayor producción de osteocalcina y mayor DMO. Otras investigaciones revisadas no analizaron la absorción de Ca, pero reportaron una mayor DMO, mayor

fuerza ósea y/o un mayor contenido de Ca en hueso (Roberdfroid y cols., 2002; Weaver y cols., 2010; Bueno-Vargas y cols., 2016).

Por otra parte, Tahara y cols. (2000) demostraron que el incremento en la absorción de Ca tras la administración de FOS se traduce a su vez en un mayor volumen de hueso trabecular femoral con una mayor concentración de minerales en el mismo. Otro estudio apoyó esta evidencia y reportó un beneficio general en la salud ósea después de tratamientos con inulina de achicoria en ratas macho en crecimiento (de 4 a 22 semanas) sin una variación significativa del efecto respecto a la edad (Roberdfroid y cols. 2002). Asimismo, en pollos de engorda, el tratamiento con inulina durante cinco semanas demostró un incremento en la mineralización y el contenido de Ca en hueso (Ortiz y cols., 2009). Sin embargo, el uso de inulina en cerdos de engorde final como modelo de estudio, la inulina no tuvo ningún efecto en la proliferación de lactobacilos o bifidobacterias, ni cambios aparentes en la mineralización ósea, así como tampoco se observó un aumento en la biodisponibilidad de minerales en el tracto digestivo en dietas cuyo contenido de inulina variaba en un radio directamente proporcional al del Ca y P (Varley y cols., 2010).

Se han realizado estudios clínicos en humanos analizando la introducción de inulina en la ingesta diaria y sus efectos en la salud ósea. Slevin y su grupo de investigadores (2014) comprobaron que un grupo de mujeres post-menopáusicas sin osteoporosis y en mujeres con osteopenia, tras ingerir un conjugado de Ca y FOS, presentaron una disminución significativa en los marcadores de fosfatasa alcalina fracción ósea, indicando una desaceleración en la pérdida de hueso, aunque sin

cambios aparentes en la densidad ósea. Abrams y su equipo (2005) determinaron los efectos biológicos de suplementar la dieta de preadolescentes de 9 a 13 años con una dosis diaria de 8g de fructanos tipo inulina durante 8 semanas y 1 año; al finalizar el periodo experimental, observaron en ambos grupos un incremento considerable tanto en el contenido mineral en todo el cuerpo, como en la densidad mineral ósea en comparación al grupo control. Aunque existen ejemplos como estos que indican la relación entre la absorción de calcio y sus efectos en la salud ósea humana, hay otros estudios cuyos resultados no prueban esta relación, algunos autores señalan que la diferencia entre las metodologías, las dosis y el tiempo son un factor importante para determinar esta relación (McCabe, y cols., 2015; Coxam, 2007) lo cual se debe, en parte, a que los mecanismos exactos del funcionamiento de los prebióticos sobre la salud ósea no están claramente definidos.

La proliferación de bacterias benéficas como lactobacilos y bifidobacterias tras el tratamiento con fructanos del agave se ha demostrado en varios estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (Ramnani y cols., 2015; Holscher y cols., 2015; López-Velázquez y cols., 2015 Koenen y cols., 2016). En un estudio clínico en humanos recién nacidos (20 +/- 7 días) se demostró que la adición de probióticos como lactobacilos y fructanos del agave Metlin y/o Metlos a las dietas infantiles de leche en fórmula, potencializa la proliferación de bifidobacterias y una reducción considerable de *Clostridium*. Respecto al metabolismo óseo (el cual se calculó cuantificando la deoxipiridinolina excretada (DPD), la cual es una hormona liberada en infantes durante la resorción ósea durante el proceso de crecimiento del hueso, por lo cual se utiliza como marcador de recambio

óseo), se observó una tendencia en el incremento de DPD en los grupos suplementados con fructanos y en el grupo control, alimentado únicamente con leche materna, aunque los resultados no fueron significativos (López-Velázquez y cols., 2015).

En muchos casos se necesita ingerir una gran cantidad de prebióticos para obtener suficiente actividad prebiótica, es por esto que algunos de ellos, como la inulina, se han comercializado en forma de cápsulas, tabletas o licuados (McCabe y cols., 2015).

## 5 Los primates no humanos (PNH) como modelo en el estudio de la osteoporosis

El uso de los PNH en las ciencias biomédicas y de la salud pública ha sido un elemento medular a lo largo de su historia, siendo las especies animales más similares filogenéticamente al humano (Cruzen y Colman, 2009). La especie más utilizada en la investigación biomédica es el mono Rhesus (*Macaca mulatta*). Se estima que el tiempo de vida de estos mamíferos es de aproximadamente de 30 años en condiciones de cautiverio (Ibáñez-Contreras y cols., 2011) lo que facilita y complementa los estudios de tipo longitudinal, para el conocimiento de procesos tales como desarrollo, maduración y envejecimiento, así como la fisiopatología de ciertas enfermedades (Cruzen y Colman, 2009; Hernández-Godínez y cols., 2011).

Desde 1987 en el Instituto Nacional del Envejecimiento (NIA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, se han estudiado los mecanismos paralelos entre el envejecimiento de los macacos y los humanos (Roth y cols., 2004). En relación a la salud ósea, se ha observado que la edad es un factor predisponente a la presencia de tumores espontáneos, presencia de osteopatologías, enfermedades cardiovasculares y cognitivas en los PNH, (Yamate y cols., 2007; Ebersole y cols., 2008; Hernández-Godínez y col., 2010 y 2012). Como se menciona en párrafos anteriores, el envejecimiento se asocia con una reducción gradual de la DMO en los hombres y las mujeres perimenopáusicas, comenzando alrededor de la cuarta década de vida. Dentro de las osteopatologías más comunes en macacos se ha descrito la disminución de la DMO. De acuerdo con Colman (1999a y 1999b) y Black y cols. (2001) que estudiaron la relación de la edad y factores como la disminución de hormonas esteroidales con la presencia de osteoartritis y osteoporosis en monos Rhesus, describen que después de la menopausia natural, las hembras Rhesus tienen una menor DMO; de la misma manera, Kessler y cols. (2016) reportaron que en Rhesus machos que han sido orquiectomizados, la osteopenia es similar a la encontrada en varones humanos que han sido a su vez sometidos a este proceso por cáncer testicular o prostático. Debido a que la osteoporosis está claramente relacionada con los cambios hormonales, estas similitudes en el sistema endócrino es una gran ventaja para el uso de este modelo (Turner y cols., 2001). Finalmente se ha observado el efecto de la maduración y envejecimiento en el contenido mineral óseo en monos Rhesus hembras en sitios análogos evaluados comúnmente en los humanos, encontrando que hasta los 11 años existe un incremento en el contenido mineral,

observándose posteriormente un decremento en monos de edades más avanzadas junto con la pérdida de longitud total del cuerpo, columna vertebral y el hueso del radio (Black y cols., 2001; Bellino y Wise, 2003; Hernández-Godínez y cols., 2010). Por su parte Cerroni y cols. (2000) encontraron que la parte inferior torácica y lumbar de los monos Rhesus son también susceptibles a las fracturas por fragilidad, en monos de edad avanzada, con presencia de osteoporosis. Colman y cols. (1999a) mencionan como conclusión de su estudio de la menopausia natural en los monos Rhesus, la disminución de la masa ósea y el aumento de transferencia esquelética, actividad que es similar a la condición humana. Los resultados muestran de manera general que, la edad a partir de la cual comienzan estas osteopatologías es aproximadamente a partir de los 9 años, siendo indistinto el sexo, existiendo una relación cronológica similar a la presentada por humanos (Hernández-Godínez y cols., 2010), condición que hace que sean el modelo más cercano filogenética y fisiopatológicamente para el estudio de los mecanismos metabólicos relacionados con la osteoporosis.

Además de las similitudes genéticas y biológicas, estos primates están bien adaptados para la investigación en condiciones de laboratorio, incluyendo crianza en cautiverio y nutrición (Roth y cols., 2004) lo cual permite mantener una constante observación sobre los individuos experimentales, así como un control estricto en las variables relacionadas a la nutrición, presentado una ventaja sobre los ensayos clínicos de este tipo con humanos. Esto es relevante ya que los principales retos en la investigación en nutrición clínica incluyen factores como la heterogeneidad de la nutrición previa a los ensayos, las dificultades para definir el grupo control apropiado,

la existencia de historias clínicas incompletas, las diferencias entre estilos de vida y actividad física y las dificultades para asegurar el seguimiento correcto de las dietas por parte de todos los individuos, principalmente en estudios de larga duración (Weaver y Miller, 2017).

### **III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La dieta suplementada con inulina tipo agave produce cambios en las concentraciones del calcio y del fósforo séricos (circulantes) en monos Rhesus con densidad ósea conocida determinada por TAC?

### **IV. HIPÓTESIS**

Si la disponibilidad de inulina tipo agave en la dieta de una población de monos Rhesus con densidad ósea conocida mediante TAC, favorece la absorción de minerales en tracto gastrointestinal, entonces, se observará un aumento en la concentración de Ca y el mantenimiento en las concentraciones de P sanguíneo.

### **V. OBJETIVOS**

#### **1 Objetivo General**

Evaluar las concentraciones de calcio y fósforo en sangre antes y después de la suplementación de inulina tipo agave en la dieta de una población de monos Rhesus con densidad ósea conocida mediante Tomografía Axial Computarizada (TAC).

#### **2 Objetivos Específicos**

- i. Determinar el estado de la densidad ósea de una población de monos Rhesus

- ii. Establecer las concentraciones de calcio (Ca) en sangre para cada individuo de una población de monos Rhesus antes y después de la administración de la inulina.
- iii. Establecer las concentraciones de fósforo (P) en sangre de cada individuo de una población de monos Rhesus antes y después de la administración de la inulina.
- iv. Establecer las concentraciones de fosfatasa alcalina (FosAl) en sangre de cada individuo de una población de monos Rhesus antes y después de la administración de la inulina
- v. Evaluar el efecto del sexo, el grupo de edad y la presencia de osteopenia, en la disponibilidad de Ca, P y FosAl después de la administración de inulina.

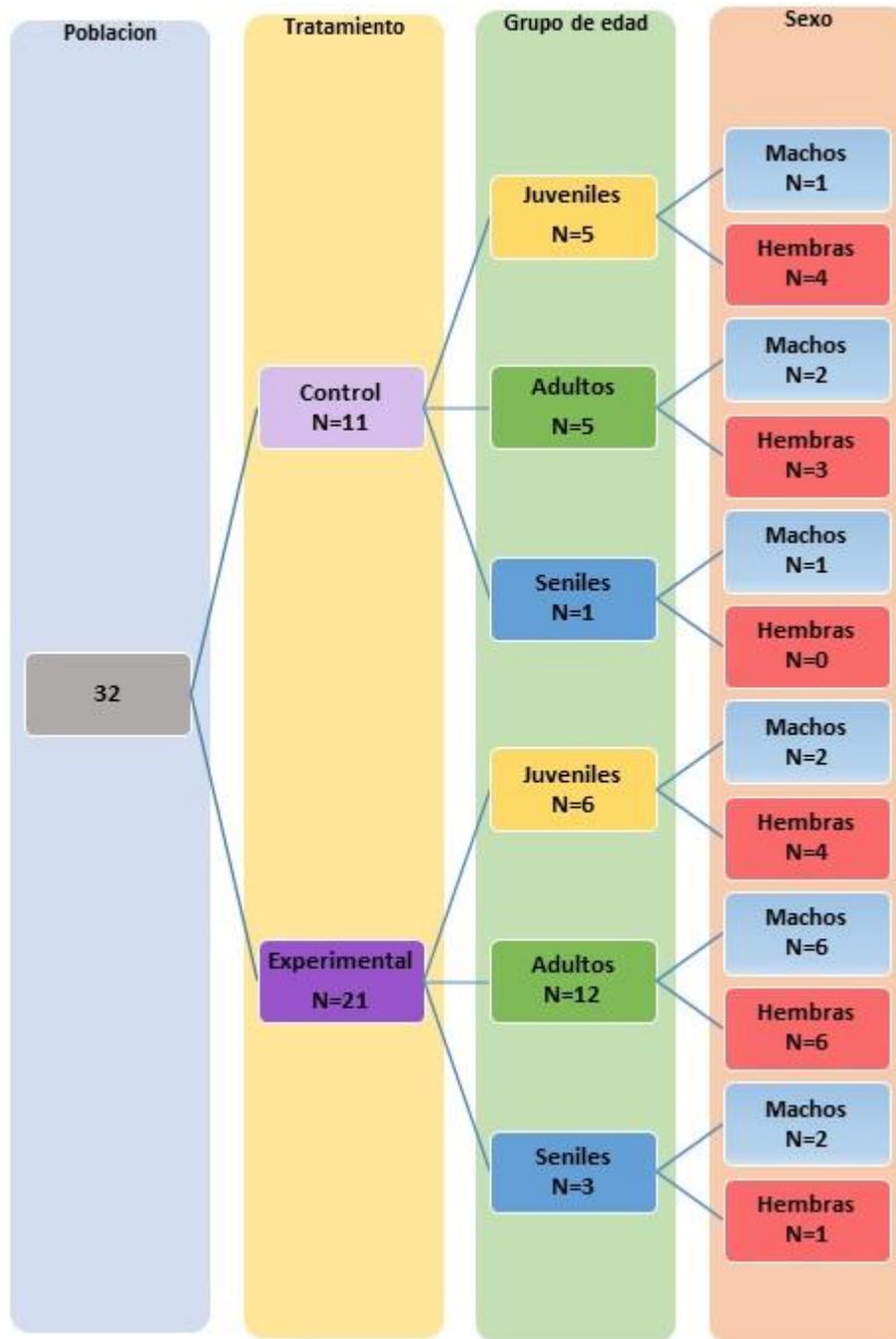
## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

La investigación se realizó de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, así como con la normatividad internacional del Código Zoosanitario Internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS), apartado de primates no humanos (PNH) y de las directrices internacionales para la adquisición, el cuidado y la reproducción de PNH del International Primatological Society (IPS). El protocolo fue aprobado por el Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) y por las comisiones de Ética e Investigación de Applied Research in Experimental Biomedicine (APREXBIO) S.A. de C.V.

## 1 Modelo de estudio

Se utilizaron 32 PNH de la especie *Macaca mulatta*, alojados en condiciones óptimas en el establecimiento del Laboratorio de Primatología de APREXBIO S.A. de C.V., el cual forma parte de los Predios e Instalaciones que Manejen Vida Silvestre (PIMVS), que cuenta con número de registro ante SEMARNAT (DGVS-PIMVS-CRIN-1014-D.F./08).

Se realizaron evaluaciones de densidad ósea mediante TAC, para evaluar la densidad de hueso en 32 PNH de la especie *Macaca mulatta* con un rango de edad de entre 5 a 28 años. La muestra fue dividida en 3 grupos, de acuerdo con la etapa ontogenética (juveniles de 5-9 años, adultos de 10-19 años y seniles de 20-28 años) para la toma de imágenes y posteriormente, de manera aleatoria (por clan familiar) en un grupo experimental (21 individuos) y un grupo control (11 individuos) para la medición de niveles de calcio en sangre antes y después de la administración de la inulina. Es importante señalar que la N de los grupos experimental y control fue determinada por la naturaleza de los clanes (familias) en que se encontraban viviendo, con la finalidad de no separar individuos de sus familias y como consecuencia alterar sus costumbres cotidianas de dinámica familiar. Todos los sujetos fueron alimentados con base en el 4% de su peso corporal, con alimento MonkeyChow Purina 5045® 25% proteína (MonkeyDiet 5038, PMI Nutrition International, St Louis, MO), 3 veces al día y agua *ad libitum*, así como suplementados con frutas de temporada. A continuación, se muestra la repartición de los grupos de acuerdo a tratamiento (por familia), grupo de edad y sexo (Figura 5). Cabe señalar que los grupos no son homogéneos en número de sujetos porque se formaron de acuerdo a sus clanes familiares.



**Fig. 5. Repartición de grupos de acuerdo a tratamiento, grupo de edad y sexo.**

Se presenta la población total de 32 sujetos, los cuales se dividieron en 11 para el grupo Control y 21 para el grupo experimental, que a su vez constaron de subgrupos por edad de juveniles, adultos y seniles cada uno. Todos los grupos de edad tuvieron sujetos de ambos sexos.

## 2 Tomografía axial computarizada

De acuerdo con el protocolo estandarizado por Solís-Chávez y cols. (2018), se utilizó un equipo de Tomografía Axial Computarizada, Marca SIEMENS (Sensation 64, SIEMENS, Erlangen, Alemania), equipado con un módulo rotatorio de bajo voltaje, un adaptador-detector UltraFast Ceramic de 64 x 1344 canales. Los estudios fueron realizados en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica (CI3M) de la UAM Iztapalapa.

Los sujetos fueron sedados con una mezcla de Tiletamina-Zolacepam (4mg/kg, Solis-chávez y cols., 2013) y colocados en posición supina con los brazos en 90°; las imágenes fueron adquiridas axialmente a lo largo de todo el espécimen con los siguientes parámetros: diferencia de potencial de 120 kV, corriente de 18 mA, diámetro de reconstrucción de 359 mm con una distancia de la fuente al paciente de 570 mm, matriz de 512 x 512, ancho de rebanada de 0.6 mm, resolución de voxel de 0.77 x 0.77 x 0.6 mm; la duración de adquisición fue de hasta 2 minutos dependiendo de la longitud de los sujetos.

El procesamiento de imagen fue realizado con el software Amira (FEI, Houston, TX, bajo la licencia Amira-Trial-YY-2016-MM-08-DD-01). Mediante la visualización del cuerpo completo se seleccionó el fémur izquierdo de todos los sujetos, esto debido a que los huesos largos son más proclives a descalcificarse y desarrollar mayor propensión a fracturas; mediante segmentación semiautomática, el área de interés fue delimitada y etiquetada para su análisis experimental.

En este trabajo, para la evaluación diagnóstica de osteopenia en PNH a través de TAC se utilizó el protocolo estandarizado por Solís-Chavez y cols. (2018). La

segmentación consistió en la selección de aquellos vóxeles del área de interés subdivididos en rangos: 300-700 unidades Hounsfield (UH) para hueso trabecular (Tb) y >700 UH para hueso cortical (Cb) (Fat y cols., 2012). La superficie y volumen de cada material óseo se determinaron mediante el método de aproximación triangular. Posteriormente la proporción de cada tejido en relación al volumen total del hueso fue extraída dividiendo el volumen del Tb/volumen total del hueso y el Cb/volumen total del hueso. Un observador independiente realizó el análisis de imagen sin tener conocimiento sobre la edad de los sujetos en el momento de la adquisición de los datos, después los otros observadores revisaron y consensaron el análisis de imagen.

### 3 Determinación ósea y osteoporosis

La determinación de la salud ósea se realizó de acuerdo a los criterios establecidos por la OMS; sustituyendo el  $T\text{-score}_{\text{DXA}}$  por  $T\text{-score}_{\text{HU}}$ , como fue previamente descrito y validado por Hendrickson y cols. (2018). Donde la Osteopenia se define como  $T\text{-score}_{\text{HU}} < -1$  y  $>2.49$  DE y la Osteoporosis como  $T\text{-score}_{\text{HU}} < -2.5$  DE. La población fue evaluada a partir del promedio de densidad ósea de hueso cortical de los adultos jóvenes (machos y hembras) de 9 a 13 años, edades donde los monos Rhesus han alcanzado ya el pico máximo de masa ósea (Colman, 1999; Colman y cols. 1999b; Cerroni y cols., 2000).

#### 4 Bioquímica sanguínea

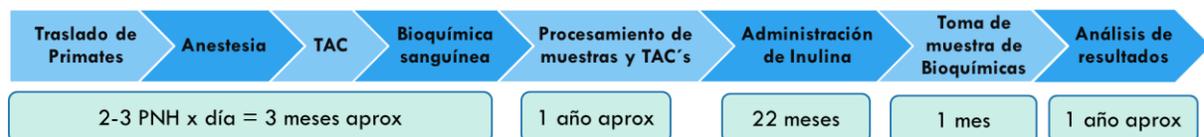
Los animales fueron sedados con Tiletamina-Zolacepam (4 mg/kg), (Solis-Chávez y cols., 2013), fueron trasladados a una mesa quirúrgica aséptica en la que se extrajeron 10 mililitros de sangre de la vena safena externa y depositada en tubos BD Vacutainer®, sin anticoagulante, centrifugados posteriormente a 8,000 rpm durante 15 minutos y de la cual se extrajo el sobrenadante de todos los sujetos, los cuales fueron enviados a los Laboratorios Orthin (Ciudad de México, México) para su análisis mediante bioquímica sanguínea y la posterior obtención de los niveles de Ca, FosAl y P. La primera muestra, se obtuvo 15 días antes de comenzar el tratamiento, al mismo tiempo que la TAC y, la segunda muestra 15 días después de la conclusión de la administración de la inulina.

#### 5 Inulina

El fructano tipo Inulina obtenido de *Agave azul (Agave tequilana Weber Var. azul)* a través de extracción en agua caliente y posterior filtrado y registrada como Metlin®, se utilizó en el presente trabajo. Esto derivado de la ventaja de tener un alto grado de polimerización (DP 10-60) y otras características que maximizan su purificación (Product Data SheetMetlin, 2007).

La inulina de agave fue administrada en agua de bebida a una concentración de 1 gr/ml, de modo que cada sujeto consume al menos 8g. de inulina al día. El tiempo de administración fue de 22 meses.

A continuación, se muestra la línea del tiempo de las actividades que se realizaron para este trabajo.



**Fig. 6. Línea del tiempo de las actividades realizadas durante el proyecto.**  
Se presentan las actividades de forma cronológica y duración aproximada década una.

## 6 Análisis estadísticos

Se analizaron los valores de UH de las imágenes de fémur mediante TAC y la proporción de cada uno de los tejidos. A estos datos, se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con la finalidad de evaluar diferencias significativas entre los grupos de edad, cotejando el cumplimiento de la igualdad de varianzas (prueba de Levene, IC 95%). La ANOVA fue seguida de un análisis pareado (Tukey, IC, 95%).

Los resultados de los parámetros bioquímicos iniciales fueron analizados en dos subgrupos, comparando el grupo control con el experimental.

Se realizó la una prueba ANOVA de una vía para evaluar las diferencias significativas de los analitos entre el grupo control y el experimental, durante la primera muestra (antes del tratamiento). A las diferencias (después menos antes del tratamiento) del Ca, P y FosAl se les aplicó una prueba ANOVA de tres vías (factores:

tratamiento, sexo y grupo de edad) para evaluar diferencias significativas entre factores, así como en sus interacciones.

Se realizó una T-student de una muestra para comparar los valores de los analitos (Ca, P y FosAl) de los sujetos osteopénicos que recibieron tratamiento (grupo experimental), contra el único sujeto osteopénico que no recibió tratamiento (grupo control).

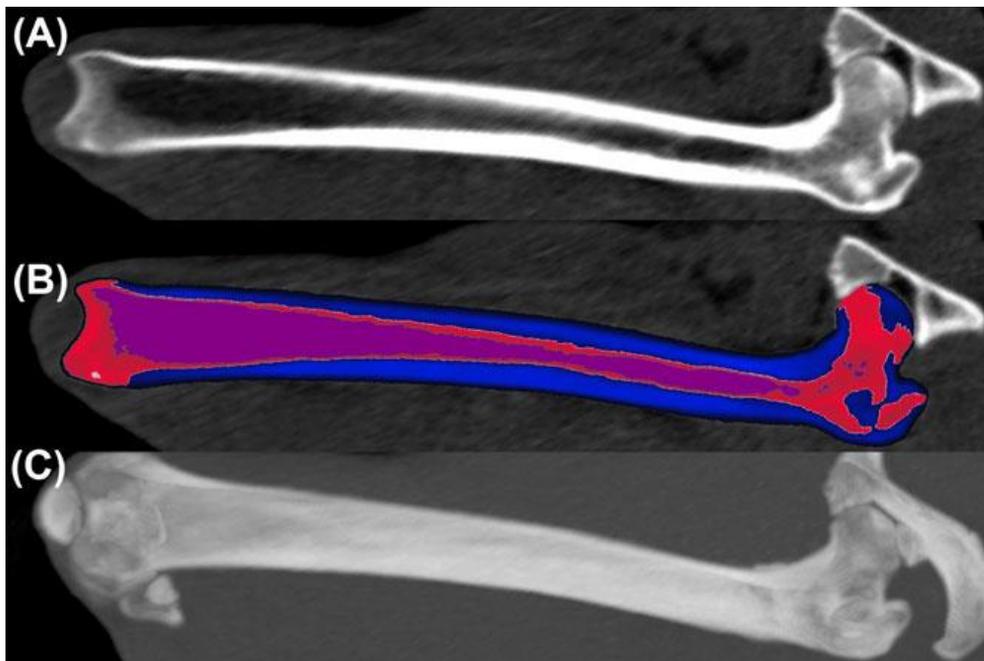
Los datos fueron analizados con los softwares SPSS en su versión 22.0 (IBM Corp, Armonk, NY, US) y NCSS en su versión 12.0.8 (NCSS, LLC, Kaysville, Utah, US).

## VII. RESULTADOS

### 1 Tomografía axial computarizada

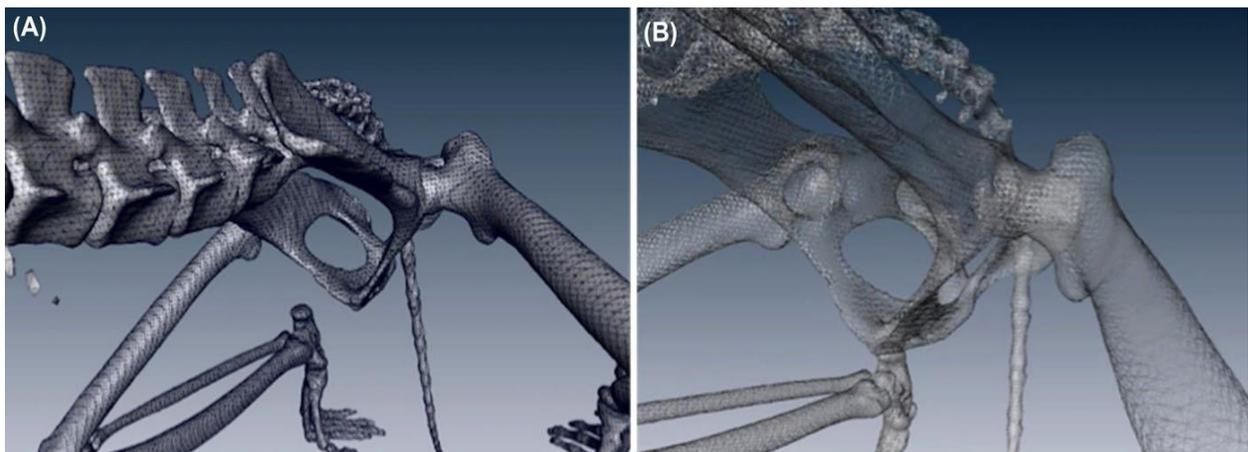
Las imágenes obtenidas de los fémures de cada sujeto fueron entre 200-400 y en un paso pre-procesamiento se observaron las áreas de interés, siendo contrastadas por un blanco intenso y un gris, definiéndose como el hueso cortical (HC) y hueso trabecular (HT) en el interior, respectivamente (Figura 7A), evidenciándose tras la asignación de un color por umbral para su segmentación (Figura 7B). La Figura 7B ejemplifica la segmentación representando el HC ( $>700$  UH) con azul, el HT ( $300 < \text{UH} < 700$ ) con rojo y morado para la médula ósea ( $\text{UH} < 300$ ); a partir de dichas imágenes se obtuvieron los coeficientes de absorción del hueso completo, donde la absorción media por grupo fue de 659.91 UH (juveniles), 694.72 UH (adultos) y 619 UH (seniles).

El resultado de la superficie renderizada por medio del método de aproximación triangular, se observa en la Figura 8, donde la malla muestra la superficie volumétrica del hueso cortical, (Figura 8A). La Figura 8B muestra los triángulos componentes del método de aproximación; la Figura 9A representa a un sujeto adulto, mientras que la Figura 9B representa a un sujeto senil, en ella es apreciable la diferencia en proporción de tejidos trabecular y compacto.



**Figura 7. Segmentación de UH en el fémur.**

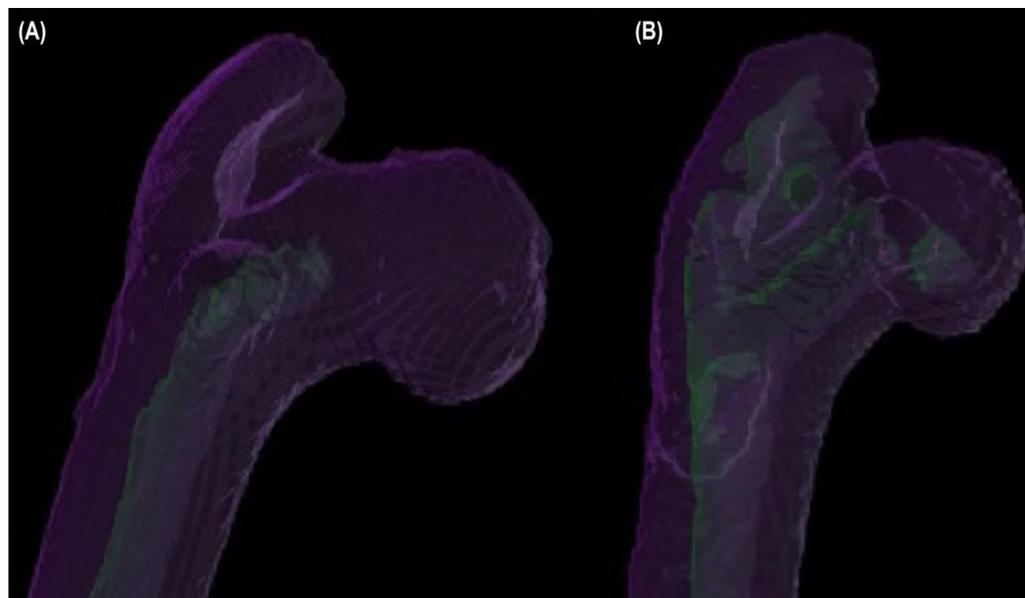
A) Imagen de TAC sin post-procesamiento en la escala de grises original. B) Segmentación semiautomática representando el hueso cortical ( $UH > 700$ ) en azul, el hueso trabecular ( $300 < UH < 700$ ) en rojo y médula ósea ( $UH < 300$ ) en morado. C) Reconstrucción de las secuencias originales, enfocadas en el fémur.



**Figura 8. Renderización del método de aproximación triangular para el hueso cortical**

A) Render del esqueleto sólido, B) Resultado del método de aproximación triangular aplicada a cada hueso segmentado.

El número de sujetos, la media, desviación estándar, valor mínimo y máximo de absorción (UH) del fémur completo se muestran en la tabla 2. Los grupos 1 (juveniles) y 2 (adultos) muestran una mayor densidad ósea, mientras que la densidad del grupo 3 (seniles) es menor (Figura 10).

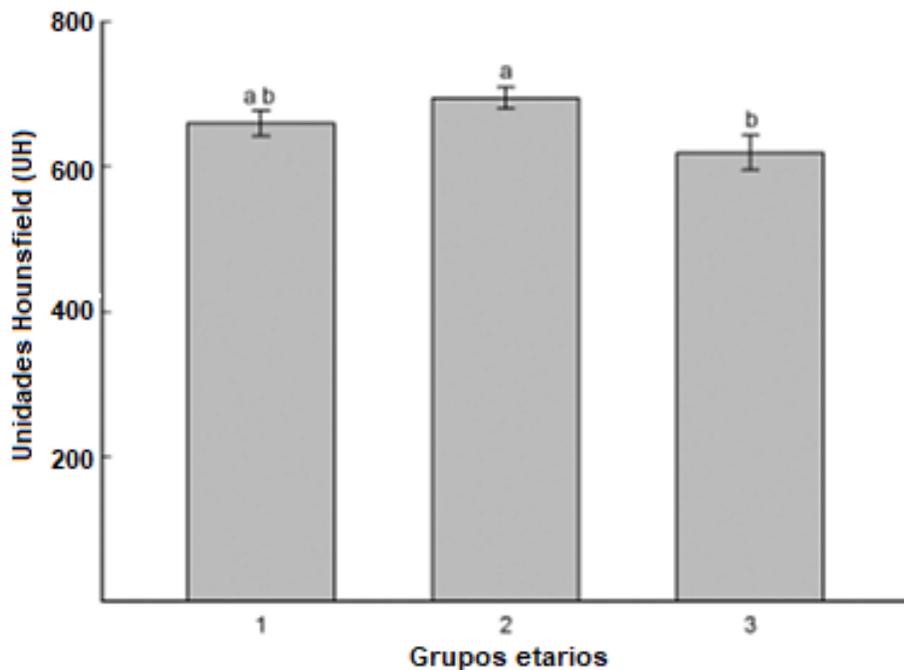


**Figura 9. Fémur segmentado**

Se observa un sujeto adulto (A) y uno senil (B) mostrando en morado el hueso cortical y en verde el hueso trabecular.

<b>Tabla 2. UH de hueso completo en la población estudiada</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
1	10	659.91	53.98	568.35	761.07
2	15	694.72	71.90	568.78	810.63
3	7	619.40	50.20	548.04	676.29

Tabla 2. Muestra grupos y número de sujetos, media, desviación estándar, valor mínimo y máximo de absorción (UH) del fémur completo en una muestra de 32 monos Rhesus divididos por grupos de edad: grupo 1 (5-9 años), 2 (10-19 años) y 3 (20-28 años). (N: número de sujetos); (DE, desviación estándar).

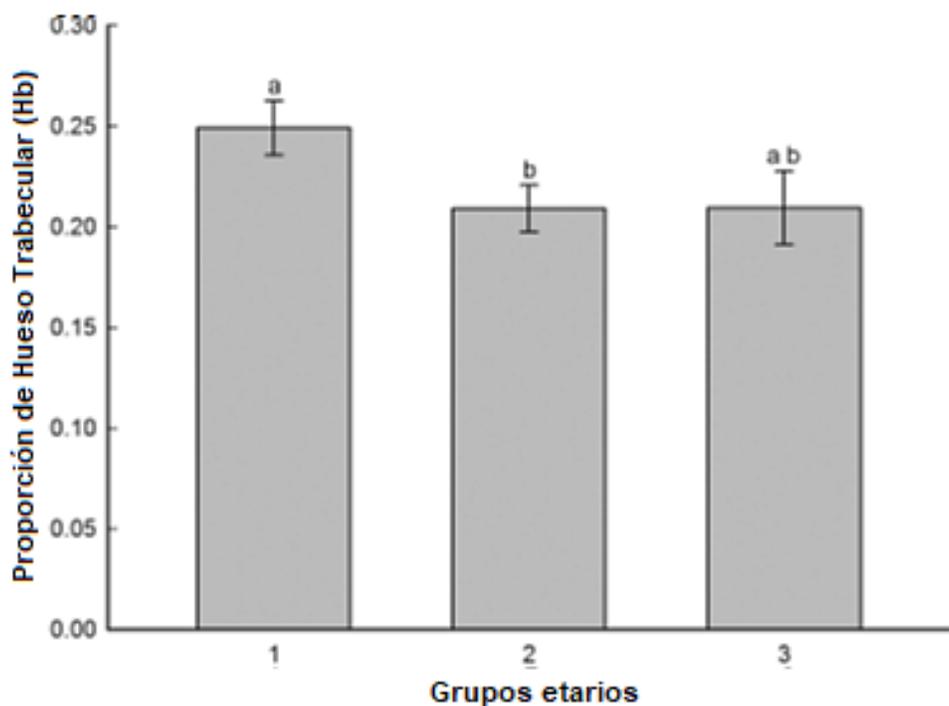


**Figura 10. Media y desviación estándar de UH de fémur completo**  
 Se muestra la media y desviación estándar de UH del fémur izquierdo completo de monos Rhesus divididos por grupo: grupo 1 (5-9 años), grupo 2 (10-19 años), grupo 3 (20-28 años). Las letras representan el análisis de la prueba de Tukey: para grupos con letras diferentes, sus medias presentan diferencias significativas, para grupo con letras iguales, sus medias no presentan diferencias significativas.

La Tabla 3 muestra el tamaño, media, desviación estándar, valor mínimo y máximo de la proporción de tejido trabecular y cortical en relación con el fémur izquierdo completo. La proporción de hueso trabecular fue mayor en el grupo 1 (valor medio de 23.94%) en comparación con los grupos 2 y 3 (valor medio de 20.9% para ambos grupos), mientras que el análisis de varianza arrojó diferencias significativas entre los grupos ( $P = 0.046$ ) (Figura 11), siendo la media del grupo 1 significativamente diferente de las medias del grupo 2 (prueba de Tukey).

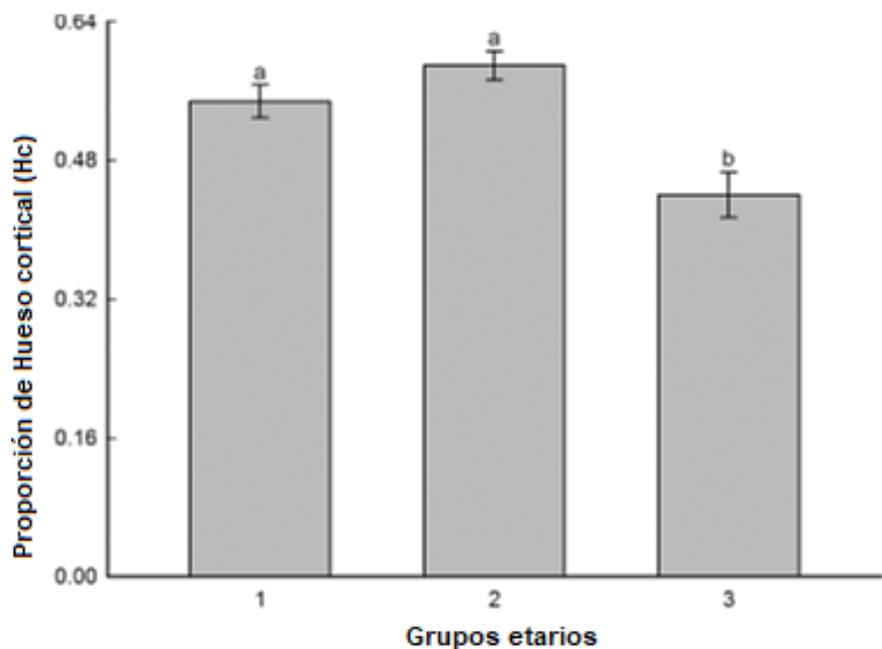
Tabla 3. Proporción de hueso cortical y hueso trabecular por grupo					
Grupo	N	Media	DE	Mínimo	Máximo
Hueso cortical					
1	10	0.5478	0.0581	0.4499	0.6429
2	15	0.5891	0.0752	0.4709	0.7041
3	7	0.4400	0.0455	0.3728	0.4871
Hueso trabecular					
1	10	0.2490	0.0467	0.1967	0.3511
2	15	0.2091	0.0394	0.1440	0.3099
3	7	0.2094	0.0310	0.3728	0.4871

Tabla 3. Grupos, número de sujetos, media, desviación estándar, valor mínimo y máximo de la proporción de hueso trabecular y cortical en relación con el volumen total del fémur izquierdo de monos Rhesus divididos en grupos: grupo 1 (5-9 años), grupo 2 (10-19 años), grupo 3 (20-28 años).



**Figura 11. Media y desviación estándar de hueso trabecular**  
 Se muestra media y desviación estándar de la proporción de hueso trabecular del fémur izquierdo de monos Rhesus dividido por grupos: grupo 1 (5-9 años), grupo 2 (10-19 años), grupo 3 (20-28 años). Las letras representan el análisis de la prueba de Tukey: para grupos con letras diferentes, sus medias presentan diferencias significativas, para grupo con letras iguales, sus medias no presentan diferencias significativas.

Por otro lado, la proporción de hueso cortical (Figura 12) en el grupo 1 fue de 54.8%, para el grupo de edad 2 es 58.9% y en el grupo 3 comprende el 44%. El análisis de varianza demuestra diferencias significativas ( $P < 0.001$ ), siendo específicamente el grupo 3 el que tiene una menor proporción de hueso compacto, en relación con los grupos 1 y 2.



**Figura 12. Media y desviación estándar de hueso cortical**  
Muestra la media y desviación estándar de la proporción de hueso cortical del fémur izquierdo de macacos Rhesus dividido por grupos: grupo 1 (5-9 años), 2 (10-19 años) y 3 (20-28 años). Se incluyen los resultados de la prueba de Tukey: para grupos con letras diferentes, sus medias presentan diferencias significativas, para grupo con letras iguales, sus medias no presentan diferencias significativas.

## 2 Determinación de Osteopenia y Osteoporosis en los individuos de la muestra

La Tabla 4 muestra los individuos que presentaron una DMO de hueso cortical mayor a una desviación estándar de la media de población estudiada, caracterizándose, por lo tanto, como individuos osteopénicos.

Grupo de edad	Edad	Sexo	Inulina	HU de HC
1 (5-9 años)	5	H	Si	1321.442
	9	H	Si	1318.585
2 (10-19 años)	10	M	Si	1310.123
	11	M	Si	1339.835
	12	H	Si	1342.686
3 (20-28 años)	23	H	Si	1320.529
	23	M	No	1344.327

	Media	1429.016
	Desviación Estándar	64.42067
	Intervalo de Confianza	1302.751
Osteopenia T-score HU <-1 y <2.49 DE		1364.595
Osteoporosis T-score HU <-2.5 DE		1267.964

Se muestran los sujetos de la población que presentan un T-score HU < -1 en comparación con la población sana. Se indica grupo al que pertenecen, edad, sexo, tratamiento y media de hueso cortical en UH.

## 3 Bioquímica sanguínea

Se analizaron las diferencias en los niveles de Ca, P y Fos Al entre los grupos control (C) y experimental (E) antes de aplicar el tratamiento (Tabla 5). No se

observaron diferencias significativas iniciales en los niveles de los analitos entre los dos grupos.

<b>Tabla 5. Niveles iniciales en los grupos control y experimental</b>				
<b>Analito</b>	<b>Prom. C</b>	<b>Prom. E</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Ca	10.54455	10.20619	0.8746	0.35716
P	5.909091	5.375714	3.1544	0.08587
FosAl	208.1818	303.7619	3.6111	0.06704

Muestra los resultados de la prueba de ANOVA de 1 vía para evaluar las diferencias significativas de los analitos en la primera muestra (antes del tratamiento) del grupo control (C) (n=11) y grupo experimental (E) (n=21).

3.1 Efectos en los niveles de Ca con relación al tratamiento, al grupo de edad y al sexo.

Como resultado de la ANOVA de tres vías para las diferencias del calcio (Tablas 6 y 7), encontramos que hay incremento altamente significativo de concentración con relación al tratamiento (Gráfica 1) y con relación al sexo (Gráfica 4); no así con relación al grupo de edad (Gráficas 2 y 3). Tampoco hay significancia para las interacciones de tratamiento-sexo, tratamiento-grupo de edad, ni para sexo-grupo de edad.

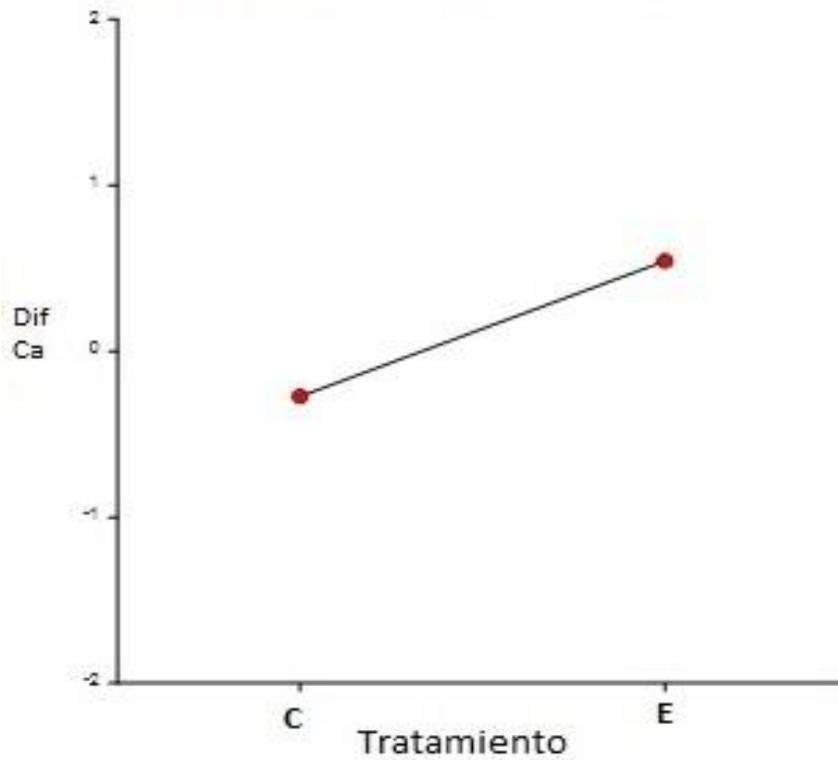
<b>Tabla 6. Estadística Descriptiva para Ca</b>						
		<b>N</b>	<b>Prom. Inicial</b>	<b>SE</b>	<b>Prom. Final</b>	<b>SE</b>
<b>Tratamiento</b>	C	11	10.544	0.293	10.454	0.3666
	E	21	10.206	0.2121	10.715	0.2653
<b>Sexo</b>	Hembras	18	10.467	0.2289	10.956	0.2733
	Machos	14	10.135	0.2596	10.2	0.3099
<b>Grupo de edad</b>	1	11	10.517	0.2956	10.727	0.3642
	2	17	10.305	0.2378	10.735	0.2929
	3	4	9.857	0.4903	9.88	0.6039

Se muestran la N, promedios iniciales (Prom. Inicial), promedios finales (Prom. Final), error estándar (SE) en relación al tratamiento (donde: control = C y experimental = E), sexo, y grupo de edad (donde: 1 = juveniles, 2 = adultos y 3 = seniles).

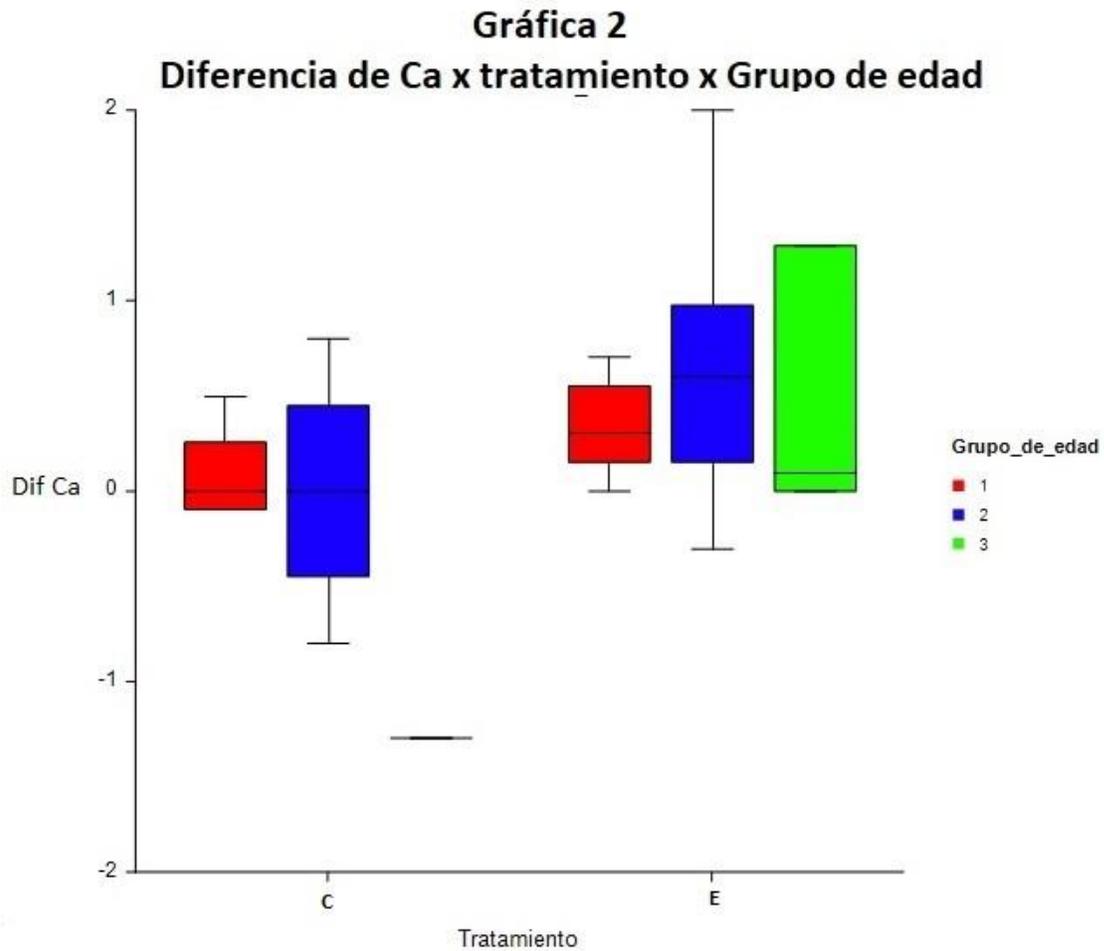
<b>Tabla 7. ANOVA de tres vías para diferencia en las concentraciones de Ca</b>					
<b>Origen</b>	<b>Tipo III de suma de cuad.</b>	<b>gl</b>	<b>Cuadrático promedio</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Tratamiento	2.535	1	2.535	11.462	<b>.003</b>
Sexo	1.212	1	1.212	5.483	<b>.029</b>
Grupo de edad	.178	2	.089	.402	.674
Tratamiento * Sexo	.020	1	.020	.091	.766
Tratamiento * Grupo de edad	.396	2	.198	.896	.423
Sexo * Grupo de edad	1.021	2	.511	2.309	.124
Error	4.644	21	.221		
Total	14.604	32			

Se muestran los resultados de la ANOVA de 3 vías para evaluar la diferencia en las concentraciones de Ca en relación a las interacciones entre tratamiento, sexo y grupo de edad.  $p \leq 0.05$

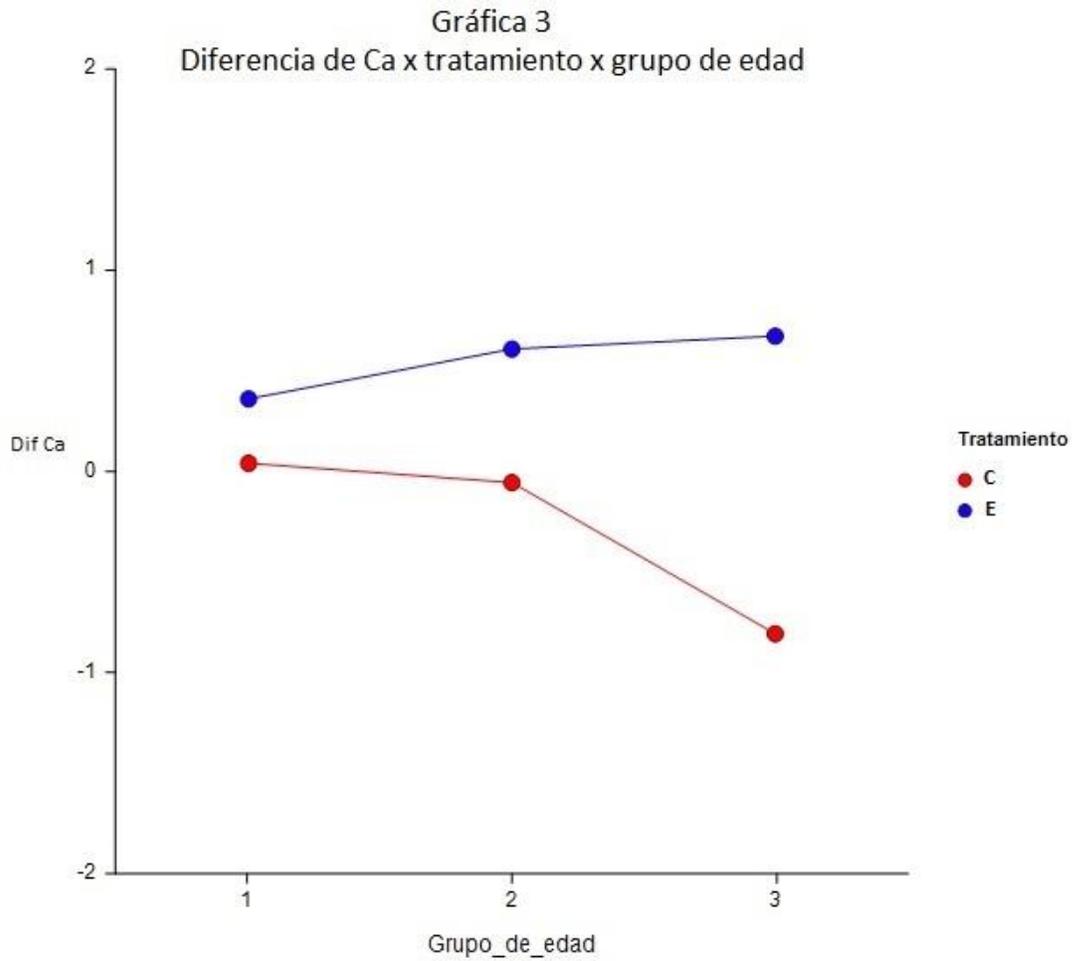
Gráfica 1  
Diferencia de calcio x tratamiento



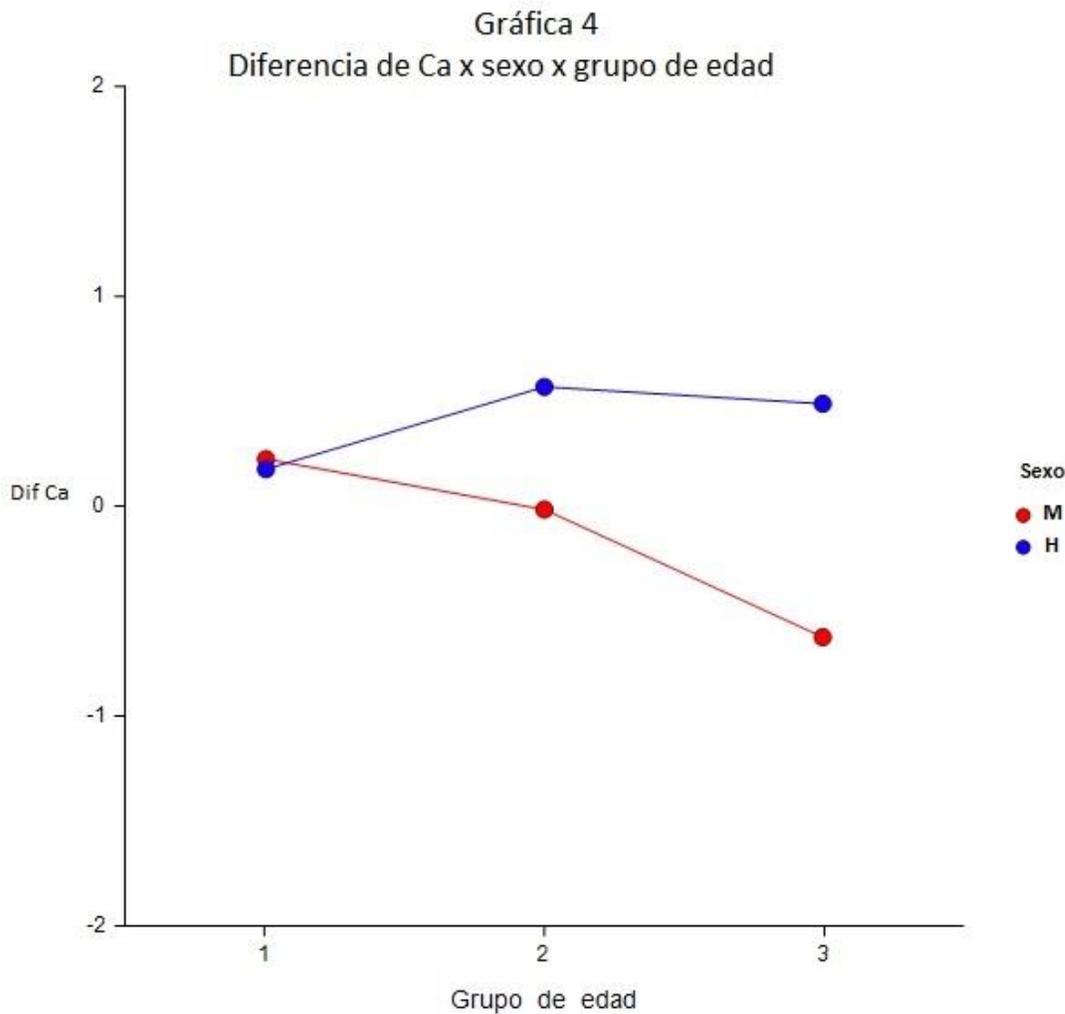
Se muestra la diferencia de las concentraciones de Ca respecto al tratamiento. Se observa un incremento en la concentración de Ca en el grupo Experimental (E) (n=21) respecto al grupo Control (C) (n=11) que presenta un decremento.



Se muestra la diferencia de las concentraciones de Ca respecto al tratamiento por grupo de edad. Se observa un incremento en la diferencia de niveles de Ca en el grupo experimental (E), donde 1 = juveniles (n=6) 2= adultos (n=12) y 3= seniles (n=3) respecto al grupo Control (C), donde 1=juveniles (n=5), 2= adultos (n= 5) y 3= seniles (n=1) en todos los grupos de edad, excepto en el grupo de seniles del grupo control, ya que este consta de un solo individuo.



Se muestra la diferencia de las concentraciones de Ca respecto al tratamiento por grupo de edad. Se observa un incremento en la diferencia de concentraciones de Ca en el grupo experimental (E) (uno= juveniles (n=6), dos= adultos (n=12) y tres= seniles (n=3) respecto al grupo Control (C) (uno= juveniles (n=5), dos= adultos (n= 5) y tres= seniles (n=1), el cual presenta un decremento en los grupos de adultos y más aún en seniles.



Se muestra la diferencia de las concentraciones de Ca respecto al sexo por grupo de edad. En machos (M) (juveniles n=3 adultos n=8 seniles n=3) se observa un incremento en el grupo de jóvenes y un decremento en el grupo de seniles. Mientras que en hembras (H) (juveniles n=8 adultos n= 9 seniles n=1) se observa un incremento en los tres grupos de edad, aunque mayor en los adultos y seniles.

### 3.2 Efectos en los niveles de P con relación al tratamiento, al grupo de edad y al sexo.

Como resultado de la ANOVA de tres vías para las diferencias en P (Tablas 8 y 9), encontramos que hay una diferencia altamente significativa de concentración con

relación al tratamiento (Gráfica 5) y con relación al grupo de edad (Gráfica 6); no así con relación al sexo. Tampoco hay significancia para la interacción de tratamiento-grupo de edad, pero hay una diferencia significativa para las interacciones de tratamiento-sexo (Gráfica 7) y sexo-grupo de edad (Gráfica 8).

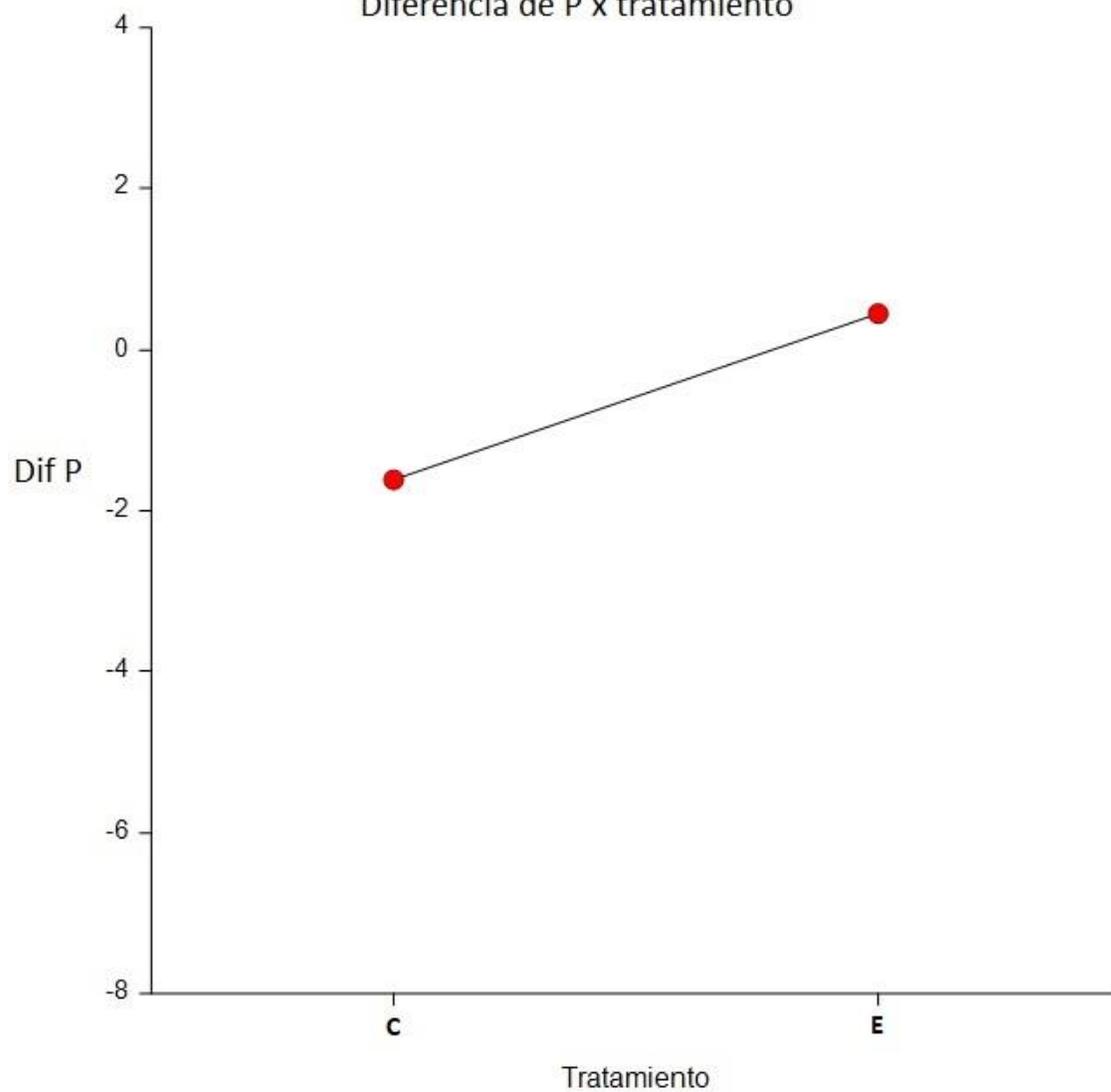
		<b>N</b>	<b>Prom Inicial</b>	<b>SE</b>	<b>Prom Final</b>	<b>SE</b>
<b>Tratamiento</b>	C	11	5.909	0.2432	5.549	0.29
	E	21	5.375	0.176	5.782	0.21
<b>Sexo</b>	Hembras	18	5.911	0.1746	6.059	0.2061
	Machos	14	5.105	0.198	5.242	0.2337
<b>Grupo de edad</b>	1	11	5.914	0.2259	5.676	0.2971
	2	17	5.561	0.1817	5.731	0.239
	3	4	4.57	0.3746	5.65	0.4927

Se muestran la N, promedios iniciales (Prom. Inicial), promedios finales (Prom. Final), error estándar (SE) de fósforo (P) en relación al tratamiento (donde: control = C y experimental = E), sexo, y grupo de edad (donde: 1 = juveniles, 2 = adultos y 3 = seniles).

<b>Origen</b>	<b>Tipo III de suma de cuad.</b>	<b>gl</b>	<b>Cuadrático promedio</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Tratamiento	7.069	1	7.069	9.225	<b>.006</b>
Sexo	.215	1	.215	.281	.602
Grupo de edad	5.681	2	2.840	3.707	<b>.042</b>
Tratamiento * Sexo	4.230	1	4.230	5.520	<b>.029</b>
Tratamiento * Grupo de edad	3.152	2	1.576	2.057	.153
Sexo * Grupo de edad	5.613	2	2.806	3.662	<b>.043</b>
Error	16.092	21	.766		
Total	40.691	32			

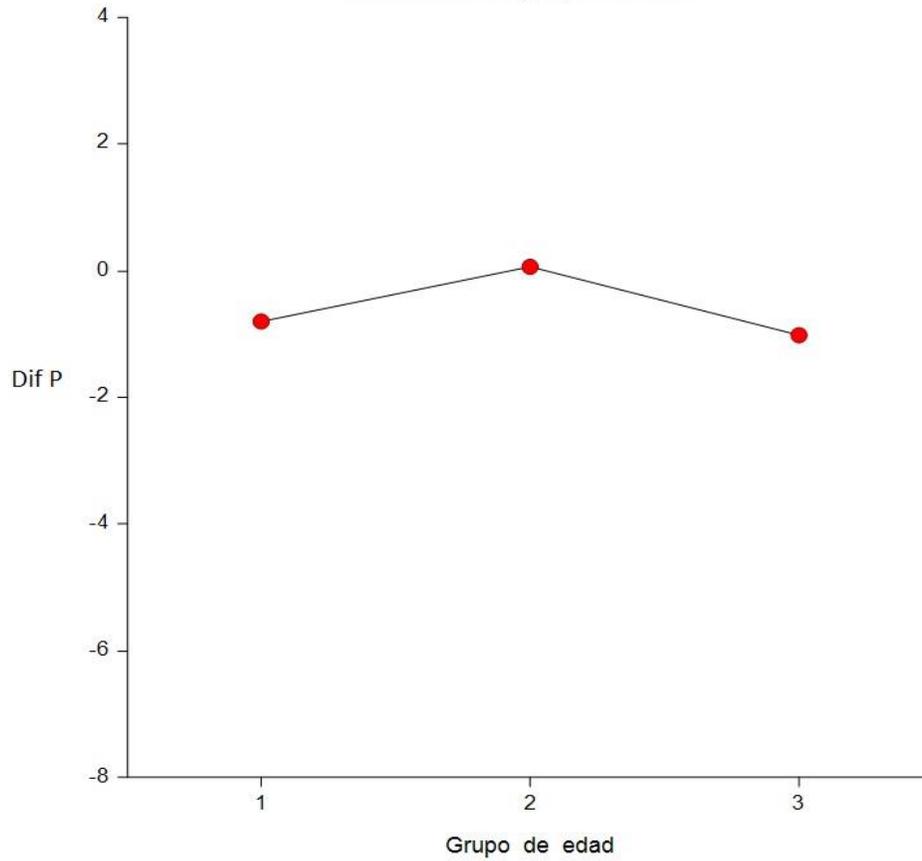
Se muestran los resultados de la ANOVA de 3 vías para evaluar las interacciones entre tratamiento, sexo y grupo de edad.  $p \leq 0.05$

Grafica 5  
Diferencia de P x tratamiento

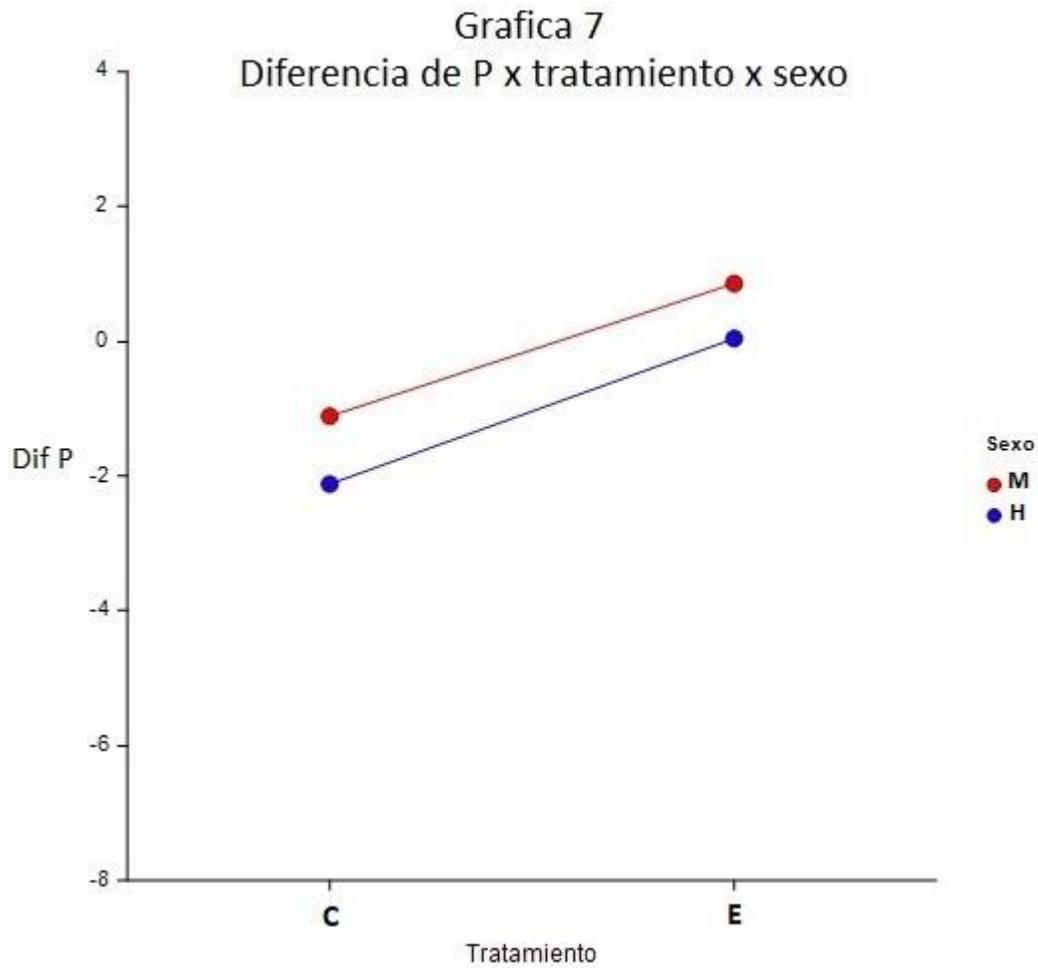


Se muestra la diferencia de las concentraciones de P respecto al tratamiento. Se observa un decremento en la diferencia de concentraciones de P en el grupo Control (C) (n=11) con respecto al grupo experimental (E) (n=21).

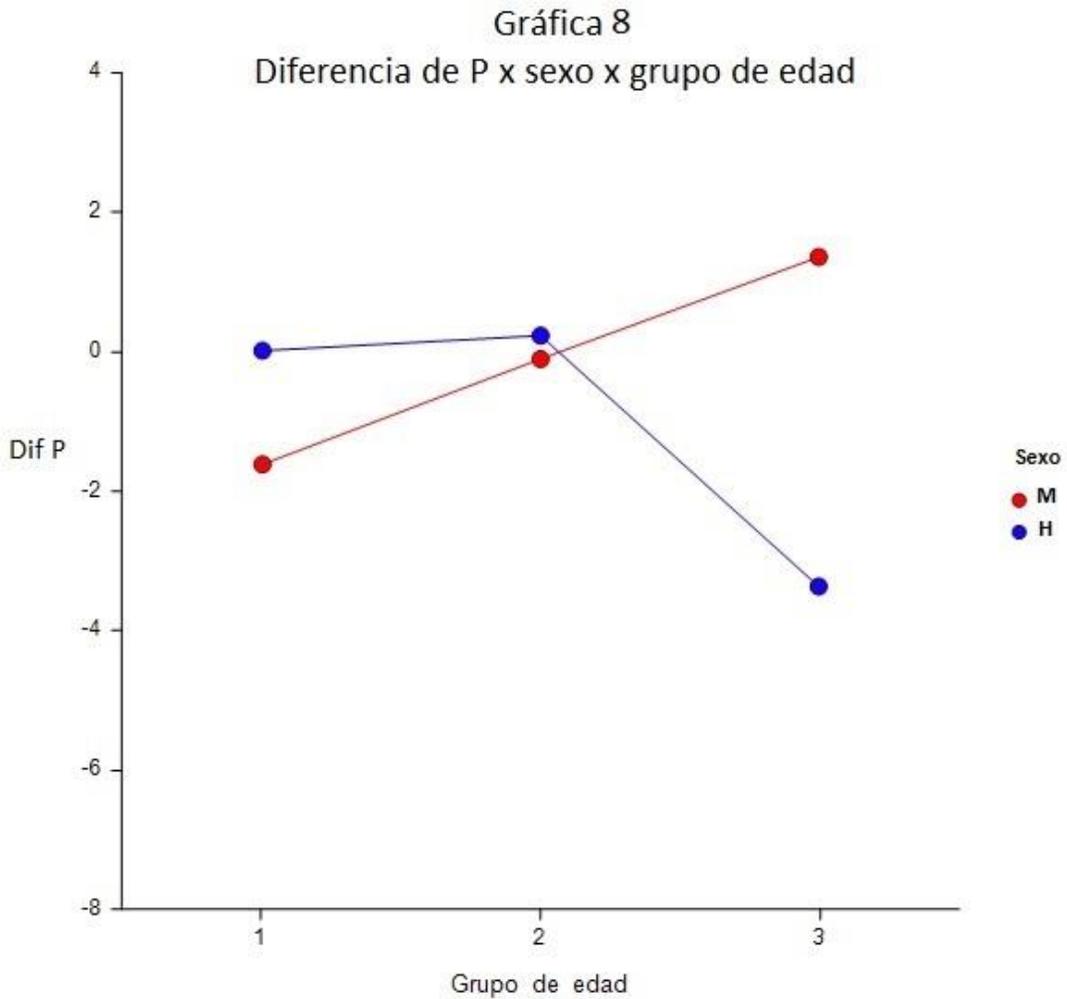
Gráfica 6  
Diferencia de P x grupo de edad



**Se muestra la diferencia de las concentraciones de P respecto al grupo de edad. Se observa un decremento en la diferencia de concentraciones de P en los grupos de edad: 1= juveniles (n=11) y 3= seniles (n=4), mientras que en el grupo 2= adultos (n=17) se mantienen las concentraciones.**



Se muestra la diferencia de las concentraciones de P respecto al tratamiento por sexo. Se observa un decremento en la diferencia de concentraciones de P tanto en machos (M) (n=4) como en hembras (H) (n=7) del grupo control (C), mientras que se observa tanto en machos (M) (n=10) como en hembras (H) (n=11) que las concentraciones de P se mantienen en el grupo experimental (E).



Se muestra la diferencia de las concentraciones de P respecto al sexo por grupo de edad. Se observa un decremento en la diferencia de concentraciones de P en el grupo de seniles en hembras (H) (juveniles=8 adultos=9, seniles=1), mientras que en los machos (M) (juveniles=3 adultos=8, seniles=3) se observa un decremento en juveniles y un aumento en seniles.

3.3 Efectos en los niveles de Fos Al con relación al tratamiento, al grupo de edad y al sexo.

Como resultado de la ANOVA de tres vías para Fosfatasa alcalina (Tablas 10 y 11), encontramos que no hay ninguna diferencia significativa de concentración con

relación al tratamiento ni con relación al grupo de edad, ni con relación al sexo. Tampoco hay significancia para las interacciones de tratamiento-sexo, tratamiento-grupo de edad ni sexo-grupo de edad.

		<b>N</b>	<b>Prom Inicial</b>	<b>SE</b>	<b>Prom Final</b>	<b>SE</b>
<b>Tratamiento</b>	C	11	208.181	40.746	213.181	19.678
	E	21	303.761	29.49	275.381	14.242
<b>Sexo</b>	Hembras	18	224.833	31.224	231.722	15.828
	Machos	14	330.142	35.405	282.642	17.948
<b>Grupo de edad</b>	1	11	237.363	41.519	231.909	20.718
	2	17	310.941	33.398	276.47	16.666
	3	4	193	68.852	219.25	34.358

Se muestran la N, promedios iniciales (Prom. Inicial), promedios finales (Prom. Final), error estándar (SE) de Fosfatasa alcalina (Fos AI) en relación al tratamiento (donde: control = C y experimental = E), sexo, y grupo de edad (donde: 1 = juveniles, 2 = adultos y 3 = seniles).

<b>Origen</b>	<b>Tipo III de suma de cuad.</b>	<b>gl</b>	<b>Cuadrático promedio</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Tratamiento	720.335	1	720.335	.057	.814
Sexo	3992.471	1	3992.471	.315	.580
Grupo de edad	9554.163	2	4777.082	.377	.690
Tratamiento * Sexo	1102.371	1	1102.371	.087	.771
Tratamiento * Grupo de edad	3115.172	2	1557.586	.123	.885
Sexo * Grupo de edad	31624.255	2	15812.128	1.249	.307
Error	265774.083	21	12655.909		
Total	364301.000	32			

Se muestran los resultados de la ANOVA de 3 vías para evaluar las interacciones entre tratamiento, sexo y grupo de edad.

### 3.4 Efecto del tratamiento en los sujetos osteopénicos.

Como resultado de la T-student para evaluar los valores de Ca y P en los sujetos osteopénicos encontramos que se observa una diferencia significativa en Ca (Tablas 12 y 13), ya que, en el grupo experimental hubo un ligero incremento del Ca en los sujetos osteopénicos, en comparación con en el único sujeto osteopénico del grupo control que presentó una disminución de la concentración de Ca. Mientras que, para P no hubo diferencia significativa.

<b>Tabla 12. Estadística descriptiva para sujetos osteopénicos</b>					
		<b>Ca</b>		<b>P</b>	
	<b>N</b>	<b>Prom Inicial</b>	<b>Prom Final</b>	<b>Prom Antes</b>	<b>Prom Desp</b>
<b>Control</b>	1	8.8	7.5	4.5	5.1
<b>Experimental</b>	7	10.232	10.831	5.654	5.442

Se muestran la N, promedios iniciales (Prom. Inicial), promedios finales (Prom. Final) de Calcio (Ca) y Fosforo (P) en los sujetos osteopénicos

<b>Tabla 13. T-student en sujetos osteopénicos</b>		
	<b>T</b>	<b>P</b>
<b>Ca</b>	6.68	<b>0.00055</b>
<b>P</b>	0.92	0.393

Se muestran los resultados de la T-student para evaluar las diferencias de las concentraciones de Calcio (Ca) y Fósforo (P) entre los sujetos con tratamiento y el sujeto sin tratamiento.

## VIII. DISCUSIÓN

Al igual que las tendencias en otras regiones del mundo, la dinámica demográfica de México ha cambiado y su población está envejeciendo. Dado que las fracturas osteoporóticas y por fragilidad son enfermedades asociadas con el envejecimiento, se espera que su incidencia crezca de manera acorde (Zanchetta José y cols. 2012). Debido a la composición poblacional, en México se estima un incremento del 531% en fracturas osteoporóticas de cadera en un periodo de 50 años (Clark y cols., 2018). Por lo anterior, es de suma importancia la atención a esta problemática desde un punto de vista preventivo.

Por tanto, es recomendable realizar investigaciones sistemáticas enfocadas a los problemas derivados de las deficiencias en la ingesta recomendada de macronutrientes en México, así como en sus consecuencias a nivel poblacional; la falta de estos estudios enfatiza la importancia de las medidas de prevención que cada individuo debe tener, en este caso, mediante la ingesta adecuada en Ca en su dieta. Adicionalmente, la mayoría de los medicamentos correctivos producen efectos secundarios indeseables, por lo que los tratamientos preventivos y/o paliativos no farmacológicos, pueden generar beneficios en la calidad de vida de los individuos.

Mantener cantidades adecuadas de Ca biodisponible en sangre a lo largo de nuestras vidas es fundamental para mantener la salud del sistema musculoesquelético. Por lo tanto, preocupa considerablemente la gran disminución en la ingesta de Ca reportada por numerosos países, incluido México. Este déficit observado en la ingesta de Ca pone en consideración la función que cumplen los suplementos de

Ca en los sujetos adultos sanos (Cooper y cols. 2015). En este sentido, la ingesta constante y en cantidades adecuadas de Ca es de suma importancia para la absorción de dicho mineral en nuestro cuerpo a lo largo de nuestras vidas. Es por esto que, los tratamientos que ayuden a aumentar esta absorción de Ca en el organismo principalmente durante la edad adulta y senil, son de gran ayuda para prevenir la descalcificación en los huesos.

Como se mencionó con anterioridad, la técnica de evaluación de la DMO tradicionalmente se realiza a través de un estudio DXA; como parte de este protocolo, nuestro grupo de trabajo probó la eficiencia y precisión de la TAC para la investigación, así como, la posibilidad de usar los valores de UH obtenidos como unidad de medida para evaluar la densidad ósea (Solís-Chávez y cols., 2018), confirmando que su carácter tridimensional permite analizar la estructura del hueso midiendo de manera independiente los valores de hueso trabecular y cortical, posibilitando así la identificación de las distintas etapas de remodelación ósea (Snyder y Schneider, 1991; Shapurian y cols., 2006; Adams, 2009) y la reducción significativa del tiempo necesario y los niveles de radiación a los que se exponen los individuos (Christe y cols., 2013).

En relación con la variabilidad relacionada con la máquina de escaneo (Tabla 2), la desviación estándar de cada grupo experimental fue de aproximadamente el 10% del promedio, lo que implica un alto grado de precisión y repetibilidad en estos ensayos. Las más grandes desventajas de la TAC continúan siendo el acceso limitado a los equipos, así como sus altos costos de operación (Kanis, 2019). Sin embargo, y como se mencionó anteriormente, en humanos se ha demostrado que el cálculo de la DMO

se puede realizar de manera oportunista eficientemente a través de las TAC realizadas a pacientes con otros motivos médicos y esto puede ser aplicable de igual forma a los ensayos clínicos veterinarios o de investigación (Patel y cols., 2016; Hendrickson y cols., 2018).

Como se mencionó en los antecedentes, dentro de los modelos animales, los PNH comparten muchas características genéticas morfológicas y aún más importante, fisiológicas con el humano, lo que los vuelve un modelo de estudio excepcional para la investigación de muchas enfermedades y desarrollo de diversos tratamientos. Específicamente, el mono Rhesus (*Macaca mulatta*), comparte una relación filogenética cercana, con un genoma 93% similar al del humano (Gibbs y cols., 2017). En el caso de la salud ósea, los monos Rhesus representan un excelente modelo, ya que, generalmente se consideran viejos después de aproximadamente 20 años de edad y muestran signos significativos de deterioro físico, como disminución de la movilidad, atrofia de la piel y envejecimiento / adelgazamiento del pelaje, entre otros. En estas edades posteriores, también desarrollan muchos de los trastornos comunes en humanos mayores, incluyendo cáncer, cataratas, osteopenia y enfermedad cardiovascular, además de presentar cambios hormonales importantes en el caso de las hembras, las cuales presentan un ciclo menstrual de 28-30 días y menopausia alrededor de los 25 años (Walker y Herndon, 2008; Colman, 2017). Por todo lo anterior, y puesto que, la colonia de PNH con la que trabajamos consta de numerosos individuos en todas sus etapas fisiológicas, consideramos que constituyen una población como biomodelo experimental excepcional para diversas enfermedades, gracias a su rica

diversidad poblacional, principalmente en cuanto a variedad de etapas ontogenéticas, aumentando el beneficio de ser una población controlada en cuanto a su dieta, hábitos de comportamiento, e igualdad de condiciones medioambientales para todos los individuos.

Por otro lado, aunque se usan con frecuencia por tratarse organismos de fácil acceso para los laboratorios, los roedores no son un modelo ideal para la osteoporosis humana. El hueso cortical humano presenta una remodelación continua a lo largo de la vida, en cambio, el hueso cortical de roedores rara vez sufre remodelación, por lo tanto, no suelen tener osteonas. El hueso cortical consiste principalmente de láminas circunferenciales colocadas en la superficie externa a medida que crece el hueso. A diferencia de lo que sucede en humanos, la adquisición ósea y el crecimiento óseo longitudinal continúan en roedores después de la madurez sexual y en muchas cepas, el crecimiento óseo continúa hasta edad avanzada. Además, los ratones no suelen estar sometidos a una verdadera menopausia. Si bien pueden experimentar ciclismo irregular a partir de los 10 meses de edad, los niveles de estrógeno aún se mantienen normales hasta una edad avanzada. Del mismo modo, sucede en los roedores machos, que mantienen los niveles de testosterona hasta la edad avanzada (Colman, 2017). En cambio, los macacos son un excelente modelo para el estudio de la osteoporosis humana porque, al igual que los humanos, tienen remodelación osteonal del hueso cortical, y un similar sistema endocrino y reproductivo que afecta el metabolismo óseo. Después de su pico de masa ósea más alto alrededor de los 10 años de edad, los macacos desarrollan de manera confiable un aumento en el

recambio esquelético y pérdida ósea como consecuencia de procesos naturales como la edad avanzada, el ciclo menstrual, la ocurrencia de menopausia natural y otros procesos de remodelación ósea en hueso cortical y trabecular.

Respecto a la medición de UH en los PNH, a través de la TAC, es de notarse que nuestros resultados fueron los esperados, en el sentido de que obtuvimos 659.91 UH en juveniles, 694.72 UH en adultos y 619 UH en seniles; por tanto, los adultos son los que obtuvieron una cantidad mayor de UH, esto como consecuencia de encontrarse en la edad pico de DMO, mientras que en segundo lugar tenemos el grupo de los juveniles que aún no se encuentran en su pico máximo y en último lugar los seniles que ya se encuentran en una etapa de resorción ósea, todo esto de acuerdo con Kini y Nandeesh, 2013. Como consecuencia se observó una diferencia significativa entre la cantidad de UH en el grupo de adultos y el de los seniles.

Con relación a la proporción de hueso trabecular nos encontramos que el grupo de juveniles (23.94%) obtuvo el mayor nivel, seguido de los otros dos grupo (adultos y seniles), ambos con 20.9% de hueso trabecular, lo que nos señala claramente que los sujetos juveniles poseen mayor cantidad de hueso trabecular al encontrarse en una etapa de crecimiento y por tanto en la edad con mayor actividad osteoblástica, de acuerdo con diversos autores (Pope y cols., 1989; Colman y cols., 1999a; Colman y cols., 1999b; Cerroni y cols., 2000; Black y cols., 2001).

En cuanto a la proporción de hueso cortical obtuvimos que, el grupo de juveniles obtuvo un 54.8%, el grupo de adultos un 58.9% y el de seniles solo un 44%. Estas

proporciones nos revelan que, de acuerdo con diversos autores (Pope y cols., 1989; Colman y cols., 1999a; Colman y cols., 1999b; Cerroni y cols., 2000; Black y cols., 2001), el grupo de adultos se encuentran en su pico máximo de DMO y por ende, tienen mayor cantidad de hueso cortical, seguido del grupo de juveniles que se encuentran en un proceso muy activo de corticalización, y finalmente los seniles con una pérdida importante de hueso cortical, lo que los expone a fracturas derivadas de la disminución de la DMO.

En la literatura existente sobre DMO en monos Rhesus encontramos que, a pesar de ser un modelo ampliamente estudiado a nivel mundial, las diferencias tanto en el diseño experimental como las condiciones peculiares propias de cada población no permiten llegar a un consenso respecto a una igualdad de valores para determinar las edades exactas de desarrollo de DMO y valores para considerarlos como osteopénicos u osteoporóticos. Por tal motivo, en nuestro diseño experimental, utilizamos como estándar de población sana para el cálculo de DMO a monos de entre 9 y 13 años sin hacer diferencia entre los sexos, considerando lo que se ha reportado en otras investigaciones, donde se señala que los monos Rhesus alcanzan el pico máximo de densidad ósea entre los 10 y los 12 años para machos y entre los 9 y los 13 años para hembras (Pope y cols., 1989; Colman y cols., 1999a; Colman y cols., 1999b; Cerroni y cols., 2000; Black y cols., 2001). Tomando en cuenta lo anterior, y gracias a los resultados obtenidos a través de la TAC, se determinaron siete individuos como osteopénicos distribuidos en los tres grupos etarios (Tabla 4), ya que, todos ellos presentaron un déficit mayor a una desviación estándar de hueso cortical en

comparación al promedio obtenido por la población de jóvenes adultos afectando en última instancia el total de DMO y caracterizándose, por tanto, como osteopénicos de acuerdo con el T-score establecido por la OMS. Aunque durante más de 70 años predominó la idea de que el debilitamiento óseo se encuentra asociado a la pérdida de densidad ósea en el hueso trabecular, el 80% de todas las fracturas ocurren en huesos cuya estructura es predominantemente cortical y, en realidad, el 70% de la pérdida ósea es en hueso cortical a pesar de que la pérdida en hueso trabecular sea más rápida (Seeman, 2015). Esta característica enfatiza la importancia de diferenciar la DMO entre ambos tipos de hueso para la investigación.

Para nuestros resultados, es necesario considerar que las dos hembras osteopénicas del Grupo 1 y los dos machos osteopénicos del Grupo 2, probablemente no habían alcanzado aún la edad donde se obtiene el pico máximo de densidad ósea; tomando en cuenta que eran individuos aún en crecimiento y que en éstos casos la DMO está fuertemente influenciada por la talla, es posible que al analizar no solo el hueso femoral sino también la densidad ósea de las vértebras, las cuales alcanzan su pico de densidad ósea más temprano- a los 7 y 9.5 años para machos y hembras, respectivamente (Cerroni y cols., 2000), no serían caracterizados como osteopénicos. Asimismo, como los procesos de acumulación y modelamiento óseo ocurren durante el crecimiento, es posible que estos individuos tengan una recuperación espontánea de DMO (Saggese y cols., 2001). Sin embargo, se sabe que la masa ósea es determinada en el estado adulto por la cantidad neta ganada durante el crecimiento y de la misma manera, la cantidad neta de pérdida durante la senescencia y la

porosidad, es determinada por la cantidad neta de porosidad establecida durante el crecimiento así como por cualquier incremento en la porosidad adquirida con el tiempo (Seeman, 2015), es decir, como la corteza se genera por la “corticalización” de la trabécula, la fragilidad puede aumentar durante el crecimiento si la trabécula es generada cerca de la placa de crecimiento, si es delgada o si falla al fusionarse para formar la corteza (Bala y cols., 2015).

Respecto a los individuos del Grupo 3, nuestros resultados son consistentes con lo publicado por Black y cols. (2001) y Cerroni y cols. (2000), quienes señalan que a partir de los 18 años hay un decremento constante en el DMO de los monos Rhesus sin importar el sexo.

Cabe señalar que la mayor parte de los individuos osteopénicos pertenecen a la misma familia; estudios sobre la microarquitectura ósea de los babuinos han demostrado que entre el 61-82% de la variación en la microestructura cortical está relacionada con factores genéticos sin importar el sexo y 9% fuertemente influenciados por la edad y el sexo (Havill y cols., 2013) e igualmente, se ha encontrado predisposición genética a la osteoporosis en la población mexicana (Lazcano-Ponce y cols., 2009). Nuestros resultados son consistentes con estos reportes y enfatizan la importancia de los PNH como modelo de estudio para este padecimiento.

La FosA1 es usado como marcador de recambio óseo (Romero Barco y cols., 2012), y es una proteína de superficie que participa en la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas (Fernández-Tresguerres y cols., 2006).

Durante la etapa de crecimiento sus niveles en suero pueden incrementarse y, de igual manera, los niveles aumentan en presencia de osteopatologías (Swaminathan, 2001). En la población estudiada, no se observaron ni sesgo inicial, ni diferencia final significativa en los niveles de este marcador entre los grupos asignados como control y experimental (Tablas 5 y 10). A pesar de no ser estadísticamente significativo, el grupo experimental presentó un nivel ligeramente más alto de FosAl, respecto al grupo control en los niveles iniciales, lo cual podría explicarse debido a la composición del grupo, ya que presentaba una mayor cantidad de macacos aún en crecimiento y osteopénicos. Después de los 22 meses del tratamiento, en el grupo control se observó un ligero incremento en los valores de FosAl, mientras que el grupo experimental presentó una reducción, estos resultados podrían indicar una disminución en la tasa de recambio óseo, sin embargo, la desviación estándar de este analito dentro de la misma población de monos es muy amplia (Cieslik y cols., 2012; Ibañez-Contreras y cols., 2011; Hernández-Godínez y cols., 2019) y tiene una baja especificidad, ya que también está asociada al funcionamiento hepático (Kini y Nandeesh., 2013) por lo que, si bien se sigue recomendando en la práctica clínica para las evaluaciones iniciales del estado de salud ósea (Romero-Barco y cols., 2012), ha entrado en desuso para la investigación siendo sustituida por FosAl osteo-específica (Kittivanichkul D y cols., 2016). Adicionalmente, no se encontraron interacciones significativas con tratamiento, sexo ni grupo de edad (Tabla 11).

Se ha observado que, tanto los biomarcadores osteoespecíficos, como las hormonas calciotropas y la homeostasis de iones minerales tienen mecanismos de

acción similares en PNH y en humanos, dada esta similitud, y considerando que durante la remodelación ósea ambos procesos se presentan al mismo tiempo, es muy importante que las mediciones de biomarcadores sean interpretadas cautelosamente (Vahle y cols., 2015).

Durante el crecimiento esquelético, los valores de Ca y P en suero son mayores que en la etapa adulta sin importar el sexo del individuo, llegando a una meseta en cuanto termina el desarrollo (Institute of Medicine (US), 1997), y dado que los cambios metabólicos degenerativos tienen que ver con la edad, tanto en poblaciones humanas como en monos Rhesus (Ibañez-Contreras y cols., 2011), las concentraciones en sangre de estos minerales bajan conforme avanza la edad, esto debido al deterioro de la capacidad intestinal de absorción de estos minerales (Institute of Medicine (US), 1997). La población de macacos estudiada muestra estas mismas características en los valores promedios iniciales de acuerdo a los grupos etarios (Tablas 6 y 8) y no se observaron sesgos iniciales entre los grupos control y experimental (Tabla 5).

Transcurridos los 22 meses del experimento, nuestros resultados mostraron diferencias significativas en las concentraciones finales de Ca (Tabla 7) en relación al tratamiento y al sexo y, diferencias significativas en las concentraciones de P (Tabla 9) asociadas al tratamiento, a la edad y a las interacciones tratamiento – sexo y sexo – grupo de edad. Estos resultados se discuten a detalle a continuación.

### *Efectos del Tratamiento*

En el caso del Ca, se observa que la diferencia significativa respecto al tratamiento se debe tanto a un decremento en el grupo control como al incremento en el grupo tratado con inulina (Gráfica 1). No hubo diferencias significativas sexo-específicas, ni asociadas a la edad en relación con el tratamiento; lo cual sugiere que la inulina del agave tiene un efecto favorable en toda la población, sin importar edad o sexo.

En un análisis detallado (Gráficas 2 y 3), se observa que, en el grupo control, la mediana se mantuvo cercana a los niveles iniciales en los grupos 1 y 2 y sufrió una reducción notable en el grupo 3, sin embargo, debido al tamaño de la muestra de este (n=1), no es posible afirmar que esta disminución sea representativa para todas las poblaciones de macacos. Por otra parte, en el grupo experimental se observó un incremento en la biodisponibilidad de Ca en todos los grupos etarios, con una media y mediana mayor a las concentraciones iniciales y una tendencia positiva proporcional a la edad; los efectos fueron particularmente amplios en los grupos 2 (adultos) y 3 (seniles).

Respecto a la concentración de P en sangre (Tabla 8), en el grupo experimental fue registrado un promedio inicial ligeramente menor que el final mientras que, en el grupo control ocurrió lo contrario; después del tratamiento, los resultados de la ANOVA de tres vías (Tabla 9), mostraron diferencias significativas en relación al tratamiento y a la interacción tratamiento-sexo. En la Gráfica 5, se observa que esta diferencia está relacionada a un ligero decremento en las concentraciones finales del grupo control y

un ligero incremento en las concentraciones finales del grupo experimental; esto pudiera suceder debido a que en el grupo experimental hay más sujetos jóvenes, que tienen mayor actividad de formación ósea, además de que en el grupo experimental también hay más sujetos adultos osteopénicos (Tabla 4) que en el grupo control. Sin embargo, al observar las diferencias únicamente del grupo experimental al inicio y al final del tratamiento, observamos que las diferencias no son grandes. Lo que pudiera representar que el tratamiento no es significativo para las concentraciones de P en sangre.

Asimismo, al analizar los efectos del tratamiento en la concentración de P con relación al sexo, dado que fue estadísticamente significativo (Tabla 9, Gráfica 7), se observa que, los machos presentaron una mayor concentración de P en sangre que las hembras, tanto en el grupo control como en el experimental; sin embargo, es importante mencionar que la gráfica muestra claramente que las mayores diferencias son debidas al tratamiento, no al sexo, ya que las tendencias (líneas hembras y machos) son cercanas, mientras que los puntos entre tratados y no tratados son muy separados, por tanto, es posible observar que, en ambos sexos del grupo control se presentó un decremento mayor respecto a los valores iniciales mientras que en el grupo experimental los valores finales se mantuvieron cercanos al promedio inicial. En humanos, la relación entre P sérico y el sexo es inversa a lo encontrado en nuestra población de macacos, Yoo y cols. (2016) reportan que la concentración de P en mujeres adultas mayores a 40 años es mayor al registrado en hombres, sin embargo, analizando los valores de referencia reportados en otras investigaciones con monos

Rhesus, las hembras presentan concentraciones ligeramente menores de P en suero con respecto a los machos, lo cual concuerda con nuestros resultados (Smucny y cols., 2001; Ibañez-Contreras y cols., 2011; Lee y cols., 2012; Hernández-Godínez y cols., 2019; Koo y cols., 2019).

#### *Efectos Independientes del tratamiento*

Las diferencias significativas en las concentraciones de Ca en sangre relacionadas al sexo, independientes del tratamiento se muestran en la Gráfica 4, donde se observa que la única hembra del grupo de seniles presentó una mayor concentración de Ca en sangre, por lo tanto, se ve un aumento de acuerdo a la edad en la tendencia. En cambio, en los machos se observa una disminución conforme avanza el grupo de edad, por tanto, para el grupo 3 es visible una disminución considerable, explicada porque los dos únicos machos seniles con tratamiento prácticamente no tuvieron cambios, pero el único macho sin tratamiento, tuvo una disminución importante de concentración de Ca.

De igual manera, se presentó una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de P y el grupo de edad y en la relación sexo – grupo de edad, independientemente del tratamiento (Tabla 9, Gráficas 6 y 8, respectivamente). Las concentraciones de P en sangre se mantuvieron estables en el grupo 2 y fueron menores en los grupos 1 y 3; al observar estos cambios en relación al sexo, nuestros resultados muestran que, en las hembras, el nivel fue constante tanto en el grupo 1, como en el 2 y bajó considerablemente en el grupo 3 que consta únicamente de una

sola hembra. Por el contrario, en los machos, la concentración de P en sangre fue incrementándose con relación a la edad, alcanzando su pico máximo en el grupo 3; pero cabe señalar que, de los tres sujetos de este grupo, dos son machos con tratamiento en los cuales subió mucho la concentración de P (casi 2 unidades), mientras que en el macho que no tuvo tratamiento, el incremento fue menor (0.6 unidades).

El Ca y P interactúan en varios procesos fundamentales; en hueso, trabajan junto a los osteoblastos, osteocitos y otras proteínas para mineralizar la matriz ósea; en los tejidos no esqueléticos existen otros mecanismos regulatorios, aun pobremente entendidos, que previenen la deposición de complejos Ca-P en tejidos blandos (Peacock, 2010), estos sistemas de control son muy importantes debido a la gran capacidad que tienen estos iones de unirse y formar complejos; Heaney y Nordin (2002) mostraron que dentro del lumen intestinal, cada 500 mg de Ca ingerido se une a 166 mg de P. La homeostasis de Ca y P están interrelacionadas debido a que ambos minerales interactúan en el suero sanguíneo a través de la modulación hormonal, aunque mientras las concentraciones de Ca en sangre son estrictamente controladas, las concentraciones de P pueden tener una mayor fluctuación (Lamberg-Allardt y cols., 2017). Lo anterior que nos hace considerar los cambios de P como normales, sin embargo, no así con los cambios de Ca. En suero sanguíneo se observa una relación casi invertida en sus concentraciones (Madeo y cols., 2018), ya que un aumento en las concentraciones de P, estimula la producción de PTH, activando los mecanismos de resorción ósea para liberar Ca y, conforme las concentraciones de Ca en suero

sanguíneo aumentan, se activa una respuesta donde intervienen la Vitamina D y el calcitriol para detener la producción de PTH y promover la excreción de P; de hecho, esta homeostasis de Ca y P es tan efectiva que se ha demostrado que la ingesta de 172 mg de Ca, promueve una respuesta aguda, que en unas cuantas horas suprime la producción de PTH (Lamberg-Allardt y cols., 2017).

En humanos, se recomienda que la ingesta diaria de Ca y P corresponda como mínimo a la proporción 1.5:1, en la actualidad, los alimentos procesados contienen fosfatos añadidos por lo que la cantidad de P en la dieta suele ser más elevada de lo recomendable; esto puede provocar hiperfosforemia, aún en personas sin falla renal crónica, lo cual ha sido relacionado con procesos de resorción ósea y pérdida de BMD (Goretti Penido M. y Alon U.S., 2012). Dado que la ingesta dietética de los macacos usados en esta investigación fue estrictamente controlada y corresponde a una dieta balanceada, los incrementos en ambos analitos en el grupo experimental, sugieren que la inulina podría estar promoviendo un incremento en la absorción de ambos minerales lo cual podría coadyuvar en los procesos de formación ósea.

En roedores se ha estudiado el uso de la inulina del agave (Metlin), como suplemento alimenticio y su efecto en la salud ósea. La investigación realizada por Cieslik y cols. (2012) mostró que en machos de ratas Wistar cuyas dietas variaban en las dosis de ingesta diaria recomendada Ca, tras la aplicación del tratamiento durante 28 días, se observó un ligero incremento en las concentraciones de iones de Ca en plasma, así como un ligero decremento en las concentraciones de P; aunque las diferencias en los parámetros bioquímicos no fueron estadísticamente significativas

(Rivera-Huerta y cols., 2017). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo con primates, ya que, también encontramos un aumento en las concentraciones de Ca en los sujetos tratados con inulina, pero a diferencia del trabajo en roedores de Rivera-Huerta y cols., 2017, el aumento que nosotros observamos fue significativo. Con relación al P, nuestro resultado no concuerda con el de Rivera-Huerta y cols., 2017.

Otras investigaciones, con distintos prebióticos y/o con prebióticos combinados con probióticos, han reportado tanto un incremento en biodisponibilidad de Ca y P en sangre en comparación a los controles, incluyendo ratas gastrorectomizadas y ovariectomizadas (Wishner y Castillo, 2017). Lo anterior, concordando en similitud con nuestros resultados.

Las diversas comunidades bacterianas que colonizan el tracto gastrointestinal juegan un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis, inmunidad y la absorción de nutrientes, a través de la producción de metabolitos críticos como los ácidos grasos de cadena corta, lo que puede, ser interrumpido por el uso de antibióticos, causando una disbiosis intestinal (Manuzak y cols., 2019).

Se sabe, que los taxas encontrados en el microbioma intestinal se mantienen relativamente estables en la edad adulta y su abundancia está influida por la dieta, inclusive se ha observado en PNH de vida silvestre cambios estacionales cíclicos en la composición de la flora intestinal influenciado por los alimentos disponibles en cada temporada siendo estos cambios visibles en cuestión de días (Hicks y cols., 2018). Sin

embargo, la dieta también influye en la composición y la función del microbioma en escalas más prolongadas de tiempo, una dieta estable se vuelve un factor clave en el comportamiento del microbioma intestinal ya que este ecosistema presenta histéresis y “memoria” (Uhr y cols., 2019), como se mencionó en el marco teórico, existe evidencia de que los fructanos del agave cambian la composición del microbioma intestinal favoreciendo la proliferación de bacterias benéficas (Holscher y cols., 2015; López-Velázquez y cols., 2015; Ramnani y cols., 2015; Koenen y cols., 2016) . Esto nos permite explicar el efecto visible en relación al tiempo respecto a las concentraciones plasmáticas de Ca, tras 22 meses de aplicación del tratamiento. Sería recomendable realizar otro tipo de estudios para averiguar si hubo cambios en el microbioma intestinal de nuestros sujetos de estudio y en su caso, si estos cambios promovidos por la inulina del agave en el microbioma intestinal se mantienen a través del tiempo, aún después de finalizado el tratamiento.

En humanos se ha encontrado evidencia de que en la infancia se determina el ecosistema intestinal que se mantendrá relativamente estable durante toda la vida; tanto la alimentación, como los factores genéticos y los ambientales influyen en esta estructura (Uhr y cols., 2019). Asimismo, se ha observado que la composición cambia con el envejecimiento y se cree que se debe a los procesos degenerativos asociados a la edad, como la desaceleración de la actividad intestinal (Odamaki y cols., 2016) aunque no se ha llegado a un consenso al respecto, pues puede haber factores ambientales que presionen, aún más que el envejecimiento (Mueller y cols., 2006). Con respecto a esto, nuestros resultados arrojan que la biodisponibilidad de Ca en

plasma aumentó en todos los grupos etarios después del tratamiento, incluyendo al grupo de seniles (Tabla 6, Gráf 2), la diferencia entre esta disponibilidad de Ca en suero respecto a las propias concentraciones de este grupo antes del inicio del tratamiento, como a los resultados del grupo control (Tabla 6, Gráf 1) podría indicar que la inulina contribuye positivamente en la homeostasis del Ca desacelerando los procesos de resorción ósea asociados a la edad.

Como resultado de la T-student para evaluar los valores de Ca y P en los sujetos osteopénicos encontramos que se observó una diferencia significativa en Ca (Tablas 12 y 13), ya que, en el grupo experimental hubo un ligero incremento del Ca en los sujetos osteopénicos, en comparación con en el único sujeto osteopénico del grupo control que presentó una disminución de la concentración de Ca. Mientras que, para P no hubo diferencia significativa. Esto pudiera indicar que existe un efecto al adicionar inulina a la dieta de los PNH que favorece la absorción de Ca y permite incrementar las concentraciones de este mineral en sangre. No así en el sujeto osteopénico que no recibió tratamiento.

Esta investigación es la primera que muestra los efectos de la inulina del agave en la salud ósea en PNH; después de la aplicación del tratamiento, nuestros resultados muestran un incremento significativo en la biodisponibilidad de Ca y en P en sangre en el grupo experimental, respecto al grupo control (Tablas 6 y 9, Gráficas 1 y 2 y 5), enfatizando que la diferencia significativa en P, está dada por que en el grupo control disminuye la concentración y en el experimental se incrementa. Esto apoya la hipótesis

del efecto positivo de los fructanos tipo inulina del agave en la absorción de Ca relacionado a la salud ósea.

Se sugiere la realización de una mayor cantidad de estudios en poblaciones de diversas edades para obtener mayor cantidad de datos sobre el papel que juega la inulina en el microbioma intestinal a largo plazo, y su repercusión en el aumento de absorción del Ca, pues, según las tendencias de la International Osteoporosis Foundation (Zanchetta, 2012), podría significar un ahorro de millones de dólares mediante la promoción del consumo de inulina como preventivo de la disminución en la DMO y también como coadyuvante a los tratamientos ya existentes.

También se sugiere realizar más estudios de las osteopatologías a largo plazo en poblaciones de PNH, en donde se pueda medir la DMO pre y post tratamiento para verificar los efectos de los prebióticos en las concentraciones de Ca en sangre, pero también relacionado a la DMO antes y después del tratamiento, así como, el estudio de diversos marcadores osteoespecíficos, como hormonas para entender de mejor manera su compleja interacción.

## **IX. CONCLUSIONES**

Mantener las cantidades adecuadas de Ca biodisponible en sangre a lo largo de nuestras vidas es fundamental para mantener la salud ósea, especialmente en la edad adulta y senil, es por esto que la investigación y el desarrollo de tratamientos que ayuden a aumentar esta absorción de Ca en el organismo son de gran ayuda para prevenir la descalcificación en los huesos y con ello las fracturas ocasionadas, así como, las consecuencias económicas, sociales y principalmente en la calidad de vida.

La TAC es un método efectivo y con alta precisión para evaluar la DMO, dado que las imágenes permiten diferenciar entre los diferentes tipos de hueso, esta técnica permite obtener medidas volumétricas reales de densidad ósea y, a pesar de su alto costo, es viable y eficiente, por lo que se recomienda ampliamente aprovechar la oportunidad de medir la DMO de un paciente cuando se necesita realizar una TAC por otros motivos médicos.

Las poblaciones de PNH con numerosos miembros en diferentes etapas ontogenéticas, son un excelente modelo de estudio para las enfermedades relacionadas a la osteoporosis, ya que constituyen sujetos de estudio a largo plazo con condiciones biológicas similares a las poblaciones del humano, sin perder la propiedad de ser sujetos de experimentación con condiciones y variables que pueden ser controladas en laboratorio. A demás de que, a diferencia de los roedores, los PNH poseen una fisiología muy similar a la del humano.

Los resultados obtenidos de la TAC (UH y proporciones de hueso), son consistentes con la bibliografía y de acuerdo a lo esperado para cada grupo de edad

acorde a su etapa fisiológica de DMO. Lo que nos confirma que, la TAC es una herramienta precisa y confiable; que nos permitió obtener valores para categorizar a los sujetos como sanos, ostepénicos y osteoporóticos, lo cual, nos permitió confirmar que la población estudiada posee una DMO en general sana, dado que, contiene pocos sujetos categorizados como ostepénicos, de los cuales, algunos son juveniles, y por tanto, es posible que se encuentren con una alta actividad osteoblástica. Quedando solo unos cuantos individuos seniles como ostopénicos, estado propio de la edad avanzada que poseen y por lo tanto, consideramos que obtuvimos datos propios de una población heterogénea en cuanto a su composición de etapas ontogenéticas relacionado a sus DMO.

Respecto a FosAl, no se presentaron sesgos en las concentraciones iniciales, ni cambios significativos en las concentraciones después de la administración de inulina. Por tanto, concluimos que las concentraciones de FosAl en sangre, no se ve afectadas por la adición de inulina en la dieta de los PNH.

Con relación al Ca, no se observa sesgo en las concentraciones iniciales, pero si se observa que hay una diferencia significativa respecto al tratamiento. Lo anterior, como resultado del incremento significativo de las concentraciones de Ca finales en el grupo experimental y un ligero decremento en las concentraciones finales del grupo control. Lo que sugiere que la inulina del agave tiene un efecto favorable en las concentraciones de Ca en toda la población, sin importar edad o sexo.

Respecto a la concentración de P en sangre, no se observa sesgo en las concentraciones iniciales. Sin embargo, se encontró diferencia significativa en las

concentraciones finales de P en sangre con relación al tratamiento, como resultado de que, hubo un ligero decremento en las concentraciones finales del grupo control y un ligero incremento en las concentraciones finales del grupo experimental. Lo que provoca la diferencia significativa por la diferencia entre grupo control y experimental, sin embargo, comparando únicamente los cambios de concentraciones iniciales y finales en el grupo experimental encontramos que el tratamiento con inulina no genera una diferencia significativa en las concentraciones de P.

También obtuvimos diferencias significativas para las concentraciones de Ca en sangre respecto al sexo, así como diferencias significativas para las concentraciones de P en sangre respecto al grupo de edad y para la relación sexo- grupo de edad, sin embargo, dichas diferencias pueden estar dadas por que las N's de los grupos son muy pequeñas y no son homogéneas. Por lo tanto, las diferencias de un grupo en algunos casos son el resultado del cambio en las concentraciones de un solo individuo.

Los resultados de este estudio, concuerdan con la mayoría de las investigaciones con que la dieta influye en los procesos de absorción de nutrientes y sugieren un efecto positivo en la salud ósea y la homeóstasis del Ca en PNH, derivado de la ingesta de prebióticos tipo inulina como suplemento alimenticio que pudieran beneficiar al microbioma intestinal.

Por otro lado, encontramos que existió un aumento en las concentraciones de Ca en sangre en los sujetos osteopénicos con tratamiento, mientras que el sujeto osteopénico sin tratamiento no tuvo dicho incremento de concentración de Ca. Lo que favorece la hipótesis de que la adición en la dieta de probióticos como la inulina tipo

agave en los PNH, favorece la absorción y, por tanto, la biodisponibilidad del mineral en sangre, posiblemente coadyuvando a mejorarla salud ósea.

Esta investigación es la primera que muestra los efectos de la inulina del agave en la salud ósea en PNH; después de la aplicación del tratamiento, nuestros resultados muestran un incremento significativo en la biodisponibilidad de Ca y en P en sangre en el grupo experimental, respecto al grupo control, enfatizando que la diferencia significativa en P, está dada por que en el grupo control disminuye la concentración y en el experimental se incrementa. Esto apoya la hipótesis del efecto positivo de los fructanos tipo inulina del agave en la absorción de Ca relacionado a la salud ósea.

## **X. RECOMENDACIONES**

De acuerdo a nuestro conocimiento al momento de la publicación de este trabajo, esta es la primera investigación realizada en PNH respecto al efecto de la inulina del agave en la absorción de Ca y los resultados sugieren la necesidad de explorar con mayor detalle sus efectos para comprender en qué medida este prebiótico beneficia la salud ósea. Para futuras investigaciones se recomienda analizar marcadores osteoespecíficos de formación ósea en suero sanguíneo como son fosfatasa alcalina ósea (FAO), PTH y el propéptido C-terminal de protocógeno tipo I (PICP), así como marcadores específicos de resorción ósea como el telopéptido C-terminal de colágeno tipo I (ICTP). Asimismo, en proyectos de larga duración, se recomienda hacer una segunda TAC para evaluar si hubo cambios en la DMO.

Otra prospectiva de investigación que se sugiere realizar es la de determinar la diversidad del microbioma intestinal y medir sus cambios al suplementar la dieta con el prebiótico, así como la realización de estudios a largo plazo para explorar si los cambios en el microbioma intestinal con el uso de prebióticos reducen el riesgo de desarrollar osteopatologías en poblaciones con predisposición genética a la osteoporosis.

## XI. REFERENCIAS

1. Abhari KH., Shekarforoush S.S, Sajedianfard J., Hosseinzadeh S., Nazifi S. (2015) The effects of probiotic, prebiotic and synbiotic diets containing *Bacillus coagulans* and inulin on rat intestinal microbiota. *Iranian Journal of Veterinary Research* 16(3):267-273. DOI: [10.4081/vsd.2015.5919](https://doi.org/10.4081/vsd.2015.5919)
2. Abou-Arab A.A., Talaat H.A., Abu-Salem F.M. (2011) Physico-chemical properties of inulin produced from Jerusalem artichoke tubers on bench and pilot plant scale. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(5):1297-1309.
3. Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM, Liang L, Gunn SK, Darlington G, Ellis KJ. (2005). A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 82:471–6. DOI: [10.1093/ajcn.82.2.471](https://doi.org/10.1093/ajcn.82.2.471)
4. Adams JE. 2009. Quantitative computed tomography. *Eur J Radiol*. 71(3):415–424. DOI: [10.1016/j.ejrad.2009.04.074](https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2009.04.074).
5. Awumey, E. M.; Bukoski, R. D., Cellular functions and fluxes of calcium. In *Calcium in Human Health*, Weaver CM, H. R., Ed. Humana Press: New Jersey, 2006; pp 13-35. DOI: [10.1007/978-1-59259-961-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-961-5_3)
6. Aziziyeh R, Amin M, Habib M, Garcia Perlaza J, Szafranski K, McTavish RK, Disher T, Lüdke A y Cameron C (2019): The burden of osteoporosis in four Latin American countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina, *Journal of Medical Economics*. DOI: [10.1080/13696998.2019.1590843](https://doi.org/10.1080/13696998.2019.1590843)

7. Bachrach LK, 2000. Dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) measurements of bone density and body composition: promise and pitfalls. *JPEM* 13(2):983-988. PMID: 11086651
8. Bala Y, Bui QM, Wang XF, Iuliano S, Wang Q, Ghasem-Zadeh A, Rozental TD, Bouxsein ML, Zebaze RM, Seeman E (2015) Trabecular and cortical microstructure and fragility of the distal radius in women. *J Bone Miner Res.* 30:621–629. DOI: 10.1002/jbmr.2388.
9. Bartl, R., & Bartl, C. (2019). Chapter 35: Osteoporosis in Children and Adolescents. *The Osteoporosis Manual*. Springer AG p.p.273–283. DOI: 10.1007/978-3-030-00731-7\_35
10. Bautista-Justo M., García-Oropeza L., Barboza-Corona JE., Parra-Negrete LA. (2001) El Agave tequilana Weber y la producción de tequila. *Acta Universitaria* 11(2):26-34. DOI: 10.15174/au.2001.301
11. Bellino FL y Wise PM. (2003) Nonhuman primate models of menopause workshop. *Biol Reprod.* 68(1):10-18. DOI: 10.1095/biolreprod.102.005215
12. Beto, JA. (2015) The role of Calcium in human aging. *Clin Nutr Res*; 4:1-8. DOI: 10.7762/cnr.2015.4.1.1
13. Black A, Tilmont EM, Handy AM, Scott WW, Shapses SA, Ingram DK, Roth GS, Lane MA. (2001) A Nonhuman Primate Model of Age-Related Bone Loss: A Longitudinal Study in Male and Premenopausal Female Rhesus Monkeys. *Bone.* 28: 295–302. DOI: 10.1016/s8756-3282(00)00452-x
14. Boronat M., Santana Á, Bosch E, Lorenzo D, Riaño M, García-Cantón C (2017) Advanced Non-Dialysis-Dependent Chronic Kidney Disease. *Nephron* 135:97-104. DOI: 10.1159/000450892

15. Bosscher D., Van Loo J., Franck A. (2006) Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. *Nutr Res Rev.* 19(2):216-26. DOI: 10.1017/S0954422407249686
16. Brett AD. y Brown JK. (2015) Quantitative computed tomography and opportunistic bone density screening by dual use of computed tomography scans. *J Orthop Translat.* 3(4): 178–184. DOI: 10.1016/j.jot.2015.08.006.
17. Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., & Gibson, D. L. (2012). Diet-Induced Dysbiosis of the Intestinal Microbiota and the Effects on Immunity and Disease. *Nutrients*, 4(8), 1095–1119. doi:10.3390/nu4081095
18. Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ, Aires J (2012) Cap 21: Usefulness of probiotics for neonates? en *Probiotics* Ed. Everlon Rigobelo. Intech Open. Brasil. Págs: 458-475. DOI: 10.5772/51265.
19. Cabrera-Pivaral, Carlos Enrique, Orozco-Valerio, María de Jesús, Báez-Báez, María Guadalupe Laura, Méndez-Magaña, Ana Cecilia, Covarrubias-Bermúdez, María de los Ángeles, & Zavala-González, Marco Antonio. (2018). Competencia clínica de médicos mexicanos de atención primaria para manejar osteoporosis. *Investigación en educación médica*, 7(27), 44-51.
20. Cagigas-Reig AL & Blanco-Anesto. (2002) Prebioticos y probioticos, una relación beneficiosa. *RevCubAlimentNutr.* 16: 63-68.
21. Cao, S., Cladis, D. P., & Weaver, C. M. (2020). Use of Calcium Isotopic Tracers to Determine Factors that Perturb Calcium Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* DOI:10.1021/acs.jafc.0c01641

22. Castel H, Bonneth DY, Sherf M, Liel Y. (2001) Awareness of osteoporosis and compliance with management guidelines in patients with newly diagnosed low-impact fractures. *Osteoporos Int.* 12: 7559-64. DOI: 10.1007/s001980170077.
23. Cerroni AM, Tomlinson GA, Turnquist JE, Grynepas MD. (2000) Bone Mineral Density, Osteopenia, and Osteoporosis in the Rhesus Macaques of Cayo Santiago. *Am J PhysAnthropol.* 113: 389-410. DOI: 10.1002/1096-8644(200011)113:3<389::AID-AJPA9>3.0.CO;2-I.
24. Cerroni AM, Tomlinson GA, Turnquist JE, Grynepas MD. (2003) Effect of parity on bone mineral density in female rhesus macaques from Cayo Santiago. *Am J PhysAnthropol.* 121: 252-269. DOI: 10.1002/ajpa.10238
25. Cheng, C., Wentworth, K., & Shoback, D. M. (2019). New Frontiers in Osteoporosis Therapy. *Annual Review of Medicine*, 71(1): 277-288. DOI: 10.1146/annurev-med-052218-020620
26. Christe A, Heverhagen J, Ozdoba C, Weisstanner C, Ulzheimer S, Ebner L. CT dose and image quality in the last three scanner generations. *World J Radiol.* 2013;5:421–429. DOI: 10.4329/wjr.v5.i11.421
27. Cieslik E., Topolska K., Praznik W., Cruz Rubio J.M. (2012) Effect of agave fructans on selected parameters of calcium metabolism and bone conditions in rats. *Journal of Aging Research & Clinical Practice.* 1(2)103-108.
28. Clark E.M., Ness A., y Tobias J.H. (2005) Social position affects bone mass in childhood through opposing actions on height and weight. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20:2082-2089. DOI: 10.1359/JBMR.050808
29. Clark P, Cons-Molina F, Deleze M, Ragi S, Haddock L, Zanchetta JR, Jaller JJ, Palermo L, Talavera JO, Messina DO, Morales-Torres J, Salmerón J, Navarrete A,

- Suárez E, Pérez CM y Cummings SR. (2009) The prevalence of radiographic vertebral fractures in Latin American countries: the Latin American Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS). *Osteoporos Int.* 20: 275-282. DOI: 10.1007/s00198-008-0657-4
30. Clark, P., Carlos, F., Vázquez Martínez J.L. (2010) Epidemiology, costs and burden of osteoporosis in Mexico. *Arch Osteoporos* 5(1-2) 9-17. DOI: 10.1007/s11657-010-0042-8
31. Clark, P., Denova-Gutiérrez, E., Zerbin, C., Sanchez, A., Messina, O., Jaller, J. J., Kanis, J. A. (2018). FRAX-based intervention and assessment thresholds in seven Latin American countries. *Osteoporosis International*, 29(3), 707–715. DOI: 10.1007/s00198-017-4341-4.
32. Colman RJ, Lane MA, Binkley N, Wegner FH and Kemnitz, JW. (1999a) Skeletal effects of aging in male rhesus monkeys. *Bone.* 24:17–23. DOI: 10.1016/s8756-3282(98)00147-1
33. Colman RJ, Kemnitz JW, Lane MA, Abbott DH, Binkley N. (1999b) Skeletal Effects of Aging and Menopausal Status in Female Rhesus Macaques. *J ClinEndocrinolMetab.* 84: 4144-8. DOI: 10.1210/jcem.84.11.6151
34. Colman RJ. (2017), Non-human primates as a model for aging, *BBA - Molecular Basis of Disease*. DOI:10.1016/j.bbadis.2017.07.00
35. Cooper C, Dawson-Hughes B, Gordon CM y Rizzoli R. (2015) Alimentación sana, huesos sanos. De qué manera influyen los factores nutricionales en la salud musculoesquelética a lo largo de la vida. International Osteoporosis Foundation. Disponible en: <http://www.worldosteoporosisday.org/sites/default/files/WOD15-Report-ES.pdf>

36. Corbo Pereira, D.N. (2004) Tomografía Axial Computada. XIII Seminario de Ingeniería Biomédica, Universidad de la República Oriental del Uruguay. Disponible en: [www.nib.fmed.edu.uy/Corbo.pdf](http://www.nib.fmed.edu.uy/Corbo.pdf)
37. Cosman F., de Beur SJ., LeBoff M.S., Lewiecki EM., Tanner B., Randall S., Lindsay R. (2014) Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int.* 25(10): 2359–2381. DOI: 10.1007/s00198-014-2794-2
38. Coxam V. (2007) Current data with inulin-type fructans and calcium, targeting bone health in adults. *J Nutr.*;137:2527S–2533S. DOI: 10.1093/jn/137.11.2527s
39. Cruzen C and Colman RJ. (2009) Effects of caloric restriction on cardiovascular aging in non-human primates and humans. *Clinics in Geriatric Medicine.* 25: 733-743. DOI: 10.1016/j.cger.2009.07.001
40. Cummings SR, Bates D, Black DM. (2002) Clinical use of bone densitometry: scientific review. *JAMA.* 288:1889-97. DOI: 10.1001/jama.288.15.1889
41. Dalle Carbonare L., Giannini S., Sartori L., Nobile M., Ciuffreda M., Silva Netto M., Arlot E., Crepaldi G. (2000). Lumbar osteoarthritis, bone mineral density, and quantitative ultrasound. *Aging Clinical and Experimental Research* 12(5):360-365. DOI: 10.1007/BF03339861
42. De la Cruz-Góngora V, Martínez-Tapia B, Cuevas-Nasu L, Rangel-Baltazar E, Medina-Zacarías MC, García-Guerra A, Villalpando S, Rebollar R, Shamah-Levy T. (2019) Anemia, deficiencias de zinc y hierro, consumo de suplementos y morbilidad en niños mexicanos de 1 a 4 años: resultados de la Ensanut 100k. *Salud Publica Mex.* 61:821-832. DOI: <http://dx.doi.org/10.21149/10557>
43. Dempster DW. (2003) Bone microarchitecture and strength. *Osteoporos Int.* 14 (5): 4-6. DOI:10.1007/s00198-003-1474-4.

44. Ducharme N. (2010) Male osteoporosis. *Clin Geriatr Med.* 26: 301-309. DOI: 10.1016/j.cger.2010.02.005.
45. Ebeling PR, Akesson K (2001) Role of biochemical markers in the management of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Ha* 15(3):385-400. DOI: 10.1053/berh.2001.0156
46. Ebersole JL, Steffen MJ, Gonzales-Martínez J, Novak MJ. (2008) Effects of age and oral disease on systemic inflammatory and immune parameters in Nonhuman Primates. *Clin Vaccine Immunol.* 15(7): 1067-1075. DOI: 10.1128/CVI.00258-07
47. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. (2003) Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest.* 111(8):1221–30. DOI: 10.1172/JCI17215.
48. Fernández A, Sosa P, Setton D, Desantaddina V, Fabeiro M, Martinez MI, Piazza N, Casavalle P, Tonietti M, Vacarezza V, de Grandis S, Granados N, Hernández J (2011). *Calcio y Nutrición. Sociedad Argentina de Pedriatría. Buenos Aires.* Disponible en: <http://www.sap.org.ar/docs/calcio.pdf>
49. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L (2006) Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med. oral patol. oral cir.bucal.* 11(2)
50. Ferrari, SL (2019). *Pathophysiology of Osteoporosis en: Pocket Reference to Osteoporosis. IOF / Springer. Suiza. Págs 1-10.* DOI: 10.1007/978-3-319-26757-9\_1
51. Flamm G., Glinsmann W., Kritchevsky D., Prosky L., Roberfroid M. (2001) Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 41(5):353-62. DOI: 10.1080/20014091091841.

52. Fontana L, Patridge L (2015) Promoting health and longevity through diet: From model organisms to humans. *Cell* 26;161(1):106-118. DOI: 10.1016/j.cell.2015.02.020
53. Garcia-Vieyra MI, Del Real A, Lopez MG. (2014) Agave fructans: their effect on mineral absorption and bone mineral content. *J Med Food*.;17:1247–1255. DOI: 0.1089/jmf.2013.0137
54. Gelli, R., Ridi, F., & Baglioni, P. (2019). The importance of being amorphous: Calcium and magnesium phosphates in the human body. *Adv Colloid Interface Sci* 269:219-235 DOI: 10.1016/j.cis.2019.04.011
55. Genant HK, Engelke K, Fuerst T, Glüer CC, Grampp S, Harris ST, Jergas M, Lang T, Lu Y, Majumdar S, Mathur A, Takada M (1996) Noninvasive assessment of bone mineral and structure: state of the art. *J Bone Miner Res.* 11(6):707-30. DOI: 10.1002/jbmr.5650110602
56. Geunsens P y van der Bergh J (2019). Management of Male Osteoporosis en: Pocket Reference to Osteoporosis. IOF / Springer. Suiza. Págs 71-80. DOI: 10.1007/978-3-319-26757-9\_7
57. Gibbs RA, Mardis ER, Remington KA, Strausberg RL, Venter, Weinstock GM, Wilson RK et. al. (2007) Evolutionary and Biomedical Insights from the Rhesus Macaque Genome. *Science* 316(5822):222-234. DOI: 10.1126/science.1139247
58. Gibson, GR & Roberfroid, MB. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401–1412. DOI: 10.1093/jn/125.6.1401
59. Gibson GR., Hutkins R., Sanders ME., Prescott S., Reimer R.A., Salminen S., Scott K., Stanton C., Swanson KS., Cani PD., Verbeke K. y Reid G. (2017) Expert

consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 14:491-502. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.75.

60. Giner Ruiz V., Gallo Vallejo F.J, Medina Abellán M.D, Nieto Pol E., León Vázquez F., Pérez Martín A., Mas Garriga X., Vargas Negrín F. (2014) Osteoporosis Manejo: prevención, diagnóstico y tratamiento. Madrid: semFYC. Disponible en: [https://www.semfyec.es/wp-content/uploads/2016/03/Libro\\_Osteoporosis14\\_Def.pdf](https://www.semfyec.es/wp-content/uploads/2016/03/Libro_Osteoporosis14_Def.pdf)
61. Glibowski, P., Bukowska, A. (2011). The effect of pH, temperature and heating time on inulin chemical stability. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 10:189–196. Disponible en: [https://www.food.actapol.net/pub/5\\_2\\_2011.pdf](https://www.food.actapol.net/pub/5_2_2011.pdf)
62. Gómez Alonso C. y Díaz López B. (2004) Capítulo IV - Métodos de determinación de la densidad mineral ósea en Sosa Henríquez M. *Protocolos de Medicina Interna: Osteoporosis* (pp. 49-70). Madrid: SEMI. DOI: 10.1016/S0014-2565(09)73241-2
63. González LA, Vásquez GM, Molina JF. (2009) Epidemiología de la osteoporosis. *RevColombReumatol*. 16: 61-75.
64. Goo HW. (2012) CT radiation dose optimization and estimation: an update for radiologists. *Korean J Radiol* 13:1-11. DOI: 10.3348/kjr.2012.13.1.1
65. Goretti Penido M. y Alon U.S. (2012) Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatr Nephrol* 27(11):2039-2048 DOI: 10.1007/s00467-012-2175-z
66. Hardam J, Limbird L. Editores. *Goodman and Gilman* (2003) Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10a edición México, McGraw Hill Interamericana.

67. Havill LM<sup>1</sup>, Allen MR, Harris JA, Levine SM, Coan HB, Mahaney MC, Nicoletta DP (2013) Intracortical bone remodeling variation shows strong genetic effects. *Alcif Tissue Int.* 93(5):472-80. DOI: 0.1007/s00223-013-9775-x
68. He Y, Wang Q, Li X, Wang G, Zhao J, Zhang H, Chen W (2020) Lactic acid bacteria alleviate polycystic ovarian syndrome by regulating sex hormone related gut microbiota *Food Funct.* 11-5192-520 doi: 10.1039/C9FO02554E
69. Hendrickson N., Pickhardt PJ., Muñoz del Rio A., Rosas HG., Anderson PA. 2018. Bone Mineral Density T-Scores Derived from CT Attenuation Numbers (Hounsfield Units): CLinical Utility and Correlation with Dual-Energy X-ray Absorptiometry. *Iowa Orthop J.* 38:25-31. PMID 30104921
70. Hernández-Godínez B, Ibáñez-Contreras A, Perdigón Castañeda G, Galván-Montaño A, García Montes de Oca G, Zapata-Valdez C, and Tena Betancourt E. (2010) Radiographic Incidence of Spinal Osteopathologies in Captive Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *CompMed.* 60: 1–4. PMID 21262126
71. Hernández-Godínez B., Ibáñez-Contreras A., Durand-Rivera A., Reyes-Pantoja SA., Ramírez-Hernández R., Rodríguez-Guzmán P., Tena-Betancourt E. (2011) Somatosensory evoked potentials of median and tibial nerves in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) under captivity: influence of ontogenic status in neonatal, infant, young, adult, and senile stages. *J Med Primatol.* 40(2):79-87. DOI: 10.1111/j.1600-0684.2010.00458.x
72. Hernández-Godínez B, Ibáñez-Contreras A, Reyes-Pantoja S, Durand-Rivera A, Galvan-Montaño A, Perdigón-Castañeda G, Climent-Palmer MC & Tena-Betancourt E. (2012) Preliminary studies of neurosensory and cardiopulmonary health

- compromise in captive– bred Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) suffering scoliosis. *J Med Primatol.* 41:163–171. DOI: 10.1111/j.1600-0684.2012.00539.x.
73. Hernández-Godínez B, Bonilla JH, Poblano A, Arteaga-Silva M, Medina HA, Contreras-Uribe A., Ibañez-Contreras A (2019) Effect of different anesthetic mixtures—ketamine-xylazine, ketamine-acepromazine and tiletamine-zolazepam—on the physiological and blood biochemistry parameters of male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) at different ages. *Animal Model Exp Med.* 2: 83– 97. <https://doi.org/10.1002/ame2.12062>
74. Hervás A, Hermoso de Mendoza M, Forcén T. (2006) Documento para el manejo de la Osteoporosis en Atención primaria (Actualización 2006). Dirección de Atención Primaria del Servicio de Salud-Osasunbidea. Sociedad Navarra de Medicina de Familia y Atención Primaria (SNAMFP). 1-55. DOI: 10.4321/S1137-66272005000500013
75. Hicks AL, Lee KJ, Couto-Rodriguez M, Patel J, Sinha R, Guo C, Olson SH, Seimon A, Seimon TA, Ondzie AU, Karesh WB, Reed P, Cameron KN, Lipkin WI, Williams BL (2018) Gut microbiomes of wild great apes fluctuate seasonally in response to diet. *Nat Commun.* 9(1):1786. DOI: 10.1038/s41467-018-04204-w
76. Hidalgo-Solórzano E, Pérez-Núñez R, Valdez-Santiago MR, Híjar-Medina M. (2019) Análisis de las lesiones accidentales no fatales en población vulnerable, México 2018. *Salud Publica Mex.* 61:907-916. DOI: 10.21149/10549
77. Hoel RJ., Ledonio CG., Takahashi T., Polly DW Jr. (2017) Sacral bone mineral density (BMD) assessment using opportunistic CT scans. *J Orthop Res.* 35(1):160-166. DOI: 10.1002/jor.23362

78. Holscher HD., Bauer L.L., Gourineni V., Pelkman CL., Fahey GC., Swanson K.; (2015) Agave Inulin Supplementation Affects the Fecal Microbiota of Healthy Adults Participating in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial; *The Journal of Nutrition*; 145(9):2025–2032. DOI: 10.3945/jn.115.217331
79. Ibáñez-Contreras A, Hernández-Godínez B, Reyes-Pantoja SA, Jiménez-García A, Morales-Cruz E, Justo-Juárez TP, Galván-Montaño A. (2011) Clinical Evaluation in geriatric rhesusmonkeys (*Macaca mulatta*): Through serological studies and physiological constants in captivity. *JAVA*.10: 3281-3286.
80. Ibáñez-Contreras A, Hernández-Godínez B, Reyes-Pantoja SA, et al. Changes in blood parameters in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) during the first trimester of gestation. *J Med Primatol*. 2013;42(4):171-176. doi:10.1111/jmp.12052
81. Institute of Medicine (US) (1997) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intake for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington (DC): National Academies Press (US) 5 Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK109813/> el 12 de abril de 2020.
82. International Osteoporosis Foundation (IOF) (2012) Latin America Regional Audit - Mexico. Disponible en: <https://www.iofbonehealth.org/data-publications/regional-audits/latin-america-regional-audit>
83. Johnell O. y Kanis J.A. (2006) An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Inter* 17:1726. DOI: 10.1007/s00198-006-0172-4

84. Kanis JA. (2002) Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet*. 359: 1929-1936. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)08761-5
85. Kanis JA. On behalf of the WHO Scientific Group (2008) Assessment of osteoporosis at the primary health-care level. Technical Report. WHO Collaborating Centre, University of Sheffield, UK. Disponible en: [https://www.sheffield.ac.uk/FRAX/pdfs/WHO\\_Technical\\_Report.pdf](https://www.sheffield.ac.uk/FRAX/pdfs/WHO_Technical_Report.pdf)
86. Kanis JA., Cooper C., Rizoli R., Reginster J.Y. (2019) European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int*.30(1):3-44. DOI: 10.1007/s00198-018-4704-5.
87. Kessler MJ., Wang Q., Cerroni AM., Gynpas MD., González Velez OD., Rawlings RG., Ethun KF., Wimsatt JH., Kensler TB., Prizker KP. (2016) Long-term effects of castration on the skeleton of male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Am J Primatol*. 78(1):152-66. DOI: 10.1002/ajp.22399
88. Kini U., Nandeesh B.N. (2013) Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In: Fogelman I., Gnanasegaran G., van der Wall H. (eds) *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Springer, Berlin, Heidelberg. Pp 29-57. DOI: 10.1007/978-3-642-02400-9\_2
89. Kittivanichkul D, Watanabe Gen, Nagaoka K, Malaivijitnond S, (2016) Changes in bone mass during the perimenopausal transition in naturally menopausal cynomolgus monkeys, *Menopause*: 23(1): 87-99 doi: 10.1097/GME.0000000000000556
90. Khosla, S., & Hofbauer, L. C. (2017). Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 5(11), 898–907. DOI: 10.1016/S2213-8587(17)30188-2

91. Koenen ME., Cruz Rubio JM., Mueller Mo., Venema K. (2016) The effect of agave fructan products on the activity and composition of the microbiota determined in a dynamic in vitro model of the human proximal large intestine. *Journal of Functional Foods*. 22:201-210. DOI: 10.1016/j.jff.2016.01.018
92. Lago AA, Parada TM, Somera IJ. (2008) Prevalencia de osteoporosis en población abierta de la Ciudad de México. *GinecolObstetMex*. 76: 261-6.
93. Langlands SJ, Hopkins MJ, Coleman N, Cummings JH. (2004) Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut*.;53:1610–1616. DOI: 10.1136/gut.2003.037580
94. Lazcano-Ponce, E., Tamayo, J., Díaz, R., Burguete, A.I. y Salmerón, J. (2009) Correlation trends for bone mineral density in Mexican women: evidence of familiar predisposition. *SaludPública de México*, 51:93-9. DOI: 10.1590/s0036-36342009000700012
95. Leach, JD y Sobolik, KD. (2010) high dietary intake of prebiotic inulin-type fructans in the prehistoric Chihuahuan Desert. *British Journal of Nutrition*. 103(11):1558-1561 DOI: 10.1017/S0007114510000966
96. Li L., Rao S., Cheng Y., Zhuo X., Deng C., Xu N., Zhang H., Yang L. (2019) Microbiotal osteoporosis: The interplay between the gut microbiota and bones via host metabolism and immunity. *MicrobiologyOpen*. 8:e810. DOI 10.1002/mbo3.810
97. Lim Fat D., Kennedy J., Galvin R., O'Brien F., McGrath F., Mullet H. (2012) The Hounsfield value for cortical bone geometry in the proximal humerus-An in vitro study. *Skeletal Radiol*.41:557-568. DOI: 10.3390/nu7115442

98. Locantore P, Del Gatto V, Gelli S, Paragliola RM, Pontecorvi A (2020) The Interplay Between Immune System and Microbiota in Osteoporosis. *Mediators Inflamm* Feb 26;2020:3686749. DOI: 10.1155/2020/3686749.
99. López-Velázquez G., Parra-Ortiz M., De la Mora-De la Mora, I., García-Torres I., Enríquez-Flores S., Alcántara-Ortigoza MA., González del Ángel A., Velázquez-Aragón J. (2015). Effects of fructans from Mexican Agave in Newborns Fed with Infant Formula: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients*; 7(11):8939-8951. DOI: 10.3390/nu7115442
100. Luque Sendra M.I. (2009) Capítulo 3: Biología Ósea. Estudio de la morfología del cuerpo vertebral en una L4 humana con modelos de remodelación ósea interna y externa. Proyecto de fin de carrera para obtener el título de Ingeniero Industrial. Universidad de Sevilla. págs 37-72. Disponible en: <http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/4640>
101. Madrigal L, Sangronis E. (2007) La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. 57:387-396. Disponible en: <http://www.piaschile.cl/wp-content/uploads/2015/04/La-inulina-y-derivados-como-ingredientes-claves-en-alimentos-funcionales.pdf>
102. Mancilla-Margalli, N.A., López, M.G. (2006) Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from Agave and *Dasyliirion* Species. *J Agric Food Chem* 54 (20):7832–7839. DOI: 10.1021/jf060354v
103. Manuzak J., Zevin A., Cheu R., Richardson B., Modesitt J., Hensley-McBain T., Miller Ch., Gustin A., Coronado E., Gott T., Fang M., Cartwright M., Wangari S., Agricola B., May D., Smith E., Hampel H.B., Gale M., Cameron Ch. M., Cameron

- M.J., Smedley J. y Klatt N.R. (2019). Antibiotic-induced microbiome perturbations are associated with significant alterations to colonic mucosal immunity in rhesus macaques. *Mucosal Immunology*. DOI: 10.1038/s41385-019-0238-1
104. Marinova M, Edon B, Wolter K, Katsimbari B, Schild HH, Strunk HM. (2015) Use of routine thoracic and abdominal computed tomography scans for assessing bone mineral density and detecting osteoporosis. *Curr Med Res Opin.*; 31(10):1871–1881. DOI: 10.1185/03007995.2015.1074892
105. Marshall D, Johnell O, Wedel H (1996) Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ* 312:1254-59
106. Mattison, J., Colman, R., Beasley, T. Allison D., Kemnitz, J, Roth G., Ingram D., Weindruch R., de Cabo R. (2017) Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat Commun* 8, 14063. DOI: 10.1016/s0531-5565(02)00146-8.
107. McCabe L., Britton RA. Parameswaran N. (2015) Prebiotic and Probiotic Regulation of Bone Health: Role of the Intestine and its Microbiome. *Curr Osteoporos Rep.* 13(6):363-371. 10.1007/s11914-015-0292-x
108. Meier H y Reid JSG (2012) Chap 11: Reserve polysaccharides other than starch in higher plants en: *Plant Carbohydrates I. Encyclopedia of Plant Physiology.* (Editor Tanner LW). Springer Science & Business Media. Vol. 13. pp 418-471.
109. Mejía-Rodríguez F, Mundo-Rosas V, Rodríguez-Ramírez S, Hernández-F M, García-Guerra A, Rangel-Baltazar E, Gómez-Acosta LM, Shamah-Levy T.(2019) Alta prevalencia de anemia en mujeres mexicanas en pobreza, Ensanut 100k. *Salud Publica Mex.*61:841-851. DOI: 10.21149/10558

110. Mellado-Mojica, E., López, M.G., 2012. Fructan metabolism in A. tequilana Weber blue variety along its development cycle in the field. *J Agric Food Chem* 60, 11704–11713. DOI: 10.1021/jf303332n
111. Mendoza Romo MA, Escalante Pulido JM, Martínez Zúñiga R, Ramirez Arriola MA. (2003) Osteoporosis en mexicanas mayores de 40 años. Determinación por densitometría periférica. *RevMed IMSS*. 41: 193-202
112. Moayyeri A., Kaptoge S., Delzell N., Binham S., Luben R.N., Wareham N.J., Reeve J., Khaw K.T. (2009) Is QUS or DXA better for predicting the 10-year absolute risk of fracture? *JBMR*. 24(7):1319–25. DOI: 10.1359/jbmr.090212
113. Moyad A.M. (2003) Osteoporosis: a rapid review of risk factors and screening methods. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 21(5):375-379. DOI: 10.1016/S1078-1439(03)00140-6
114. Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, Silvi S, Orpianesi C, Verdenelli MC, Clavel T, Koebnick C, Zunft HJ, Doré J, Blaut M (2006) Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol*. 72(2):1027-33. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1027-1033.2006.
115. Mundy, G.R. y Guise T.A. (1999) Hormonal control of Calcium Homeostasis. *Clinical Chemistry* 45(8) 1347-1352
116. National Institute for Health and Care Excellence (NICE) (2017). Osteoporosis: assesing the risk of fragility fracture. Clinical guideline CG146. Disponible en: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg146>

117. National Institutes of Health Consensus (NIH) (2001) Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Consensus Conference. JAMA. 285:785-795. DOI: 10.1001/jama.285.6.785.
118. Nygaard L., Skallerup A., Olesen SS., Kohler M., Vinter-Jensen L., Kruse C., Vestergaard P., Ramussen HH. (2017) Osteoporosis in patients with intestinal insufficiency and intestinal failure: Prevalence and clinical risk factors. Cln Nutr. 37(5):1654-1660. DOI: 10.1016/j.clnu.2017.07.018
119. O'Hara AM, Shanahan F. (2006) The gut flora as a forgotten organ. EMBO Rep. 7:688–693. DOI 10.1038/sj.embor.7400731
120. Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, Abe F, Osawa R (2016) Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. BMC Microbiol. 16:90. DOI: 0.1186/s12866-016-0708-5.
121. Office of the Surgeon General. (2004). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville (MD): Office of the Surgeon General US. PMID: 20945569
122. Ohta A, Motohashi Y, Sakai K, Hirayama M, Adachi T, Sakuma K. (1998) Dietary fructooligosaccharides increase calcium absorption and levels of mucosal calbindin-D9k in the large intestine of gastrectomized rats. Scand J Gastroenterol;33:1062–1068. DOI: 10.1080/003655298750026769.
123. Ohta A, Uehara M, Sakai K, Takasaki M, Adlercreutz H, Morohashi T, Ishimi Y. (2002) A combination of dietary fructooligosaccharides and isoflavone conjugates increases femoral bone mineral density and equol production in ovariectomized mice. J Nutr.;132:2048–2054. DOI: 10.1093/jn/132.7.2048.

124. Olagnero G., Abad A., Bendersky S., Genevois C. (2007) Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*. 25(121)20-33.
125. Organización Mundial de la Salud (OMS) (1994) Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO. Technical report series. Ginebra. Suiza. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39142>
126. Organización Mundial de la Salud (OMS) (1996) Research on the menopause in the 1990. Report of a WHO Scientific group. WHO Technical Report Series 866, Geneva. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41841>
127. Organización Mundial de la Salud (OMS) (2007) WHO Scientific Group on the assesement of osteoporosis at primary health care level. Summary meeting report Brussels, Belgium, 5-7 May 2004. Disponible en: <https://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf>
128. Ortiz LT, Rodriguez ML, Alzueta C, Rebole A, Trevino J. (2009) Effect of inulin on growth performance, intestinal tract sizes, mineral retention and tibial bone mineralization in broiler chickens. *Br Poult Sci*.;50:325–332. DOI: 10.1080/00071660902806962
129. Patel SP., Lee J.J., Hechy GG., Holcombe SA., Wang SC., Goulet JA. (2016) Normative Vertebral Hounsfield Unit Values and Correlation with Bone Mineral Density. *J. Clin Exp Orthop*; 2:14. DOI: 10.4172/2471-8416.100014
130. Peacock M (2010) Calcium Metabolism in Health and Disease. *CJASN* 5(1) S23-S30. DOI: <https://doi.org/10.2215/CJN.05910809>

131. Petkova N, Ivanova M, Todorova M, Vlaseva R, Denev P. (2013). Spectrophotometric method for determination of inulin and fructooligosaccharides in lactic acid fermented dairy products, *Acta Scientifica Naturalis*.
132. Pope NS, Gould KG, Anderson DC, Mann DR (1999) Effects of age and sex on bone density in the rhesus monkey. *Bone*. 10(2):109-112. DOI: 10.1016/8756-3282(89)90007-0
133. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-049-SSA2-2017, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica de la osteoporosis. Publicado en el DOF el 06 de septiembre de 2017.
134. Ramnani P., Costabile, A., Bustillo A.G.R., Gibson G.R. (2015) A randomized, double-blind, cross-over study investigation the prebiotic effect of agave fructans in healthy human subjects. *Journal of Nutritional Science*. 4(10). DOI: 10.1017/jns.2014.68
135. Reich NE., Seidelmann FE. (1976) Radiology clinic. *J Am Osteopath Assoc*.75(5):518-520
136. Rinninella E., Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Donato Miggiano GA, Gasbarrini A., Mele MC (2019) What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A changing Ecosystem across Age, Environment, Diet and Diseases. *Microorganisms* 7(14), doi: 10.3390/microorganisms7010014
137. Rivera-Huerta M. (2017b) Evaluación de Inulina de agave azul (*Agave tequilana* Weber Var. azul) e Inulina de achicoria (*Chicoriumintybus*) y su combinación con isoflavonas, sobre los niveles de calcio en ratas Wistar (Hsd:Wi) Ooforectomizadas. UNAM 65pp

138. Rivera-Huerta M, Lizárraga-Grimes VL, Castro-Torres IG, Tinoco-Méndez M, Macías-Rosales L, Sánchez-Bartéz F, Tapia-Pérez GG, Romero-Romero L, Gracia-Mora MI (2017) Functional Effects of Prebiotic Fructans in Colon Cancer and Calcium Metabolism in Animal Models. *BioMed Research Int.* DOI: 10.1155/2017/9758982
139. Roberfroid MB. (1999) Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *J Nutr.* 129(7Suppl):1398S-401S. DOI: 10.1093/jn/129.7.1398S
140. Roberfroid MB. (2000). Prebiotics and Probiotics: Are they functional foods?. *Am J Clin Nutr.* 71: 1682S-7S. DOI: 10.1093/ajcn/71.6.1682S
141. Roberfroid M, Cumps J, Devogelaer JP. (2002) Dietary Chicory Inulin Increases Whole- Body Bone Mineral Density in Growing Male Rats. *J. Nutr.* 132: 3599–3602. DOI: 10.1093/jn/132.12.3599
142. Roberfroid MB. (2007) Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr.* 200737(11 Suppl):2493S-2502S. DOI: 10.1093/jn/137.11.2493S
143. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr.*;104(2):S1–63. DOI: 10.1017/S0007114510003363
144. Romero Bardo CM, Manrique Arija S., Rodríguez Pérez M. (2012) Marcadores bioquímicos en osteoporosis. Utilidad en la práctica clínica. *Reuma Clin* 8(39): 149-152. DOI: 10.1016/j.reuma.2011.05.010
145. Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Méndez Gómez-Humarán I, Gaona-Pineda EB, Gómez-Acosta LM (2017) Diseño metodológico de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Salud Publica Mex.* 59(3):299-305. DOI: <http://doi.org/10.21149/8593>

146. Roschger P, Gupta HS, Berzlanovich A, Ittner G, Dempster DW, Fratzl P, Cosman F, Parisien M, Lindsay R, Nieves JW y Klaushofer K, (2003) Constant mineralization density distribution in cancellous human bone. *Bone*, 32:316-323. DOI: 10.1016/s8756-3282(02)00973-0.
147. Rosen CJ. (2017) *The Epidemiology and Pathogenesis of Osteoporosis*. En Endotext Ed. Feingold KR, Anawalt B, Boyce B. et al., South Dartmouth. MDText.com, Inc. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279134/>
148. Ross, AC., Taylor, CL., Yaktine, AL., et al. 2011. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. Washington (DC). National Academies Press. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56064/>
149. Roth GS, Mattison JA, Ottinger MA, Chachich ME, Lane MA, Ingram DK.(2004) Aging in rhesus monkeys: relevance to human health interventions. *Science*.305(5689):1423-1426. doi:10.1126/science.1102541
150. R egsegger, P., Elsasser, U., Anliker, M., Gnehm, H., Kind, H., & Prader, A. (1976). Quantification of Bone Mineralization Using Computed Tomography. *Radiology*, 121(1), 93–97. DOI: 10.1148/121.1.93.
151. Saggese, G., Baroncelli, G. I., & Bertelloni, S. (2001). Osteoporosis in Children and Adolescents: Diagnosis, Risk Factors, and Prevention. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 14(7). DOI: 10.1515/jpem.2001.14.7.833
152. Sanchez-Pimienta, T. G., Lopez-Olmedo, N., Rodriguez-Ramirez, S., Garcia-Guerra, A., Rivera, J. A., Carriquiry, A. L., & Villalpando, S. (2016). High Prevalence of Inadequate Calcium and Iron Intakes by Mexican Population Groups

- as Assessed by 24-Hour Recalls. *Journal of Nutrition*, 146(9), 1874S–1880S. DOI: 10.3945/jn.115.227074
153. Scholz-Ahrens KE, Ade P, Marten B, Weber P, Timm W, Acil Y, Gluer CC, Schrezenmeir J. 2007. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *J Nutr.*; 137:838S–846S. DOI: 10.1093/jn/137.3.838S
154. Schurman L, Bagur A, Claus-Hermerg H, Messina OD, Negri AL, Sánchez A, González C, Diehl M, Rey P, Gamba J, Chiarpenello J, Moggia MS, Mastaglia S. (2013) Guías 2012 para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la osteoporosis. *Medicina (Buenos Aires)*. 73: 55-74.
155. Seeman E. (2005) Loading and bone fragility. *J Bone Miner Metab.* 23(Suppl):23–9. DOI: 10.1007/BF03026319
156. Seeman, E. (2015) Growth and Age-Related Abnormalities in Cortical Structure and Fracture Risk. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 30(4): 419–428. DOI: 10.3803/EnM.2015.30.4.419
157. Shamah LT, Cuevas NL, Romero MM, Gaona PEB, Gómez ALM, Medoza ALR, Méndez G-HI, Rivera DJ (2017) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018- Diseño Conceptual. *Salud Publica Mex.* 59(3):299-305. Disponible en: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ensanut/2018/doc/ensanut\\_2018\\_diseno\\_conceptual.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ensanut/2018/doc/ensanut_2018_diseno_conceptual.pdf)
158. Shapurian T., Damoulis P.D., Reiser G.M., Griffin T.J., Rand W.M. (2006) Quantitative evaluation of bone density using the Hounsfield index. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 21:290–297. PMID: 16634501

159. Skibsted, L.H. Mineral nutrient interaction: Improving bioavailability of calcium and iron (2016). *Food Sci Biotechnol* 25, 1233–1241. DOI: 10.1007/s10068-016-0196-2
160. Slevin MM, Allsopp PJ, Magee PJ, Bonham MP, Naughton VR, Strain JJ, Duffy ME, Wallace JM, Mc Sorley EM. (2014) Supplementation with calcium and short-chain fructo-oligosaccharides affects markers of bone turnover but not bone mineral density in postmenopausal women. *J Nutr.*;144:297–304 DOI: 10.3945/jn.113.188144
161. Snyder SM, Schneider E. (1991) Estimation of mechanical properties of cortical bone by computed tomography. *J Orthop Res.* 9:422–431 DOI: 10.1002/jor.1100090315
162. Soen, S. (2009) Drug therapy of secondary osteoporosis: glucocorticoid-induced osteoporosis. *Nippon Rinsho.* 67: 985-590. PMID: 19432121
163. Solís-Chávez SA, Ibañez-Contreras A., Reyes-Pantoja SA., Perdigon-Castañeda G., Hernández-Godínez B. (2013) Absence of the right wing of the illium generated a compensatory scoliosis in rhesus monkey in captivity: Diagnostic imaging and its alteration on the SEPNT. *J.Med Primatol.* 43:44-47. DOI: 10.1111/jmp.12076
164. Solís-Chávez S.A., Castillo-Rivera M.A., Arteaga-Silva M., Ibañez-Contreras A., Hernández-Godínez B., Morón-Mendoza A., Medoza-Cuevas G., Morales-Guadarrama A., Sacristán-Rock E. (2018). Computed tomography is a feasible method for quantifying bone density in *Macaca mulatta*. *Vet. Radiol Ultrasound* 1-6. DOI: 10.1111/vru.12624

165. Sözen T., Özişik L, y Başaran N.C. 2017. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol.* 4(1): 46–56. DOI: 10.5152/eurjrheum.2016.048
166. Swaminathan R (2001) Biochemical markers of bone turnover. *Clinica Chimica Acta* 313:95-105. DOI: 10.1016/s0009-8981(01)00656-8
167. Takahara S, Morohashi T, Sano T, Ohta A, Yamada S, Sasa R. (2000) Fructooligosaccharide consumption enhances femoral bone volume and mineral concentrations in rats. *J Nutr.*; 130:1792–1795. DOI: 10.1093/jn/130.7.1792
168. Tierney L, McPhee S y Papadakis M. (1999) Diagnóstico clínico y Tratamiento. 34a edición. México D.F., México: Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V.
169. Toriz, G., Delgado, E., and Zuñiga V. (2007). A proposed chemical structure for fructans from blue agave plant (Tequilana Weber var. azul) e-Gnosis (online) 5:1-5. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/730/73000510.pdf>
170. Torres-Arreola, L.P., Arnijo Delgadillo, R., Pérez Barba J.C.; Sánchez Huerta G., Parrilla Nombre J.I.; Zaragoza Delgado M.E. (2013) Animal models for osteoporosis IMSS. México. 49 págs.
171. Trinidad TP, Wolever TM, Thompson LU. (1996) Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. *Am J Clin Nutr.*;63:574–578. DOI: 10.1093/ajcn/63.4.574
172. Tunland, B. (2018). Human Microbiota in Health and Disease: From Pathogenesis to Therapy. Academic Press. 680 págs.
173. Turner RT., Maran A., Lontinun S., Hefferan T., Evans GL, Zhang M., Sinbonga JD. (2001) Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2(1):117-127. DOI: 10.1023/a:1010067326811

174. Uhr GT, Dohnalová L, Thaiss A (2019) The Dimension of Time in Host-Microbiome Interactions. *mSystems*. 4(1): e00216-18. DOI: 10.1128/mSystems.00216-18
175. Varley PF, McCarney C, Callan JJ, O'Doherty JV. (2010) Effect of dietary mineral level and inulin inclusion on phosphorus, calcium and nitrogen utilisation, intestinal microflora and bone development. *J Sci Food Agric*;90:2447–2454. DOI: 10.1002/jsfa.4105
176. Velázquez-Martínez JR, González-Cervantes RM, Hernández-Gallegos MA, Mediola RC, Aparicio AR, Ocampo ML (2014) Prebiotic potential of Agave angustifolia Haw fructans with different degrees of polymerization. *Molecules* 19(8):12660-12675. DOI: 10.3390/molecules190812660
177. Videan EN1, Heward CB, Fritz J, Murphy J, Cortez C, Su Y (2007) Relationship between sunlight exposure, housing condition, and serum vitamin D and related physiologic biomarker levels in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Comp Med*. 2007 Aug;57(4):402-6.
178. Vijayakumar R y Büsselberg D (2016) Osteoporosis: An under-recognized public health problem Local and global risk factors and its regional and worldwide prevalence. *JLGHS* 26(1) <https://doi.org/10.5339/jlghs.2016.2>
179. Walker ML, Herndon JG (2008) Menopause in Nonhuman Primates? *Biol.Reprod.* 79(3):398:406. DOI: 10.1095/biolreprod.108.068536
180. Walker WA (2017) Chapter 25: Dysbiosis. En: M.H. Floch, Y. Ringel y W.A. Walker(Ed.) *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics and Dysbiosis*. Academic Press. ISBN 9780128940249. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00025-2>

181. Weaver CM, Martin BR, Story JA, Hutchinson I, Sanders L. (2010) Novel fibers increase bone calcium content and strength beyond efficiency of large intestine fermentation. *J Agric Food Chem.*; 58:8952–8957. DOI: 10.1021/jf904086d
182. Weaver CM. (2015) Diet, gut microbiome, and bone health. *Curr Osteoporos Rep.* 13:125–130. DOI: 10.1007/s11914-015-0257-0
183. Weaver C, Miller JC (2017) Challenges in conducting clinical nutrition research. *Nutr Rev.* 2017 Jul; 75(7): 491–499. doi: 10.1093/nutrit/nux026
184. Weaver CM y Peacock M (2019) Chapter 10- Skeletal Changes Across the Life Span. In: *Basic and Applied Bone Biology*. 2ed. Academic Press. pp 189-202. DOI: 10.1016/B978-0-12-813259-3.00010-5
185. Wesolowski, J. R., & Lev, M. H. (2005). CT: History, Technology, and Clinical Aspects. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 26(6), 376–379. DOI: 10.1053/j.sult.2005.07.007
186. Wishner CM, Weaver CM (2017) Prebiotics and Bone. *Adv Exp Med Biol.* 1033:201-224. DOI: 10.1007/978-3-319-66653-2\_10.
187. Wishner CM, Castillo LF. 2018. Prebiotics, bone and mineral metabolism. *Calcif Tissue Int.* 102(4):443-479. DOI: 10.1007/s00223-017-0339-3
188. Yamate J, Tomita A, Kuwamura M, Mitsunaga F, Nakamura S. (2007) Spontaneous peritoneal malignant mesothelioma in a geriatric Japanese macaque (*Macaca fuscata*). *Exp Anim.* 56: 155-159. DOI: 10.1538/expanim.56.155
189. Yang LC, Wu JB, Lu TJ, Lin WC. (2013) The prebiotic effect of *Anoectochilus formosanus* and its consequences on bone health. *Br J Nutr*;109(10):1779-1788. DOI: 10.1017/S0007114512003777

190. Yatsosky II D, Pan K, Shendge VB, Liu J, Ebraheim NA (2019) Linkage of microbiota and osteoporosis: A mini literature review. *World J Orthop* 10(3): 123-127 DOI: 10.5312/wjo.v10.i3.123
191. Yoo, K. D., Kang, S., Choi, Y., Yang, S. H., Heo, N. J., Chin, H. J., ... Lee, H. (2016). Sex, Age, and the Association of Serum Phosphorus With All-Cause Mortality in Adults With Normal Kidney Function. *American Journal of Kidney Diseases*, 67(1), 79–88. DOI: 10.1053/j.ajkd.2015.06.027
192. Zanchetta José y cols. (2012) The latinamerica regional audit *Epidemiología, costos e impacto de la osteoporosis en 2012*. International Osteoporosis Foundation 05-500. Disponible en: [https://www.iofbonehealth.org/sites/default/files/media/PDFs/Regional%20Audits/2012-Latin\\_America\\_Audit-ES\\_0\\_0.pdf](https://www.iofbonehealth.org/sites/default/files/media/PDFs/Regional%20Audits/2012-Latin_America_Audit-ES_0_0.pdf)
193. Zarrinpar A, Chaix A, Yooseph S, Panda S. 2014. Diet and feeding pattern affect the diurnal dynamics of the gut microbiome. *Cell Metab* 20:1006–1017. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.11.008
194. Zhou H, Iida-Klein A, Lu SS, Ducayen-Knowles M, Levine LR, Dempster DW, Lindsay R. (2003) Anabolic action of parathyroid hormone on cortical and cancellous bone differs between axial and appendicular skeletal sites in mice. *Bone*. 32: 513-520. DOI: 10.1016/s8756-3282(03)00057-7
195. Ziemlewicz TJ., Maciejewski A., Binkley N., Brett AD., Brown JK., Pickhardt PJ. 2016. Opportunistic Quantitative CT Bone Mineral Density Measurement at the Proximal Femur Using Routine Contrast-Enhanced Scans: Direct Comparison with DXA in 355 Adults. *J Bone Miner Res*. 31(10):1835-1840. DOI: 10.1002/jbmr.2856

## XII. ANEXOS

Received: 13 September 2018 | Revised: 31 January 2018 | Accepted: 4 February 2018  
DOI: 10.1111/vru.12624

### ORIGINAL INVESTIGATION

WILEY

# Computed tomography is a feasible method for quantifying bone density in *Macaca mulatta*

Salvador A. Solís-Chávez<sup>1,2,3,4</sup> | Manuel A. Castillo-Rivera<sup>5</sup> | Marcela Arteaga-Silva<sup>6</sup> |  
Alejandra Ibáñez-Contreras<sup>2,3</sup> | Braulio Hernández-Godínez<sup>1,2,3,4</sup>  |  
Andrés Morón-Mendoza<sup>4</sup> | Gamaliel Mendoza-Cuevas<sup>3,4</sup> |  
Ayayácatl Morales-Guadarrama<sup>4</sup> | Emilio Sacristán-Rock<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Doctoral Program in Biological Sciences and Health, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Primate Laboratory, Applied Research in Experimental Biomedicine S.A. de C.V. (APREXBIO), Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Animal Experimentation Unit, Biología Integral para Vertebrados (BIOINVERT®), Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>National Center for Medical Imaging and Instrumentation Research (CI3M), Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

<sup>5</sup>Biology Dept., Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

<sup>6</sup>Reproduction Biology Dept., Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

#### Correspondence

Emilio Sacristán Rock, San Rafael Atlixco, 186. Col. Vicentina, Iztapalapa, Mexico City, Mexico 09340.  
Email: esr@xanum.uam.mx

#### Abstract

Osteopathologies are a result of advanced age and decreased bone density and represent a global health problem. It is therefore important to generate models for longitudinal studies of the pathophysiology in order to improve early diagnosis and develop preventive therapies. For this kind of research, the use of computed tomography (CT) to evaluate bone health offers advantages over other techniques since it provides more complete information. The aim of this prospective, pilot study was to obtain measurements of the left femur from a population in captivity of 32 rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) in order to standardize the model for future research. Healthy subjects from 5 to 28 years old were chosen. Three groups with different ages were formed as follows: (1) 5–9 years, (2) 10–19 years, and (3) 20–28 years. Semi-automatic segmentation by threshold defined the regions of interest, which were subdivided in the range of 300–700 Hounsfield units (HU) for trabecular bone and >700 HU for cortical bone. Then, the proportional ratios of the volumes of trabecular bone and cortical bone were obtained. Significant differences (analysis of variance test) in the averages of Hounsfield units, cortical, and trabecular bone proportions from each age group proved that a decrease in bone density begins at approximately 20 years of age. The values presented here, as well as the method to obtain them from CT scans, can be used as a baseline in a primate model for long-term research in bone pathology diagnosis and treatment.

#### KEYWORDS

Hounsfield units, medical imaging, nonhuman primates, rhesus monkey

## 1 | INTRODUCTION

Age is one of the most important risk factors for osteopathologies; the likelihood of suffering any type of fracture as a result of bone density loss increases significantly after the age of 50 in humans.<sup>1</sup> Research on bone pathology in animal models is crucial to obtain a better understanding of the relationship between changes in bone density and various physiopathologies and to allow for the development of better early diagnostic methods and preventive therapies. Currently, the use of nonhuman primates as experimental models is highly important for biomedical research, due to their phylogenetics that is similar to humans,<sup>2</sup> the *Macaca mulatta* species (rhesus monkey) being the most commonly used. The estimated lifetime of the individuals of this species is 30 years in captivity,<sup>3</sup> and cases of osteopathology have been observed as early as 9 years old. For biomedical research purposes, the

rhesus monkey is therefore a good model of the skeletal system in longitudinal studies of developmental processes and aging, as well as their associated physiopathologies.<sup>2,4</sup>

Bones are composed of tissues with different densities and structures: trabecular or spongy bone and cortical or compact bone, which differ in their mechanical function.<sup>5,6</sup> Trabecular bone is a porous tissue conformed by trabeculae that supports cyclic charges and provides a certain flexibility to the bone. Cortical bone is the dense mineralized outer layer that covers the trabecular bone, providing hardness and stiffness. Current techniques, such as dual-energy X-ray absorptiometry, are used to measure bone density and, although cheaper and more accessible, only provide data for a small part of the tissue. In contrast, other techniques that provide us with three-dimensional information can be used to separate compact bone from trabecular bone and thus identify the different stages of bone formation and resorption.<sup>1,6</sup> In

this work, we propose the use of high-resolution computed tomography (CT) images and measurement of Hounsfield units (HU) of the complete bone from each subject of a population of rhesus monkeys used in biomedical research protocols. The acquisition of the CT images is based on the transformation of the original linear attenuation coefficient, calibrated so that distilled water at standard pressure and temperature is defined as 0 HU, while air is defined as  $-1000$  HU under the same conditions.<sup>6,7</sup> Therefore, the density of each voxel represents the quantity of absorbed X-rays by a small volume of tissue. This absorption is calculated and measured in Hounsfield units.<sup>7,8</sup> In other words, Hounsfield units are an indicator of mineral bone density.<sup>8-10</sup>

Absorption coefficients of soft, trabecular, and cortical tissues are different, and can be used to identify and label each voxel as soft tissue ( $HU < 300$ ), trabecular bone ( $300 \leq HU \leq 700$ ), or cortical bone ( $HU > 700$ ). Using these thresholds proposed by Adams,<sup>11</sup> we can then automatically segment and characterize the entire bone. The cortical bone from the surface of the bone should appear visually as a shining edge that surrounds a darker area, which corresponds to the other types of bone tissue in the CT images. This technique may be an appropriate diagnostic tool, and it is also highly accurate in the detection of bone pathologies related to decreased bone density associated with age.<sup>10,12</sup> Although much information already exists describing the use of quantitative CT by measuring bone density based on Hounsfield units in veterinary medicine, mainly for domestic animals, such as cats and dogs, there is little available information on this topic for wild animals. Therefore, studies on primates may benefit veterinary radiologists related to wildlife management, such as those working in zoos and conservation programs.<sup>12-14</sup>

Thus, the present study aimed to develop a standard protocol for the evaluation of bone density through acquisition of CT imaging in a sample of rhesus monkeys. Findings could provide the foundations for a future research model to evaluate new treatments and diagnostic methods for different osteopathologies.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Experimental design

The experimental design was a prospective, pilot study. The protocol was performed according to the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999 and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee and by the Ethics and Investigation Committee from Applied Research in Experimental Biomedicine S.A. de C.V.

A total of 32 rhesus monkeys from a facility that handles wildlife under proper conditions Predios e Instalaciones que Manejen Vida Silvestre (PIMVS) with a registration number from the local Ministry of Environment and Natural Resources (SEMARNAT, DGVS-PIMVS-CR-IN-1014-DJ/08) were used. Veterinarians and researchers of Applied Research in Experimental Biomedicine S.A. de C.V. with experience in the management of a monkey rhesus colony selected the inclusion and exclusion criteria. The inclusion criteria were subjects that were at least 5 years old and with no apparent injuries or signs of disease. Subjects with diseases or that were part of another study were excluded.

The animals were considered "healthy" according to the health records based on routine examinations made through a clinical history, which consisted of auscultation, dental inspection, and blood chemistry (28 elements). Subjects were classified into the following three groups according to decades of life: group 1 from 5 to 9 years ( $n = 10$ ), group 2 from 10 to 19 years ( $n = 15$ ), and group 3 from 20 to 29 years ( $n = 7$ ).

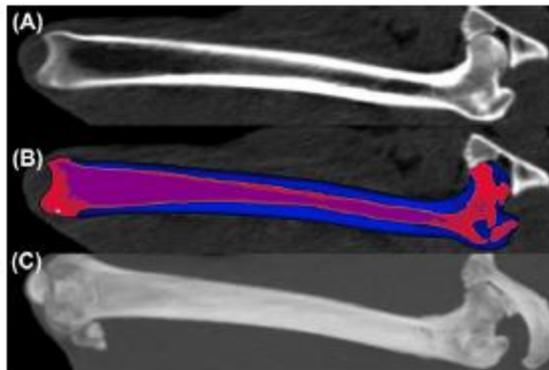
### 2.2 | Image acquisition and processing

Computed tomography scans were performed on a CT scanner (SIEMENS Sensation 64, Erlangen, Germany) equipped with a continuously rotating, low-voltage slip gantry; an UltraFast Ceramic with adaptive array detector; and  $64 \times 1344$  detection channels. The study was carried out at the National Center for Medical Imaging and Instrumentation Research (CI3M), Universidad Autónoma Metropolitana—Unidad Iztapalapa. Experimental subjects were sedated with a dose of 4 mg/kg of tiletamine-zolazepam<sup>15</sup> and placed in a supine position with 90° arm abduction. Axial imaging was taken from the whole specimen, with the following acquisition parameters: potential difference of 120 kV, current of 118 mA, reconstruction diameter of 359 mm, matrix of  $512 \times 512$ , slice thickness of 0.6 mm, voxel resolution of  $0.77 \times 0.77 \times 0.6$  mm, distance from the source to the patient of 570 mm, and 2 min approximately for total acquisition depending on the subject's length.

Image processing was performed with AMIRA software (FEI, Houston, TX, USA, under the trial license Amira-Trial-YY-2016-MM-08-DD-01). By semi-automatic segmentation of the complete body, the boundaries were defined in the regions of interest. For this study, the left femur was identified, labeled, and subsequently used for the experimental analysis, since normally long bones are prone to decalcification and are more likely to suffer fractures. When the femur automatic segmentations were performed, the boundaries were established with regions of interest subdivided in ranges, 300–700 HU for trabecular bone, and  $>700$  HU for cortical bone.<sup>16</sup> The surface and volume of the regions of interest were determined using the triangular approximation method. Then, the proportion of each type of tissue in relationship to the total volume of bone was calculated as follows: trabecular bone volume/total volume and cortical bone volume/total volume. One independent observer performed the image analyses and was not aware of the age of the animals at the time of recording the data, and afterward, in consensus, the other observers reviewed the image analyses.

### 2.3 | Statistical analysis

Computed tomographic Hounsfield unit values for the complete femur and the proportions of trabecular and cortical bone were analyzed. To test for mean significant differences among age groups, one-way analysis of variance was applied, ensuring that the assumption of equality of variances was fulfilled (Levene's test 95%). Analysis of variance was followed by posteriori pair-wise comparisons (Tukey's test 95%). All statistical procedures were performed by two of the authors (G.M.C. and M.C.R.) using the commercially available statistics software (SPSS program version 22, SPSS Inc., Chicago, IL).



**FIGURE 1** Hounsfield units segmentation of the femur. A, Computed tomography image without post-processing in the original grayscale. B, Automatic segmentation result: blue for cortical bone ( $HU > 700$ ), red for trabecular bone ( $300 \leq HU \leq 700$ ), and purple for bone marrow ( $HU < 300$ ). C, Reconstruction of the original sequences focused on the femur [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

### 3 | RESULTS

The CT images were obtained, depending on the subject size (with a mean of 1473 images), with an effective dose mean time of 118 s. In an image without post-processing, the contrast between the regions of interest was observed, cortical bone (white hyperintense) and trabecular bone (gray area), which correspond to Hounsfield scale levels (Figure 1A). After assigning a false color to the subdivided regions in the defined intervals of the Hounsfield scale, the separation of the structures is clear. (Figure 1B) exemplifies the femur's segmentation; the colors assigned were the following: blue for cortical bone ( $HU > 700$ ), red for trabecular bone ( $300 < HU < 700$ ), and purple for bone marrow. From this segmentation, in all of the experimental subjects, the absorption coefficients were obtained, where the mean of the absorption coefficient in the whole bone was 659.91 HU (Group 1), 694.72 HU (Group 2), and 619.4 HU (Group 3). The result of the surface rendering, by means of the polygonal approximation method,

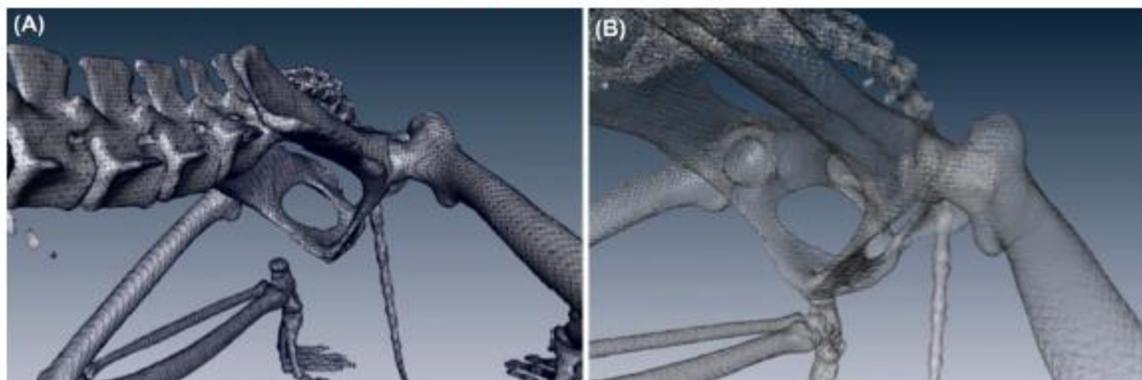
is observed in Figure 2, where the mesh shows the volume surface calculated for the cortical bone. The surface rendering is exemplified in Figure 2A, while Figure 2B shows the triangles that make up the mesh of the approach. Figure 3 shows the combination of two different surfaces rendering trabecular bone and cortical bone. Figure 3A corresponds to a subject of age group 2, while Figure 3B corresponds to a subject of age group 3. The difference in trabecular and cortical bone volumes between the two subjects is clearly observed. The volume of cortical bone in the subject of the age group 2 is greater than the volume in the subject of age group 3.

The number of subjects by group, mean, standard deviation, minimum, and maximum values for Hounsfield units of the complete femur are shown in Table 1. Age groups 1 and 2 showed higher bone density, while age group 3 had lower density (Figure 4). Analysis of variance testing revealed significant differences in Hounsfield units among age groups ( $P = 0.031$ ) because the mean value of group 2 was significantly higher than for group 3 (Tukey's test).

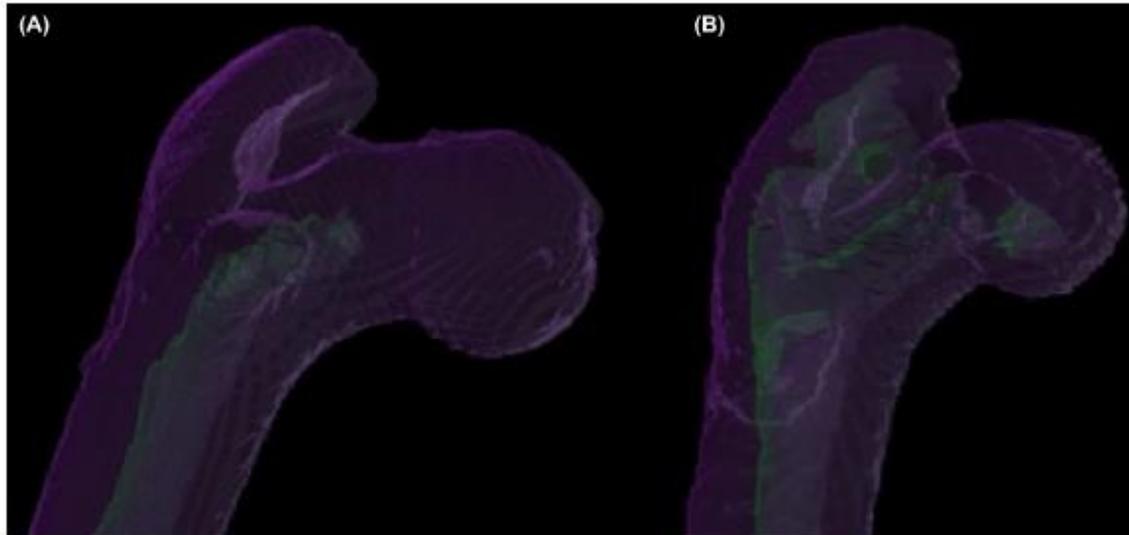
Table 2 shows the sample, size, mean, standard deviation, minimum, and maximum values for the proportion of trabecular and cortical bone volumes of the complete left femur. The proportion of trabecular bone was higher for age group 1 (mean value of 24.9%) than for age groups 2 and 3 (both with mean values of 20.9%), and analysis of variance testing showed significant differences among mean groups ( $P = 0.046$ ) (Figure 5), with the mean value of group 1 being significantly higher than the value of group 2 (Tukey's test). On the other hand, the proportion of cortical bone (Figure 6) for age group 1 was 54.8%; for age group 2, it was 58.9%; and for age group 3, it was 44%. The analysis of variance test showed significant differences in the proportion of cortical bone volume among groups ( $P < 0.001$ ), with the mean value of group 3 being significantly lower than for groups 1 and 2 (Tukey's test).

### 4 | DISCUSSION

High-quality images of the complete body of each subject were obtained. Due to the short time of exposure to radiation and rapid veterinary management, the animals underwent only a brief period of stress.<sup>16</sup>



**FIGURE 2** Rendering of the cortical bone triangle approach method. A, Rendering of the entire skeleton. B, Triangle approach method result applied to ROIs segmented on each bone [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

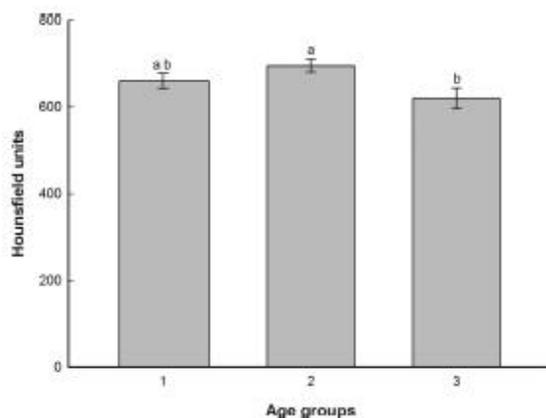


**FIGURE 3** Segmented femur from a subject from group 2 (A) and one from group 3 (B) with trabecular bone and cortical bone shown in different shades [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

**TABLE 1** Absorption coefficient values of total femur in Hounsfield units

Group	N	Mean	SD	Minimum	Maximum
1	10	659.91	53.98	568.35	761.07
2	15	694.72	71.90	568.78	810.63
3	7	619.40	50.20	548.04	676.29

Notes. Groups and number of subjects, mean, standard deviation, minimum and maximum values of the Hounsfield units of total femur from a total sample of 32 rhesus monkeys divided by age group: 1 (5–9 years old), 2 (10–19 years) and 3 (20–28 years). SD, standard deviation; N, number of subjects.



**FIGURE 4** Mean and standard error of Hounsfield units from the left femur of *Macaca mulatta* monkeys by age group are shown. Group 1 (5–9 years), group 2 (10–19 years), and group 3 (20–28 years). The results of Tukey's test are also shown: for groups with a different letter, their means have significant differences; for groups with the same letter, their means do not have significant differences

**TABLE 2** Proportions of trabecular and cortical bones in relation to total volume of the complete femur

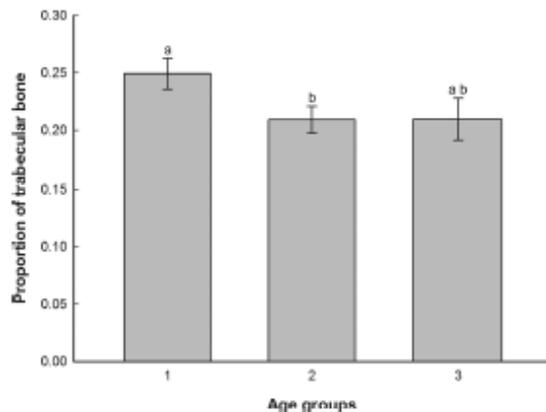
Group	N	Mean	SD	Minimum	Maximum
Cortical bone					
1	10	0.5478	0.0581	0.4499	0.6429
2	15	0.5891	0.0752	0.4709	0.7041
3	7	0.4400	0.0455	0.3728	0.4871
Trabecular bone					
1	10	0.2490	0.0467	0.1967	0.3511
2	15	0.2091	0.0394	0.1440	0.3099
3	7	0.2094	0.0310	0.3728	0.4871

Notes. Groups and number of subjects, mean, standard deviation, minimum and maximum values for the proportions of trabecular and cortical bones in relation to volume of complete femur from a total sample of 32 rhesus monkeys divided by age group: 1 (5–9 years old), 2 (10–19 years), and 3 (20–28 years). SD, standard deviation; N, number of subjects.

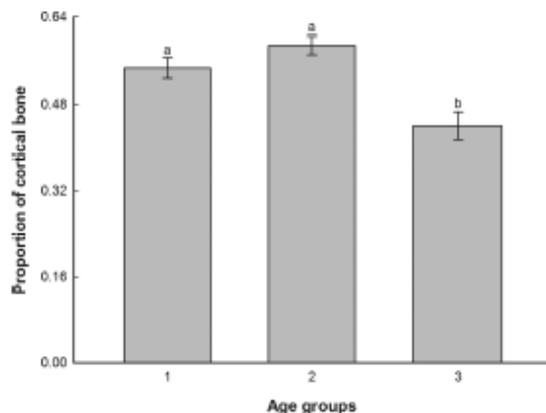
In relation to machine-related variability, the standard deviation values of Hounsfield units for each age group (Table 1) varied only approximately 10% from their mean values (i.e., coefficient of variation), which implies a high degree of precision and repeatability of the assays. However, at this moment, it is not possible to estimate a predictive value of CT (based on bone density measurements) for fracture risk.

Despite the efficiency and precision obtained by the use of this technique, the main disadvantages of CT are the limited access to the equipment and the high operating costs, which reduce its availability for research laboratories.<sup>17</sup>

There are clear advantages in the use of CT over other techniques to determine bone density for research purposes. First, CT allows us to obtain high-resolution three-dimensional information of an entire



**FIGURE 5** Mean and standard error of the proportion of trabecular bone from the left femur of *Macaca mulatta* monkeys by age group are shown. Group 1 (5–9 years), group 2 (10–19 years), and group 3 (20–28 years). The results of Tukey's test are also shown: for groups with a different letter, their means have significant differences; for groups with the same letter, their means do not have significant differences



**FIGURE 6** Mean and standard error for proportions of cortical bone from the left femur of *Macaca mulatta* monkeys by age group are shown. Group 1 (5–9 years), group 2 (10–19 years), and group 3 (20–28 years). The results of Tukey's test are also shown: for groups with a different letter, their means have significant differences; for groups with the same letter, their means do not have significant differences

bone, as opposed to only two-dimensional in standard densitometry using dual-energy X-ray absorptiometry or even the one-dimensional information available from early single-photon absorptiometry.<sup>7,10,11</sup> Such information can be used to analyze the structure of the bone, measure the size of the trabeculae, and compare the different bone tissues. Second, when using the mean Hounsfield units of the bone as a measure of bone density, as we did in this paper, it may not be as sensitive to mineral content, but because the mean is calculated from the entire three-dimensional model, it is naturally normalized and insensitive to bone density (depth specifically), unlike dual-energy X-ray absorptiometry and other two-dimensional methods. Finally, and perhaps most importantly, the three-dimensional

information can be used to separate compact bone from trabecular bone and thus identify the different stages of bone formation and resorption.<sup>18,19</sup> In addition, when using modern CT scanners with spiral acquisition, such as the one we used, an entire body scan can be obtained in a very short time, with a dose reduction of approximately 80% compared to other CT scanners while maintaining the image quality.<sup>20</sup>

In this paper, we used the mean values of Hounsfield units of the left femur as a measure of bone density. A comparison of the age groups demonstrated clear differences between groups and proved a sensitive and reproducible variable to use as an indicator of bone health, with older subjects showing a significant decrease. Thus, although the mean Hounsfield unit values of the first two age groups did not show significant differences, the mean of the senile adults (group 3) was significantly lower than the mean of the middle-aged adults (group 2). To complement the information provided by the Hounsfield units, we also calculated the proportions by volume of trabecular and cortical bone. We found that this information was very helpful in discriminating the different developmental stages. Young adults (group 1) had a high proportion of both trabecular and cortical bones because the bones are still growing. Middle-aged adults (Group 2) had a high proportion of cortical bone because the bones have hardened but show a relatively low proportion of trabecular bone. Finally, in the senile (group 3), both cortical and trabecular bones have low proportions as demineralization develops.

By combining all three variables, we can therefore best discriminate bone health and track changes over time, with the added advantage that the calculation of all three of these quantifiable measures can be automated easily. Indeed, we have programmed the processing of these variables from the CT images, so that they can be calculated quickly and easily from the scans and, thus, can eliminate interpretation bias.

In conclusion, we are satisfied with the methodology presented in this paper in which we calculated Hounsfield units, the proportion of trabecular bone volume, and the proportion of cortical bone volume from the femur CT scans of *Macaca mulatta*. Due to these satisfactory results, we propose to use these variables in our research on bone pathology for the nonhuman primate model. The values obtained from this sample will also be used as reference values for the general untreated population of *Macaca mulatta* for future research. Thus, this information can be valuable for veterinary radiologists related to wildlife management and for biomedical research in humans.

## LIST OF AUTHOR CONTRIBUTIONS

### Category 1

- (a) Conception and Design: Solís-Chávez SA, Ibáñez-Contreras A, Hernández-Godínez B, Arteaga-Silva M, Sacristan-Rock E, Castillo-Rivera MA
- (b) Acquisition of Data: Solís-Chávez SA, Ibáñez-Contreras A, Hernández-Godínez B, Morales-Guadarrama A, Morón-Mendoza A

- (c) Analysis and Interpretation of Data: Solís-Chávez SA, Ibáñez-Contreras A, Hernández-Godínez B, Mendoza-Cuevas G, Sacristan-Rock E, Castillo-Rivera MA

#### Category 2

- (a) Drafting the Article: Solís-Chávez SA, Ibáñez-Contreras A, Hernández-Godínez B, Arteaga-Silva M, Sacristan-Rock E, Castillo-Rivera MA, Morón-Mendoza A, Mendoza-Cuevas G, Morales-Guadarrama A
- (b) Revising Article for Intellectual Content: Arteaga-Silva M, Sacristan-Rock E, Castillo-Rivera MA

#### Category 3

- (a) Final Approval of the Completed Article: Solís-Chávez SA, Castillo-Rivera MA, Arteaga-Silva M, Ibáñez-Contreras A, Hernández-Godínez B, Morón-Mendoza A, Mendoza-Cuevas G, Morales-Guadarrama A, Sacristan-Rock E

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Zayli Salazar for review of the English in the manuscript. The authors thank to CONACYT for the scholarship to do the Doctoral Program in Biological Sciences and Health.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

#### ORCID

Braulio Hernández-Godínez  <http://orcid.org/0000-0002-2955-4416>

Emilio Sacristan-Rock  <http://orcid.org/0000-0001-6196-6288>

#### REFERENCES

- National Center for Health Statistics. *Analytic and Reporting Guidelines: The Third National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES III (1988–1994)*. Hyattsville, MD: Centers for Disease Control and Prevention; 1996.
- Cruzen C, Colman RJ. Effects of caloric restriction on cardiovascular aging in non-human primates and humans. *Clin Geriatr Med*. 2009;25:733–743.
- Ibanez-Contreras A, Hernandez-Godínez B, Reyes-Pantoja SA, et al. Clinical evaluation in geriatric rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): Through serological studies and physiological constants in captivity. *J Anim Vet Adv*. 2011;10:3281–3286.
- Hernández-Godínez B, Ibáñez-Contreras A, Perdigón-Castañeda G, et al. Radiographic incidence of spinal osteopathologies in captive rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Comp Med*. 2010;60:396–399.
- Stathopoulos K, Zoubos A, Papaioannou N, et al. Differences of bone mineral mass, volumetric bone mineral density, geometrical and structural parameters and derived strength of the tibia between premenopausal and postmenopausal women of different age groups: A peripheral quantitative computed tomography (pQCT) study. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2016;16:113–121.
- Lee S, Chung CK, Oh SH, Park SB. Correlation between bone mineral density measured by dual-energy X-ray absorptiometry and Hounsfield units measured by diagnostic CT in lumbar spine. *J Korean Neurosurg Soc*. 2013;54:384–389.
- Snyder SM, Schneider E. Estimation of mechanical properties of cortical bone by computed tomography. *J Orthop Res*. 1991;9:422–431.
- Barsal SC, Khandelwal N, Rai DV, et al. Comparison between the QCT and the DEXA scanners in the evaluation of BMD in the lumbar spine. *J Clin Diagn Res*. 2011;5:694–699.
- Marinova M, Edon B, Wolter K, Katsimbari B, Schild HH, Strunk HM. Use of routine thoracic and abdominal computed tomography scans for assessing bone mineral density and detecting osteoporosis. *Curr Med Res Opin*. 2015;31:1871–1881.
- Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: Now and the future. *Lancet*. 2011;377:1276–1287.
- Adams JE. Quantitative computed tomography. *Eur J Radiol*. 2009;71:415–424.
- Gumpenberger M, Henninger W. The use of computed tomography in avian and reptile medicine. *Semin Avian Exot Pet Med*. 2001;10:174–180.
- Spoor F, Zonneveld F. Morphometry of the primate bony labyrinth: A new method based on high-resolution computed tomography. *J Anat*. 1995;186:271–286.
- Mackey EB, Hernandez-Divers SJ, Holland M, Frank P. Clinical technique: Application of computed tomography in zoological medicine. *J Exot Pet Med*. 2008;17:198–209.
- Solis-Chavez SA, Ibanez-Contreras A, Reyes-Pantoja SA, Perdigon-Castaneda G, Hernandez-Godínez B. Absence of the right wing of the ilium generated a compensatory scoliosis in rhesus monkey in captivity: Diagnostic imaging and its alteration on the SEPNT. *J Med Primatol*. 2013;43:44–47.
- Fat D, Kennedy J, Galvin R, O'Brien F, McGrath F, Mullett H. The Hounsfield value for cortical bone geometry in the proximal humerus—An in vitro study. *Skeletal Radiol*. 2012;41:557–568.
- Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet*. 2002;359:1929–1936.
- Besho M, Ohnishi I, Matsuyama J, Matsumoto T, Imai K, Nakamura K. Prediction of strength and strain of the proximal femur by a CT-based finite element method. *J Biomech*. 2006;40:1745–1753.
- Shapurian T, Damoulis PD, Reiser GM, Griffin TJ, Rand WM. Quantitative evaluation of bone density using the Hounsfield index. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006;21:290–297.
- Christe A, Heverhagen J, Ozdoba C, Weisstanner C, Ulzheimer S, Ebner L. CT dose and image quality in the last three scanner generations. *World J Radiol*. 2013;5:421–429.

**How to cite this article:** Solís-Chávez SA, Castillo-Rivera MA, Arteaga-Silva M, et al. Computed tomography is a feasible method for quantifying bone density in *Macaca mulatta*. *Vet Radiol Ultrasound*. 2018;59:545–550. <https://doi.org/10.1111/vru.12624>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00096

Matricula: 2143800491

Efecto de la ingesta de inulina tipo agave en las concentraciones de calcio y fósforo en sangre en una población de monos Rhesus con densidad ósea conocida mediante tomografía axial computarizada (TAC).

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 6 del mes de noviembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA  
DR. EMILIO SACRISTAN ROCK  
DRA. PILAR DURAN HERNANDEZ  
DR. MANUEL ALEJANDRO CRUZ AGUILAR  
DR. MANUEL ARNOLDO CASTILLO RIVERA



Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: SALVADOR ABRAHAM SOLIS CHAVEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

## Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

SALVADOR ABRAHAM SOLIS CHAVEZ  
ALUMNO

REVISÓ  
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA  
DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

VOCAL  
DR. EMILIO SACRISTAN ROCK

VOCAL  
DRA. PILAR DURAN HERNANDEZ

VOCAL  
DR. MANUEL ALEJANDRO CRUZ AGUILAR

SECRETARIO  
DR. MANUEL ARNOLDO CASTILLO RIVERA