



ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

ABSORCIÓN MINERAL Y RETENCIÓN ÓSEA EN RATAS NORMALES EN CRECIMIENTO POR EL CONSUMO DE UN YOGUR EXPERIMENTAL REDUCIDO EN LACTOSA QUE CONTIENE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS (GOS)

Mariana Seijo,^{1*} María Soledad Bonanno,¹ Claudia Inés Vénica,² María Luz Pita Martín de Portela,³ Clarisa Bozzini,⁴ Carina Viviana Bergamini,⁴ Irma Verónica Wolf,² María Cristina Perotti,² Susana Noemí Zeni¹

¹ Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Óseas, INIGEM/CONICET/UBA. Buenos Aires, Argentina.

² Instituto de Lactología Industrial UNL/CONICET, Facultad de Ingeniería Química. Santa Fe, Argentina.

³ Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Buenos Aires, Argentina.

⁴ Cátedra de Fisiología. Facultad de Odontología, UBA. Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Introducción: Los GOS son prebióticos naturales presentes en la leche materna que pueden obtenerse enzimáticamente a partir de la lactosa de leche de vaca durante la fabricación de yogur. El producto lácteo resultante será reducido en lactosa y contendrá prebióticos y bacterias potencialmente probióticas. Sin embargo, mantendrá la baja relación Ca/Pi que aporta la leche de vaca, lo que podría alterar el remodelamiento óseo y la mineralización. **Objetivo:** comparar si un yogur reducido en lactosa que contiene GOS (YE) ofrece ventajas adicionales respecto de un yogur regular sin GOS (YR) sobre las absorciones (Abs) de Ca y Pi, retención y calidad ósea durante el crecimiento normal. Al destete, ratas machos fueron divididas en 3 grupos alimentados con AIN'93-G (C), YE o YR durante 28 días. **Resultados:** YE mostró el mayor aumento de lactobacilos fecales; producción de ácidos grasos de cadena corta especialmente

p, profundidad de las criptas colónicas y menor pH cecal. El %AbsCa y %AbsPi aumentó en el siguiente orden: YE > YR > C ($p < 0,05$). El contenido de Ca y Pi en fémur, la densidad y contenido mineral óseos y los parámetros biomecánicos fueron similares en YE y C, mientras que YR mostró valores significativamente menores ($p < 0,05$). **Conclusiones:** YE aumentó las Abs y biodisponibilidad de minerales, alcanzando la retención y calidad ósea de C. El aumento en las Abs observado en YR no logró obtener la retención y calidad ósea de C. Conclusión: YE habría contrarrestado el efecto negativo del mayor aporte de Pi de la leche de vaca y sería una buena estrategia para lograr el pico de masa ósea y calidad del hueso adecuados, especialmente en individuos intolerantes a la lactosa.

Palabras clave: dieta reducida en lactosa, ratas macho, crecimiento, pico de masa ósea, galactooligosacáridos (GOS).

*E-mail: seijomarianita@gmail.com

Abstract

Breast milk contains an optimal calcium/phosphate (Ca/Pi) ratio and GOS. These natural prebiotics can be enzymatically produced via cow's milk lactose in-yogurt manufacture. This milk product is low in lactose and contains prebiotics and potentially probiotic bacteria but maintains a low Ca/Pi ratio that could alter bone remodeling and mineralization. We evaluated if a lactose-reduced yogurt containing GOS (YE) offers additional advantages over regular yogurt without GOS (YR) on Ca and Pi absorption (Abs), bone retention and quality during normal growth. Weaning male rats were divided into 3 groups fed AIN'93-G (C), YE or YR for 28 days. Results: YE showed the highest increase in fecal lactobacilli; short-chain fatty acids production, especially propionate

and butyrate; intestine crypt depth, and the lowest cecal pH. AbsCa% and AbsPi% increased in this order: YE > YR > C ($p < 0.05$). Ca and Pi content in femur, bone density and mineral content, and biomechanical parameters were similar in YE and C, while YR showed the significantly lowest value ($p < 0.05$). Conclusions: YE increased mineral Abs reaching the retention and bone quality of C. Although YR increased Abs, bone retention and quality did not achieve C values. Seemingly, YE compensated for the negative effect of the higher Pi supply and would be a good strategy to achieve adequate peak bone mass and bone quality, especially in lactose intolerant individuals.

Keywords: lactose reduced diet, normal growing rats, peak bone mass, galactooligosaccharides (GOS).

Introducción

El adecuado aporte nutricional de calcio (Ca) es indispensable para alcanzar un óptimo pico de masa ósea (PMO).^{1,2} La leche y sus derivados son la fuente principal de Ca así como la de otros componentes fundamentales de la dieta. Además de la alta absorción y biodisponibilidad de Ca, los lácteos tienen un alto valor nutricional ya que aumentan la calidad de la dieta aportando proteínas, grasas, vitaminas, carbohidratos. El principal carbohidrato de la leche es la lactosa que –si bien sirve como fuente de energía– favorece además la absorción intestinal de Ca, fosfato (Pi) y magnesio (Mg). A pesar de todos estos beneficios existe un número importante de individuos que no toleran el consumo de productos lácteos. Los síntomas intestinales relacionados con la mala digestión de la lactosa son altamente prevalentes en ciertos grupos poblacionales,

que evitan el consumo de productos derivados de la leche y, con ello, el aporte de Ca a través de la dieta.^{3,4}

Bioquímicamente, la digestión de la lactosa se realiza por acción enzimática de la lactasa, una β -galactosidasa encargada de desdoblarla en glucosa y galactosa, fácilmente absorbibles. En el caso de existir una mala digestión, la lactosa pasa al intestino grueso donde es fermentada por la microflora colónica. Aproximadamente a los 6 meses de vida, la actividad de la lactasa comienza a disminuir y en muchos casos desaparece totalmente. La incapacidad para digerir la lactosa por completo induce distintos síntomas gastrointestinales que, si bien no peligrosos, son desagradables. La prevalencia de malabsorción a la lactosa presenta una gran variabilidad geográfica, que oscila entre el 2 y el 20% en los países del norte y centro de Europa, 40% en países del Mediterráneo y



América del Norte, llega al 65-75% en África y América Latina, y aproximadamente al 90% en Asia.^{5,6} En el pasado, una práctica habitual para controlar la intolerancia a la lactosa (IL) fue la de reducir o eliminar la ingesta de productos lácteos. Sin embargo, dicha dieta generalmente aporta menos Ca que lo recomendado, lo que podría impedir alcanzar el óptimo PMO durante el crecimiento e incrementar la pérdida de masa ósea en adultos.^{7,8} Actualmente, los expertos recomiendan el consumo de productos lácteos reducidos en lactosa para evitar el bajo aporte de Ca que podría predisponer a desarrollar osteoporosis.⁶

La leche de vaca aporta nutrientes similares a los de la leche materna; sin embargo, esta última aporta además ingredientes funcionales como los galactooligosacáridos (GOS). Los GOS son los prebióticos naturales de la leche materna; se trata de oligosacáridos no digeribles que, al ser metabolizados por la microbiota intestinal, favorecen el crecimiento de bacterias potencialmente probióticas, principalmente bifidobacterias, con enormes beneficios para la salud del hospedador.^{3,4} Los GOS tras su fermentación en el colon producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que disminuyen el pH intestinal, aumentando la solubilidad de las sales de Ca, lo cual favorece su absorción a través de los colonocitos. Entre los AGCC, el butirato favorece la proliferación de células intestinales epiteliales incrementando la superficie disponible para la absorción de minerales.¹¹⁻¹⁴ Si bien los GOS son un componente bioactivo de la leche materna, también pueden ser incorporados a la leche de vaca mediante la fermentación de la lactosa utilizando reacciones de transgalactosilación catalizadas por β -galactosidasas de diversos orígenes (levaduras, hongos y bacterias) que al mismo tiempo presenten actividad de transgalactosidasa. En el marco de la fabricación del yogur, la adición a la leche de vaca de este tipo de β -galactosidasas permite obtener un

producto lácteo con bajo contenido en lactosa, que incluye al mismo tiempo GOS y bacterias potencialmente probióticas. Una ventaja de este tipo de producto lácteo es que la interacción de los prebióticos y probióticos antes de consumir el producto favorece la adaptación de bacterias vivas al sustrato. Dicha interacción simbiótica aumenta la supervivencia de los probióticos, los cuales modulan la microbiota intestinal manteniendo un equilibrio adecuado entre patógenos y bacterias beneficiosas.⁹⁻¹⁴

Por otra parte, la relación Ca/Pi aportada por la dieta desempeña un papel importante en la homeostasis ósea y fosfocálcica, ya que dicha relación regula los procesos de mineralización y remodelación ósea. Una de las preocupaciones de la industria láctea es que la leche de vaca presenta una relación Ca/Pi menor que la de leche materna aportando un exceso relativo de Pi, lo cual puede condicionar ambos procesos.¹⁵ Nuestra hipótesis es que la presencia de GOS en el producto lácteo como el yogur ensayado en el presente estudio podría compensar este desequilibrio y lograr una óptima calidad del hueso formado.

Sobre tal base, el objetivo de este trabajo experimental fue investigar y comparar la eficacia de un producto lácteo (yogur) reducido en lactosa que contiene GOS, respecto de otro yogur regular sin GOS, sobre la absorción de Ca, fosfato (Pi) y magnesio (Mg), la retención de estos minerales en el hueso, así como de la calidad del hueso formado durante el crecimiento normal.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, pertenecientes al bioterio de la cátedra de Nutrición, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA). El protocolo de estudio fue aprobado por el CICUAL de dicha facultad (Res. CS. 4081/04; 0074160/2017).

Las ratas se mantuvieron en jaulas de acero inoxidable con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con temperatura de 21 ± 2 °C y 55% de humedad relativa controladas. Tanto el alimento como el agua fueron administrados *ad libitum*. Al finalizar la experiencia, los animales fueron sacrificados por exanguinación, previa anestesia con solución de clorhidrato de ketamina (50 mg/ml) (Holliday-Scott SA, Argentina) inyectada vía intraperitoneal en una dosis de 0,1 ml/100 g peso corporal (PC), conjuntamente con 0,02 ml de clorhidrato de xilacina (Xilacina®, Lab Richmond, Div. Veterinaria SA, Argentina).

Dietas

A partir del destete (Ti), los animales fueron divididos en tres grupos de 10 animales cada uno y alimentados hasta los 50 días de vida (Tf), con una de las tres dietas semisintéticas ensayadas, formuladas acorde con los lineamientos de AIN'93-G, que corresponde a la dieta recomendada para animales en crecimiento.¹⁶

Grupo C (control): dieta AIN'93-G.

Grupo YE (yogur experimental): dieta a base de yogur liofilizado que contiene GOS, cumpliendo con las especificaciones de AIN'93-G.

Grupo YR (yogur regular sin GOS): dieta experimental a base de yogur liofilizado, sin GOS, cumpliendo con las especificaciones de AIN'93-G.

El yogur fue desarrollado por el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN-UNL/CO-NICET, Santa Fe). La base láctea empleada que contiene leche descremada en polvo y concentrado de proteína de suero fue dividida en dos porciones de igual tamaño para preparar el YE y el YR. Para el YE, la base láctea fue tratada previamente con la enzima β -galactosidasa (YNL-2 GODO®, Shusei Company Limited, Tokio, Japón), con actividad de transgalactosidasa. Mediante este procedimiento la mayor parte de la lactosa fue transformada en GOS.¹⁷

El YR, preparado en paralelo, no recibió ningún tratamiento enzimático previo, por lo cual no contenía GOS pero aportaba lactosa. A continuación, ambas bases lácteas por separado se inocularon con el fermento, compuesto por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, microorganismos específicos amigables para que el producto cumpla con la definición legal de yogur. Luego de su obtención, ambos yogures fueron liofilizados para obtener el polvo que se utilizó para alimentar a los animales.

Sobre una muestra representativa de cada yogur liofilizado se determinó la composición fisicoquímica, recuento microbiológico y perfil de carbohidratos utilizando las técnicas recomendadas por la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC).¹⁷

Métodos

Parámetros zoométricos y de absorción

Desde el destete y hasta el final de las experiencias se registró la ingesta de alimentos y el peso corporal con una frecuencia de dos veces por semana.

La absorción fue evaluada por metodología de balance, tanto al comienzo de la experiencia (Ti) como al finalizar el estudio (Tf). Para ello, los animales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales de acero inoxidable, registrando durante 3 días consecutivos la ingesta de alimento y recolectando las heces. Con dichos parámetros se calculó la absorción aparente (Abs) total (mg/d) y la absorción como porcentaje de la ingesta (%Abs) de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$1) \text{ Abs} = I - F$$

$$2) \% \text{ Abs} = \frac{I - F}{I} \times 100$$

donde F: eliminación fecal e I: ingesta de alimento.

Las heces y dieta fueron digeridas con HNO_3 concentrado en microondas usando bombas Parr para la determinación de Ca, Mg y P.¹⁸



Determinaciones bioquímicas séricas

El Ca se determinó mediante absorción atómica empleando cloruro de lantano (concentración de 6500 ppm) como supresor de interferencias.¹⁹

El Pi se determinó por colorimetría utilizando un autoanalizador (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

El telopéptido carboxilo terminal del colágeno tipo I (CTX) (pg/mL) fue evaluado mediante inmunoensayo (ELISA) (Rat Laps® y Rat-osteocalcin®, respectivamente. BioTech, Herlev, Dinamarca).²⁰ La fosfatasa alcalina ósea (FAO) (UI/L) se determinó por colorimetría (Wiener SA).

Determinación de Lactobacillus y pH

La cuantificación del desarrollo de colonias de lactobacilos se realizó sobre heces frescas, a partir del inicio del estudio, obtenidas semanalmente. El medio de cultivo utilizado de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Britania, Argentina) es selectivo y específico para lactobacilos, en estufa de cultivo con atmósfera semiaeróbica (5-10% CO₂), a 35-37 °C durante 48 horas. El recuento total de colonias de lactobacilos, identificados como pequeñas colonias de color blanco grisáceo, lisas o rugosas, se informó como unidad formadora de colonias (UFC) y se expresó como log₁₀ UFC por gramo de heces. La confirmación morfológica fue realizada mediante tinción de Gram.

Luego del sacrificio se determinó el peso (Denver instrument, USA) y pH del ciego, este último directamente por inserción de un pH-metro calibrado (Adwa AD110®, Hungría) en la luz cecal.

Porcentaje de agua en heces frescas y contenido cecal

Los porcentajes de agua en heces y en el contenido cecal fueron calculados por diferencia de pesadas entre el peso húmedo (PH) y el peso seco (PS) obtenido luego de colocar dichas alícuotas en estufa a

100 °C durante 48 horas, según la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de agua (\%)} = (\text{PH} - \text{PS}) / \text{PH} \times 100$$

Evaluación de ácidos propiónico y butírico en contenido cecal

Los AGCC evaluados se analizaron en muestras del contenido cecal mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)²¹ (Perkin Elmer, Norwalk, EE. UU.) y detector IR. Los datos se procesaron en una computadora que contenía el *software* Chromera® (Perkin Elmer, Norwalk, EE.UU.). La cuantificación se realizó utilizando un método de calibración externo mediante estándares adecuados (Sigma Aldrich, Saint Louis, EE.UU.).

Densitometría ósea

Antes del sacrificio se determinó “in vivo” la densidad mineral y el contenido mineral del esqueleto total (et DMO y et CMO), bajo anestesia débil mediante la técnica de DXA. El equipo utilizado consta de un *software* diseñado específicamente para evaluar pequeños animales (DPX Alfa, radiación Lunar Corp.®, Madison, WI).²² Todas las ratas fueron analizadas utilizando el mismo tipo de exploración. La precisión del *software* fue evaluada por la medición de una misma rata cinco veces con reposición entre dos exploraciones en el mismo y en diferentes días. El análisis de las subáreas de interés de columna lumbar (CI) y tibia proximal (Tp) se realizó utilizando la imagen del animal visualizado en la pantalla de la computadora mediante operación manual delimitando una ventana específica (ROI) para cada segmento. El coeficiente de variación (CV) para DMO de esqueleto total fue de 0,9%, para la CI DMO fue de 1,8% y para TpDMO fue de 3,5%. Todos los análisis fueron realizados por el mismo observador con el fin de reducir al mínimo la variación interobservador.²³

Biomecánica

Al finalizar el estudio se extrajeron las tibias, las cuales se limpiaron de todo resto muscular. La tibia derecha se embebió en solución fisiológica y se mantuvo “frizada” hasta realizar las pruebas biomecánicas. Dichas determinaciones fueron realizadas mediante el test de flexión de tres puntos en un equipo Instron 4411® de análisis universal de materiales. Se determinaron los siguientes parámetros diafisarios femorales: fuerza máxima de fractura, rigidez ósea y módulo de elasticidad.

Histología ósea y de intestino grueso

Inmediatamente después del sacrificio, la tibia izquierda y el intestino grueso se retiraron, se limpiaron de tejidos blandos y pesaron. Ambos tejidos fueron fijados por inmersión en *buffer* formalina durante un período de 48 horas e incluidos en parafina a 56-58 °C.

Antes de la inclusión, la tibia fue descalcificada en EDTA al 10% (pH 7) durante 25 días. Posteriormente se realizaron cortes longitudinales (8-10 μ m de espesor) que se tiñeron con hematoxilina-eosina y se microfotografiaron (equipo AXIOSKOP®, Carl Zeiss, Alemania). En los cortes se determinó el volumen óseo (BV/TV) (%) en el hueso esponjoso subcondral y el ancho del cartílago de crecimiento a través de la imagen digitalizada, utilizando el programa de computación Image-Pro 4.5®.²⁴

En los cortes de intestinos se evaluaron morfológicamente un número de siete vellosidades por sección de tejido y por grupo, incluyendo a la vez 4 animales, por lo que en cada grupo y en cada sección se analizaron veintiocho vellosidades. Las medidas (en μ m) se realizaron con el fin de determinar la altura (o profundidad) de la vellosidad intestinal (distancia lineal desde la base hasta el ápice de la vellosidad).^{25, 26} Las mediciones fueron analizadas con un aumento de $\times 20$ mediante el programa ImageJ®, un *software* de procesamiento de imagen digital de dominio público

desarrollado en el National Institutes of Health.²⁴

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm desvío estándar (DE). La normalidad de las variables fue evaluada mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA), un factor utilizando el test de Bonferroni para determinar entre cuáles de los grupos se encontraban las diferencias significativas. Los parámetros histológicos fueron evaluados por medio de un análisis factorial de un solo punto. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 19.0® para Windows (SPSS, Inc. Chicago, IL). Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados

No se observaron diferencias significativas entre los grupos C, YR y YE durante toda la experiencia respecto del consumo de dieta (g/d) ($16,5 \pm 2,7$; $15,4 \pm 0,8$ y $16,4 \pm 0,6$, respectivamente) o en el aumento de peso entre el final y el inicio de la experiencia (g) ($5,9 \pm 0,7$; $5,7 \pm 0,5$ y $5,6 \pm 0,4$, respectivamente).

La Tabla 1 muestra los cambios observados entre los distintos parámetros evaluados respecto del grupo control. El grupo YE no mostró diferencias significativas respecto del grupo C en la longitud del fémur (cm); sin embargo, el grupo YR alcanzó una longitud estadísticamente menor que el grupo C ($p < 0,05$). Ambos yogures mostraron un aumento significativo en el peso del colon (g/100 gPC) respecto del grupo C ($p < 0,05$), mientras que el grupo YR presentó un mayor aumento que el grupo YE ($p < 0,05$). Inicialmente el desarrollo de colonias de lactobacilos (UFC/g) fue similar en los grupos estudiados. A partir de la primera semana y a lo largo de toda la experiencia, los grupos que consumieron la dieta a base de yogur mostraron mayor desarrollo de



Tabla 1. Cambios porcentuales en la longitud del fémur, en el peso y pH del ciego, en el número de UFC de lactobacilos, en la profundidad de criptas intestinales, en los porcentajes de agua en heces frescas y en el contenido fecal y en la producción de ácidos grasos de cadena corta respecto del grupo control.

Grupos	YR	YE
Cambio en la longitud del fémur (%)	-2,45±0,18*	-0,61±0,01**
Cambio en el peso Ciego/PC (%)	115,6±2,94*	73,9±3,23**, **
Cambio en las UFC lactobacilos	29,2±1,3*	14,5±1,4**, **
Cambio en el pH del ciego	-8,6±2,3*	-12,4±2,2**, **
Cambio en el % de agua en heces frescas	55,0±4,0	50,0±5,0
Cambio en el % de agua en el contenido fecal	27,1±2,7	18,6±3,3
Cambio en la profundidad de criptas intestinales (%)	3,6±0,28*	12,9±0,24**, **
Cambio en la producción de ácido láctico (%)	14,1±0,15*	82,1±2,8**, **
Cambio en la producción de ácido acético (%)	29,7±3,8*	423,6±17,2**, **
Cambio en la producción de ácido propiónico (%)	-7,5±1,5	170,5±7,2**, **
Cambio en la producción de ácido butírico (%)	-12,9±1,4	236,9±13,7**, **

Cálculo del cambio porcentual según la fórmula: [(valor final - valor inicial) / valor inicial] × 100

UFC: unidades formadoras de colonias; PC: peso corporal. Grupo de ratas que recibieron las dietas: control AIN'93-G (C), yogur regular (YR) y yogur experimental (YE). Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor P < 0,05. Los resultados se expresaron como media ± DS. *P < 0,05: YR o YE frente a C; **P < 0,05 YE frente a YR.

colonias que el grupo C (p < 0,05). El aumento en las UFC de *lactobacillus* fue significativamente mayor en el YE que en el grupo del YR (p < 0,05) (Tabla 1 y Figura 1). Al finalizar la experiencia, los grupos que consumieron la dieta a base de yogur presentaron una disminución en el pH cecal respecto del grupo C (p < 0,05), mientras que dicha disminución fue significativamente mayor en YE que en el YR (p < 0,05). Al finalizar la experiencia (Tf), los grupos que consumieron las dietas a base de yogur alcanzaron un porcentaje de agua en heces frescas y en el contenido cecal significativamente mayor que el grupo control (p < 0,01). La cantidad de ácido láctico y ácido acético (mg) en el contenido cecal fue significativamente mayor en los grupos que consumieron la dieta a base de yogur respecto del grupo C, aunque dicho aumento fue significativamente mayor en el grupo YE respecto de YR (p < 0,05).

La cantidad de ácidos propiónico y butírico en ciego (mg) aumentó significativamente en el grupo YE respecto del grupo C (p < 0,05). Contrariamente, el grupo YR no mostró cambios significativos respecto del grupo C (p < 0,05). La profundidad de las vellosidades intestinales aumentó significativamente en ambos yogures respecto del grupo C (p < 0,05), mientras que el aumento fue significativamente mayor en el grupo YE (p < 0,05) (Tabla 1 y Figura 2).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de Ca y FAO en sangre entre los tres grupos estudiados. Los niveles de CTX no mostraron diferencias entre los grupos C y YE; sin embargo fueron significativamente mayores en el grupo YR que en C y YE (p < 0,05) (Tabla 2). Los niveles de Pi sérico presentaron valores significativamente menores en el grupo C vs. YR y YE (p < 0,05) y en YE vs. YR (p < 0,05) (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del consumo de yogur en las determinaciones bioquímicas del metabolismo fosfocálcico y mineral, en la densidad mineral, histomorfometría y biomecánica ósea.

Grupos	C	YR	YE
<i>Determinaciones bioquímicas</i>			
sCa (mg/dL)	10,1±0,4	9,8±0,6	10,3±0,5
sPi (mg/dL)	9,4±0,6	13,4±1,3*	13,5±1,1*
FAO (UI/l)	70±9	70±7	69±5
CTX (pg/mL)	75,1±3,6	111,5±5,3*	83,1±7,7**
<i>Parámetros densitométricos</i>			
CMO g/PC	0,579±0,070	0,562±0,033	0,591±0,031**
DMO et (g/cm ² /PC)	0,146±0,009	0,140±0,039	0,143±0,033
DMO Cl (g/cm ² / PC)	0,043±0,003	0,038±0,003*	0,040±0,003**
DMO Tp (g/cm ² /PC)	0,042±0,004	0,039±0,002*	0,040±0,003**
<i>Determinaciones de histomorfometría</i>			
BV/TV (%)	26,7±2,0	26,7±1,9	32,3±2,9**,**
Longitud del fémur (g/PC)	12,2±0,1	12,3±0,1	12,7±0,1**,**
<i>Parámetros biomecánica</i>			
Fuerza máxima de fractura (N)	144,6±17,6	119,8±11,3*	140,5±17,5**
Módulo de elasticidad (Mpa)	112,3±13,2	93,3±10,9	108,4±14,2
Rigidez ósea (N/mm)	196,8±10,8	172,4±14,3*	200,1±10,7**

PC: peso corporal; sCa: calcio sérico; sPi: fósforo sérico; FAO: fosfatasa alcalina ósea; CTX: telopeptido tipo I C-terminal; CMO: contenido mineral óseo; DMO: densidad mineral ósea; et: esqueleto total; Cl: columna lumbar; Tp: tibia proximal; BV/TV%: fracción de volumen óseo. Grupo de ratas que recibieron las dietas: control AIN'93-G (C), yogur regular (YR) y yogur experimental (YE). Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor $P < 0,05$. Los resultados se expresaron como media \pm DS. * $P < 0,05$: YR o YE frente a C; ** $P < 0,05$ YE frente a YR.

Al inicio del estudio no existieron diferencias significativas en la ingesta, excreción fecal y absorción diaria o porcentual de Ca y Pi entre los tres grupos estudiados (Datos no mostrados).

La absorción diaria y porcentual de Ca fue significativamente mayor en YE que en los otros dos grupos ($p < 0,05$), mientras que YR solo mostró diferencias significativas en la absorción porcentual respecto del grupo C ($p < 0,05$), sin diferencias en la absorción absoluta de Ca (Figura 3A).

No existieron diferencias significativas en la ingesta de Pi durante el período final de balance; sin embargo, el Pi fecal fue significativamente menor en YE respecto de YR y C ($p < 0,05$), sin diferencias significativas entre estos dos grupos. La absorción diaria de Pi no presentó diferencias significativas, aunque el YE mostró aumento no significativo en la absorción respecto de C y YR. El % Abs Pi fue significativamente mayor en YR que en C ($p < 0,05$) y en YE respecto tanto del C como de YR ($p < 0,05$ (Figura 3B).

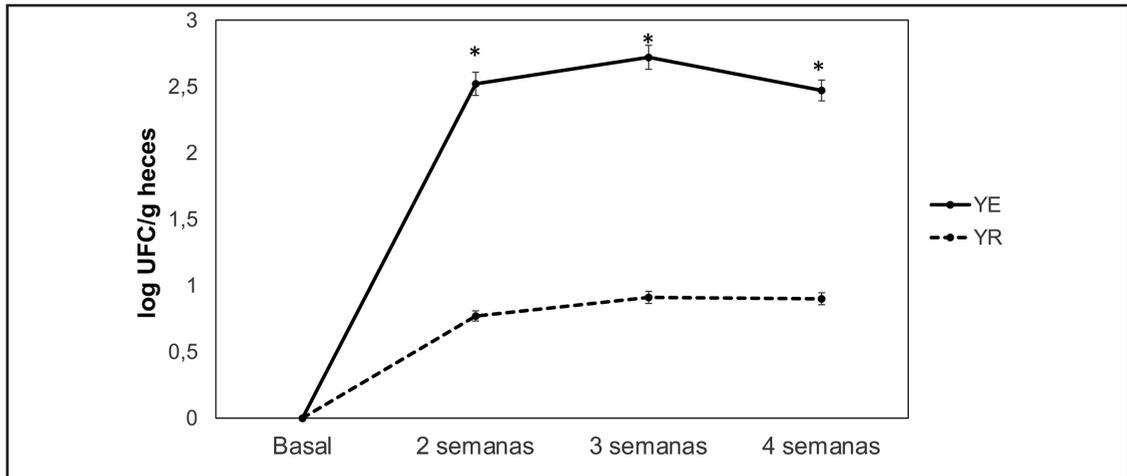


Figura 1. Desarrollo de colonias de lactobacilos en heces frescas en los grupos que recibieron la dieta a base de yogur respecto del grupo C. $p < 0,05$; (*) vs. YR.

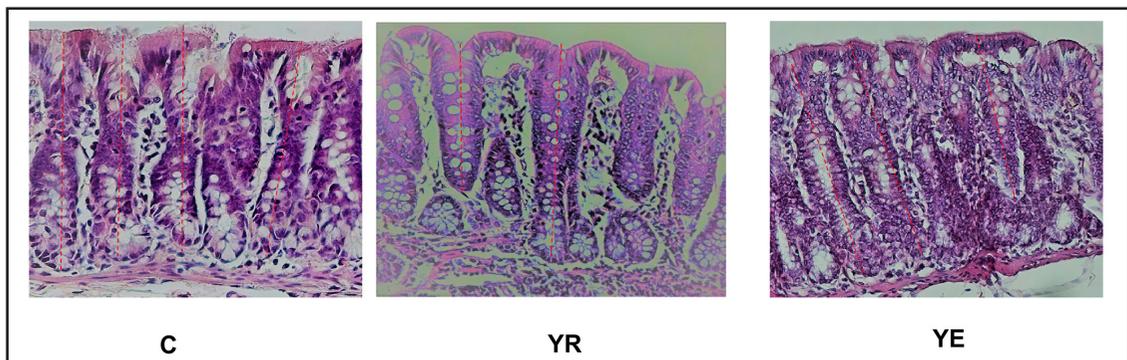


Figura 2. Microfotografía de profundidad de las criptas intestinales en todos los grupos estudiados a tiempo final. Técnica de tinción con hematoxilina-eosina en un sección longitudinal (20x). En línea roja punteadas se observa la distancia de medición de la profundidad. Grupos de ratas que recibieron las dietas: AIN'93-G control (C), yogur regular (YR) y yogur experimental (YE).

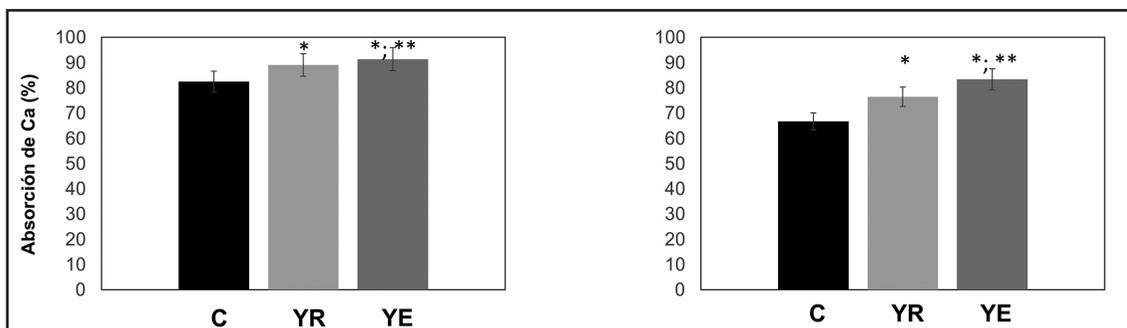


Figura 3 A. Porcentajes de absorción de Ca a tiempo final de la experiencia (media \pm DE). * $p < 0,05$ vs.C; ** $p < 0,05$ vs.YR.

Figuras 3 B. Porcentajes de absorción de Pi a tiempo final de la experiencia (media \pm DE). * $p < 0,05$ vs. C; ** $p < 0,05$ vs. YR.

La Tabla 2 muestra las determinaciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo fosfocálcico y óseo al final de la experiencia. Los niveles circulantes de Ca y FAO no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos; sin embargo, los niveles de Pi fueron significativamente superiores en los animales alimentados a base de yogur, que en el grupo control ($p < 0,05$), sin diferencia entre ellos. Los niveles de CTX fueron similares en el grupo YE y en el grupo C, y ambos significativamente menores respecto del grupo YR ($p < 0,05$).

En la Tabla 2 puede observarse que el etCMO y etDMO no presentaron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio, mientras que BV/TV (%) fue significativamente mayor en el grupo YE que en los grupos C y YR ($p < 0,05$), sin diferencias entre estos dos últimos. YR presentó un aumento no significativo en el etCMO respecto de YE y C ($p = 0,061$). En concordancia con los porcentajes de volumen óseo observados, la Figura 4 muestra un mayor número de trabéculas en el grupo YE respecto de los grupos C y YR, que gráficamente no muestran diferencias entre ellos.

La Tabla 2 muestra los parámetros biomecánicos de los tres grupos. El módulo de elasticidad no mostró diferencias significativas

entre los tres grupos; sin embargo, tanto la fuerza máxima de fractura como la rigidez ósea no mostraron diferencias significativas entre los grupos C y YE, mientras que se encontraron significativamente disminuidas en el grupo YR respecto de los otros dos grupos ($p < 0,05$).

Discusión

Los resultados del presente estudio demostraron que la dieta a base del yogur que contiene GOS reducido en lactosa permitió aumentar la absorción y alcanzar la retención y calidad ósea de los animales alimentados con la dieta adecuada para roedores en crecimiento (AIN'93-G). Estos resultados sugieren que el yogur experimental ensayado en este estudio sería una herramienta nutricional adecuada para asegurar el aporte de Ca tanto en sujetos tolerantes como intolerantes a lactosa.^{10, 27, 28} Contrariamente, la dieta a base de yogur regular sin GOS aumentó levemente la absorción de minerales, pero lo más significativo fue que tanto la retención como la calidad del hueso formado no alcanzaron los niveles del grupo control que corresponde a los estándares normales de este tipo de roedores en crecimiento.

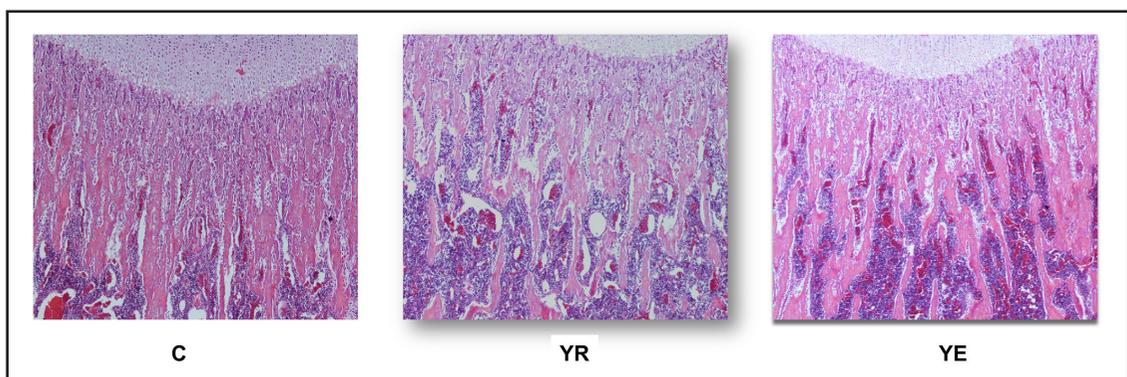


Figura 4. Microfotografía del tercio medio de la tibia proximal sobre hueso descalcificado. La tinción con hematoxilina y eosina muestra las trabéculas en color rojo (aumento 4 x). Grupos de ratas que recibieron las dietas: AIN'93-G control (C), yogur regular (YR) y yogur experimental (YE).



Durante el período experimental, todos los animales presentaron un comportamiento normal, permanecieron en buen estado de salud general, y no se observaron efectos secundarios por el consumo de las distintas dietas ensayadas, como diarrea. El aumento de peso corporal fue similar en los tres grupos estudiados debido a que no existieron diferencias en la ingesta de las distintas dietas isocalóricas. El crecimiento longitudinal del grupo control, evaluado a través de la longitud del fémur, solo fue logrado por los animales alimentados con el YE. En este sentido, es sabido que el crecimiento longitudinal se encuentra bajo la acción del eje hormona de crecimiento/factor de crecimiento similar a insulina 1 (GH/IGF-1). El IGF-1 es un importante regulador de la formación ósea cuya producción se encontraría regulada por la microbiota probiótica, según estudios previos.²⁹ En el presente estudio, la concentración de IGF-1 no ha sido evaluada; sin embargo se sabe que los GOS favorecen el crecimiento de bacterias probióticas como los *Bifidobacterium* y, como se ha observado en el presente estudio, de *Lactobacillus*.^{30, 31} El mayor desarrollo de este tipo de bacterias por el consumo de YE, junto al aporte de los microorganismos potencialmente probióticos presentes en el yogur, posiblemente haya favorecido la producción de IGF-1 responsable de la formación de hueso. Si bien el consumo del YR produjo un aumento en el desarrollo de *Lactobacillus*, la ausencia de GOS posiblemente no haya sido capaz de modificar significativamente la flora habitual, lo cual –según estudios previos– puede generar una señalización deficiente de IGF-1 dentro del tejido esquelético.³²

El consumo del YE con GOS no solo aumentó significativamente el desarrollo de *Lactobacillus* sino la concentración de AGCC, fundamentalmente butirato y propionato. De acuerdo con estudios previos, el aumento en la concentración de los AGCC sería el responsable de la disminución del pH del ciego, lo cual favorece el mantenimiento de los iones

Ca en solución, mejorando la disponibilidad de Ca y Pi para su absorción.¹⁰ Asimismo, la mayor producción de AGCC pudo haber favorecido directamente la absorción de Ca, ya que el propionato de Ca, por su contenido orgánico, atraviesa las membranas celulares más fácilmente que el ión Ca.^{31,33} Por otra parte, como hemos señalado previamente, el butirato es la fuente energética de los colonocitos,^{11; 33} por lo cual la mayor producción de este AGCC sería la responsable del efecto trófico intestinal evidenciado por una mayor proliferación y profundidad de las criptas de las células colónicas.³⁴ Asimismo, los AGCC favorecen la producción de proteínas de la unión de células epiteliales adyacentes y la expresión de CaBP-9kDa,³⁵ lo cual también estimularía la mayor absorción mineral observada en el presente estudio.

El YR aumentó la producción de los AGCC láctico y acético, sin afectar la de ácido propiónico y butírico. Si bien el aumento en la producción de lactato y acetato disminuyó el pH colónico, lo hizo a un nivel menor que el producido por el YE. La producción de estos AGCC por el consumo del yogur regular podría explicarse sobre la base de que una pequeña fracción de lactosa no digerida pudo alcanzar el colon donde es utilizada por bacterias intestinales, generando una baja proporción de lactulosa y su análogo lactitol.³⁶ La fermentación de niveles bajos de lactulosa por la microflora intestinal produce AGCC, principalmente propionato y lactato que reducen el pH intestinal.³⁷ En el presente estudio no se observó un aumento en la producción de propionato pero sí de lactato conjuntamente con acetato. El aumento en la acidez en el intestino y el ciego sería el responsable del crecimiento de las bacterias acidolácticas.¹⁰ No obstante ello, la producción de propionato y butirato no aumentaron, lo cual explicaría no solo los menores efectos tróficos sino también el menor efecto sobre la absorción de Ca y Pi respecto del YE. La mayor absorción de

Ca observada por el consumo de YR no se tradujo en aumentar la biodisponibilidad de este mineral para ser incorporado al hueso. Este efecto podría explicarse sobre la base de la menor relación Ca/Pi al utilizar leche de vaca para la fabricación del yogur, lo cual generó un mayor aporte de Pi que, como se mencionó previamente, altera el proceso de remodelación y mineralización del hueso.¹⁵ Contrariamente, el aporte de GOS por el consumo del YE logró aumentar la biodisponibilidad de los minerales óseos para ser incorporados al tejido.

Los niveles de fosfatemia están directamente relacionados con el aporte nutricional de Pi. En el presente estudio, los niveles séricos de fósforo fueron más elevados en los YE y YR como consecuencia del mayor aporte de Pi por parte de los yogures respecto de la dieta AIN'93-G. Los niveles elevados de Pi estimulan la síntesis y liberación de parathormona (PTH) y con ello generan un aumento en la actividad de remodelación óseo. Sin embargo, los niveles séricos de CTX del grupo YE fueron similares a los de la dieta control, mientras se encontraron aumentados en los animales alimentados a base de YR. Esta observación podría explicarse a partir de la posible acción de bacterias probióticas en la síntesis de IGF-1 y en la cantidad adicional de Ca absorbida. Mientras que el IGF-1 promueve el desarrollo óseo, el mayor aporte de Ca previene el aumento en la secreción de la hormona paratiroidea, evitando una excesiva resorción ósea.³⁸

Como se mencionó previamente, en el presente estudio no se evaluaron los cambios hormonales; sin embargo, nuestros resultados proporcionan evidencia clara relacionada con los cambios positivos por el consumo de YE en todos los parámetros óseos estudiados asociados al crecimiento y la calidad del hueso.^{10; 13} En este sentido, la longitud de la tibia, la masa ósea y la densidad mineral del esqueleto total, así como los parámetros de calidad ósea observados

en el grupo que consumió el YE, mostraron valores similares a los animales control. Respecto de las subáreas del esqueleto total evaluadas en el presente estudio se debe recordar que el esqueleto total está compuesto principalmente por hueso cortical, mientras que en la columna lumbar y la tibia proximal predomina el hueso trabecular. En la rata, la columna lumbar es una región que no soporta peso, por ello es más sensible a los cambios de masa ósea que las áreas que sí lo hacen, como la tibia proximal.³⁹ A pesar de estas diferencias, los niveles de DMO en tibia proximal y columna lumbar de los animales alimentados con YE alcanzaron los valores observados en los animales controles, confirmando la óptima biodisponibilidad del YE para lograr la masa esquelética apropiada durante la etapa de crecimiento. Finalmente, los parámetros de las pruebas de biomecánica obtenidos en el YE concluyen que el hueso formado presenta una óptima calidad, ya que sus valores son similares a los obtenidos en el grupo control.

Conclusión

El consumo de un YE reducido en lactosa que contiene GOS dio lugar a una mayor absorción de Ca que aseguró lograr la retención y calidad ósea de las ratas controles alimentadas con AIN'93-G, dieta adecuada para el crecimiento normal de roedores. Contrariamente, la dieta a base de YC sin GOS aumentó levemente la absorción de minerales, pero lo más significativo fue que la biodisponibilidad de dichos minerales fue menor, ya que los niveles de retención y calidad del hueso formado no alcanzaron los niveles observados en el grupo control que corresponden a los estándares normales para ratas Wistar en crecimiento.

Sobre la base de estos resultados, el yogur experimental ensayado sería un producto lácteo adecuado para proveer prebióticos y potenciales bacterias probióticas en el intestino y así aumentar la salud intestinal y la



biodisponibilidad de Ca necesario para optimizar el desarrollo óseo en un período de altos requerimientos como es la etapa de crecimiento. Pero, además, ayudaría a evitar los inconvenientes del mayor aporte de Pi al utilizar leche de vaca en la fabricación de yogures, tema que preocupa a la industria láctea. Además, y no menos importante, el yogur experimental ensayado reducido en lactosa que contiene GOS sería una estrategia terapéutica para alcanzar las recomendaciones de Ca en aquellos individuos que evitan el consumo de lácteos debido a los síntomas desagradables de la intolerancia a la lactosa.

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Mandalunis, y a las histotecnólogas Mariela Lacave e Ivana Sanchez Rojas de la Cátedra de Histología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires.

Parcialmente subvencionado por UBACyT y PIP.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Recibido: julio 2022

Aceptado: septiembre 2022

Referencias

1. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, et al. Peak bone mass. *Osteoporos Int* 2000;11(12):985-1009. doi:10.1007/s001980070020.
2. Hendrickx G, Boudin E, Van Hul W. A look behind the scenes: the risk and pathogenesis of primary osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11(8):462-74. doi:10.1038/nrrheum.2015.48.
3. Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10(7):1257-72. doi:10.2215/CJN.09750913.
4. Martínez de Victoria E. El calcio, esencial para la salud. *Nutr Hosp* 2016;33(4):26-31. doi:10.20960/nh.341.
5. Fassio F, Facioni MS, Guagnini F. Lactose Maldigestion, Malabsorption, and Intolerance: A Comprehensive Review with a Focus on Current Management and Future Perspectives. *Nutrients* 2018;10(11):1599. doi:10.3390/nu10111599.
6. Szilagyi A, Ishayek N. Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. *Nutrients* 2018;10(12):1994. doi:10.3390/nu10121994.
7. Weaver CM. How sound is the science behind the dietary recommendations for dairy?. *Am J Clin Nutr* 2014;99(5):1217S-22S. doi:10.3945/ajcn.113.073007.
8. Thorning TK, Raben A, Tholstrup T, Soedamah-Muthu SS, Givens I, Astrup A. Milk and dairy products: good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence. *Food Nutr Res* 2016;60:32527. doi:10.3402/fnr.v60.32527.
9. Kim SK, Guevarra RB, Kim YT, et al. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *J Microbiol Biotechnol* 2019;29(9):1335-40. doi:10.4014/jmb.1906.06064.
10. Whisner CM, Castillo LF. Prebiotics, Bone and Mineral Metabolism. *Calcif Tissue Int* 2018;102(4):443-79. doi:10.1007/s00223-017-0339-3.
11. McNabney SM, Henagan TM. Short Chain Fatty Acids in the Colon and Peripheral Tissues: A Focus on Butyrate, Colon Cancer, Obesity and Insulin Resistance. *Nutrients* 2017;9(12):1348. doi:10.3390/nu9121348.
12. Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their

- Stimulation in the Human Gut. *Front Microbiol* 2016;7:979. doi:10.3389/fmicb.2016.00979.
13. Scholz-Ahrens KE, Adolphi B, Rochat F, et al. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats - impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turnover. *NFS J* 2016;3:41-50. doi.org/10.1016/j.nfs.2016.03.001.
 14. Topolska K, Radzki RP, Filipiak-Florkiewicz A, Florkiewicz A, Leszczyńska T, Cieślak E. Fructan-Enriched Diet Increases Bone Quality in Female Growing Rats at Calcium Deficiency. *Plant Foods Hum Nutr* 2018; 73(3):172-9. doi: 10.1007/s11130-018-0671-4.
 15. Kemi VE, Karkkainen MU, Rita HJ, Laaksonen MM, Outila TA, Lamberg-Allardt CJ. Low calcium: phosphorus ratio in habitual diets affects serum parathyroid hormone concentration and calcium metabolism in healthy women with adequate calcium intake. *Brit J Nutr* 2010;103:561-8. doi: 10.1017/S0007114509992121.
 16. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr* 1993;123:1939-51. doi: 10.1093/jn/123.11.1939.
 17. Vénica CI, Wolf IV, Suárez VB, Bergamini CV, Perotti MC. Effect of the carbohydrates composition on physicochemical parameters and metabolic activity of starter culture in yogurts. Elsevier Science; *LWT - Food Science and Technology* 2018;94;(8):163-71. doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.034.
 18. Sapp RE, Davidson SD. Microwave digestion of multicomponent foods for sodium analysis by atomic absorption spectrometry. *J Food Sci* 1991;56:1412-4. doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb04786.x.
 19. Williams TR. Analytical method for atomic absorption spectrophotometry. *J Chem Educ* 1972;49(4):A250. doi.org/10.1021/ed049pA250.2.
 20. Bryk G, Coronel MZ, Pellegrini G, et al. Effect of a combination GOS/FOS® prebiotic mixture and interaction with calcium intake on mineral absorption and bone parameters in growing rats. *Eur J Nutr* 2015;54(6):913-23. doi:10.1007/s00394-014-0768-y.
 21. Huda-Faujan N, Abdulamir AS, Fatimah AB, et al. The impact of the level of the intestinal short chain Fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. *Open Biochem J* 2010;4:53-8. doi:10.2174/1874091X01004010053.
 22. Mastaglia SM, Pellegrini GG, Mandalunis P, Gonzales Chaves MMS, Friedman SM, Zeni SN. Vitamin D insufficiency reduces the protective effect of bisphosphonate on ovariectomy induced bone loss in rats. *Bone* 2006;39(4):837-44. doi: 10.1016/j.bone.2006.04.015.
 23. Zeni SN, Gómez-Acotto C, Di Gregorio S, Mautalén C. Differences in bone turnover and skeletal response to thyroid hormone treatment between estrogen-depleted and repleted rats. *Calcif Tissue Int* 2000;67(2):173-7. doi: 10.1007/s00223001106.
 24. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *BioTechniques* 2007;43(1):25-30. doi:10.2144/000112517.
 25. Pérez-Conesa D, López G, Ros G. Effects of probiotic, prebiotic and synbiotic follow-up infant formulas on large intestine morphology and bone mineralisation in rats. *J Sci Food Agric* 2007;87:1059-68. doi.org/10.1002/jsfa.2812.
 26. Wong CS, Gibson PR. The trophic effect of dietary fibre is not associated with a change in total crypt number in the distal colon of rats. *Carcinogenesis* 2003;24(2):343-8. doi:10.1093/carcin/24.2.343.
 27. Whisner CM, Martin BR, Schoterman MH, et al. Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: a double-blind cross-over trial. *Br J Nutr* 2013;110(7):1292-303. doi:10.1017/S000711451300055X.
 28. Coudray C, Tressol JC, Gueux E, Rayssiguier



- Y. Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *Eur J Nutr* 2003;42(2):91-8. doi:10.1007/s00394-003-0390-x.
29. Hsu E, Pacifici R. From Osteoimmunology to Osteomicrobiology: How the Microbiota and the Immune System Regulate Bone. *Calcif Tissue Int*; 2018;102(5):512-521. doi: 10.1007/s00223-017-0321-0.
30. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr* 2010;104 (2):S1-S63. doi:10.1017/S0007114510003363.
31. Ilesanmi-Oyelere BL, Kruger MC. The Role of Milk Components, Pro-, Pre-, and Synbiotic Foods in Calcium Absorption and Bone Health Maintenance. *Front Nutr* 2020; 7:578702. doi: 10.3389/fnut.2020.578702.
32. Novince CM, Whittow CR, Aartun JD, et al. Commensal Gut Microbiota Immunomodulatory Actions in Bone Marrow and Liver have Catabolic Effects on Skeletal Homeostasis in Health. *Sci Rep* 2017;7(1):5747. doi: 10.1038/s41598-017-06126-x.
33. Valdés AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 2018;361:k2179. doi:10.1136/bmj.k2179.
34. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* 2017;9(9):1021. doi:10.3390/nu9091021.
35. Plöger S, Stumpff F, Penner GB, et al. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci*; 2012;1258:52-9. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06553.x
36. Bothe MK, Maathuis AJH, Bellmann S, et al. Dose-Dependent Prebiotic Effect of Lactulose in a Computer-Controlled In Vitro Model of the Human Large Intestine. *Nutrients* 2017;9(7):767. doi: 10.3390/nu9070767.
37. Maltz C, Miskovitz PF, Hajifathalian K. Lactulose may reduce Clostridium difficile-related diarrhea among patients receiving antibiotics. *JGH Open* 2020;4(6):1088-90. doi: 10.1002/jgh3.12390.
38. Nath A, Molnár MA, Csighy A, et al. Biological Activities of Lactose-Based Prebiotics and Symbiosis with Probiotics on Controlling Osteoporosis, Blood-Lipid and Glucose Levels. *Medicina (Kaunas)* 2018;54(6):98. doi: 10.3390/medicina54060098.
39. Chen S, Lin Y, Li S, et al. Comparison of Bone Histomorphology and Bone Mineral Density in Different Parts of Ovariectomized Osteoporosis Rats. *J Hard Tissue Biol* 2019; 28:199-206. doi.org/10.2485/jhtb.28.199.