

ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

UTILIDAD DE UNA MEZCLA PREBIÓTICA PARA AUMENTAR LA ABSORCIÓN Y RETENCIÓN DE CALCIO DURANTE EL CRECIMIENTO NORMAL Y DURANTE LA RECUPERACIÓN DE UNA MALNUTRICIÓN PROTEICA: MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS

Gabriel Bryk,^{1,2} Evelyn Hernandez,^{1,2} Macarena Gonzales Chaves,^{1,2} Carlos Lugones,² Patricia Mandalunis,³ María Luz Pita Martín de Portela,⁴ Susana Noemí Zeni.^{1,2}

1. Cátedra de Bioquímica General y Bucal. Facultad de Odontología, UBA. 2. Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Óseas, Hospital de Clínicas, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM), CONICET-UBA. 3. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Odontología, UBA. 4. Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Resumen

Ciertos prebióticos aumentarían la absorción y biodisponibilidad de calcio (Ca). Objetivo: evaluar el efecto de una mezcla de galacto-oligosacáridos (GOS) y fructo-oligosacáridos (FOS) GOS/FOS® 9:1 sobre absorción mineral y retención ósea, durante 1) crecimiento normal, 2) recuperación nutricional, en ratas. Métodos: el estudio se realizó en dos grupos de animales con diferentes características nutricionales. *Crecimiento normal*: al destete y hasta 40 días, ratas macho recibieron dietas AIN-93G, con Ca: 0,5% (Ca.5-40); Ca: 0,3% (Ca.3-40); Ca: 0,5%+5,3% GOS/FOS® (Ca.5P-40); Ca: 0,3%+5,3% GOS/FOS® (Ca.3P-40). *Recuperación nutricional*: al destete, 2 grupos de ratas recibieron durante una semana dieta AIN-93G con 4% de proteínas (grupo D); luego, hasta 50 días de edad, dietas AIN-93G, con Ca: 0,5% (DCa.5-50); Ca: 0,5%+5,3% GOS/FOS® (DCa.5 P-50). Un grupo control (Ca.5-50) recibió desde el destete hasta los 50 días dieta AIN-93G. Semanalmente se evaluaron el consumo de alimento,

el peso y la longitud corporal; al inicio y al final de la experiencia: absorción de Ca, Mg y P (mg/d y %), desarrollo de *lactobacilos* y actividad enzimática en heces. Al sacrificio se midieron pH cecal, peso del ciego, biomecánica y densitometría (Lunar DXA), contenido mineral en fémur, marcadores óseos, parámetros densitométricos y biomecánicos. Resultados: en ambos modelos experimentales, el consumo de la mezcla prebiótica disminuyó el pH cecal y aumentó el desarrollo de *lactobacilos* ($p<0,001$), absorción de Ca, Mg y P ($p<0,001$). Asimismo mejoró la cantidad femoral de Ca y P ($p<0,05$) y los parámetros densitométricos ($p<0,01$), biomecánicos ($p<0,05$) y bioquímicos ($p<0,01$). Conclusión: GOS/FOS® favoreció la absorción de mineral induciendo mayor retención en hueso, lo que asegura una cantidad extra para favorecer la salud ósea.

Palabras clave: galacto-oligosacáridos (GOS), fructo-oligosacáridos (FOS), absorción, retención ósea, recuperación nutricional.

*Dirección postal: Susana Zeni. Av. Córdoba 2351-8vo. Piso (1120) Buenos Aires. Argentina.
Correo electrónico: snzeni@hotmail.com



Summary

USEFULNESS OF A PREBIOTIC MIXTURE TO INCREASE CALCIUM ABSORPTION AND RETENTION DURING NORMAL GROWTH AND DURING RECOVERY FROM PROTEIN MALNUTRITION: EXPERIMENTAL MODEL IN RATS

Nutrition influences linear growth and bone mass accumulation, modulating the genetic potential. Colonic fermentation of galacto-oligosaccharides (GOS) and fructooligosaccharides (FOS) enhances Ca absorption.

Objective: To evaluate the effect of a mixture 9:1 of short-chain galacto-oligosaccharides (GOS) and long-chain fructooligosaccharides (FOS) (GOS/FOS®) during normal growth or recovering from early protein deprivation on Ca and P absorption and bone retention, in rats. **Methods:** The study was done in two groups of rats with different nutritional status. **Normal growth:** At weaning until day 40, male rats received one diet: AIN-93G containing: 0.5% Ca (Ca.5-40); 0.3% Ca (Ca.3-40); 0.3% Ca plus 5.3% GOS/FOS® (Ca.3P). **Nutritional recovery:** At weaning, rats received a low protein diet (4%) during a week. Then, these undernourished (U) rats were reared with 0.5%Ca diet with or without 5.3% GOS/FOS® until 50 days of life (DCa.5-50 or DCa.5P50, respectively). A control nourished group was fed AIN-93G until 50 days of life. **Food consumption, Ca, Mg and P absorption (mg/d and %), and lactobacilli development in fresh feces were evaluated weekly; caecum pH, femur mineral content, biomechanical and densitometric analysis (Lunar DXA) and biochemical bone markers were measured after sacrifice. Results:** The prebiotic consumption increased lactobacilli development ($p < 0.0001$); reduced caecum pH ($p < 0.0001$); increased Ca, Mg and P absorptions ($p < 0.01$). Moreover,

prebiotic enhanced femur mineral content ($p < 0.05$); densitometric ($p < 0.01$), biomechanical ($p < 0.05$) and biochemical parameters ($p < 0.01$) in both experimental models as compared to the groups fed the prebiotic-free-diets. **Conclusion:** The prebiotic mixture studied here increased mineral absorption supplying an extra amount of bone minerals that benefited bone acquisition.

Keywords: galactooligosaccharides (GOS) / fructooligosaccharides (FOS), absorption, bone retention, recovering from undernutrition.

Introducción

La nutrición determina el crecimiento lineal y la acumulación de masa ósea durante el crecimiento, modulando el potencial genético del desarrollo óseo.^{1,2}

El Comité de Nutrición de los Estados Unidos informó que la ingesta de calcio (ICa) disminuye del 80 al 50% de las ingestas recomendadas en niños entre 1-5 años.^{3,4} Este hecho favorece el riesgo de no alcanzar el pico de masa ósea (PMO) al final del crecimiento y a aumentar la pérdida de masa ósea más adelante.³ En este sentido, distintas investigaciones determinan que existe un alto porcentaje de la población mundial, incluidos los niños, que no cubren la recomendación diaria de ICa y la Argentina no es ajena a ello.^{5,6,7}

La deficiencia proteica altera el eje-hormona de crecimiento/factor de crecimiento fibroblástico 1 (IGF1), afectando negativamente el crecimiento longitudinal del hueso y la osificación endocondral.^{8,9,10} Por ello, la malnutrición proteica disminuye la velocidad de crecimiento dando lugar a individuos con baja talla y composición anormal del hueso. Una dieta adecuada en proteínas iniciaría inmediatamente la recuperación del crecimiento,¹¹ pero para alcanzar el PMO y la talla ade-

cuada para la edad será esencial aumentar el aporte y la disponibilidad de Ca y fósforo (P).

Durante el crecimiento normal, cumplir con las recomendaciones nutricionales respecto de la ICa sería el método más eficaz para prevenir los efectos negativos debido a su deficiente/insuficiente aporte. Si ello no fuera posible, el aumento en la absorción intestinal se convertiría en una estrategia sencilla para mejorar la biodisponibilidad de dicho mineral. Por otra parte, ante los mayores requerimientos de Ca producto del “catch-up” que ocurre durante la recuperación nutricional, en lugar de aumentar la cantidad ingerida, la mayor absorción de Ca se convertiría en una herramienta fundamental para mejorar su aporte al hueso.

La mayor parte de la absorción de Ca se produce en el intestino delgado, aunque alrededor del 10% podría ocurrir en el colon.¹² Los oligosacáridos no digeribles (OND) constituyen en la leche materna el segundo componente de carbohidratos después de la lactosa.¹³ Tienen función prebiótica ya que actúan benéficamente en el colon, estimulando el crecimiento y/o la actividad de un número selectivo de bacterias sacarolíticas, como *lactobacilos* y *bifidobacterias*. Estas bacterias son benéficas para el huésped debido a varios factores.

Por un lado, generan productos metabólicos que estimulan la proliferación de los colonocitos favoreciendo la capacidad absorptiva del colon, pero al mismo tiempo modulan la respuesta del sistema inmunitario, lo cual sería sumamente importante durante la recuperación nutricional.

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y los gases generados por las especies benéficas descienden el pH y aumentan la solubilidad de diferentes sales de Ca y con ello su absorción.^{14,15} El ácido butírico presenta un efecto trófico sobre los colonocitos aumentando la profundidad y densidad de las criptas colónicas, y con ello la absorción paracelular/transcelular de minerales.^{16,17}

El incremento en la absorción colónica aumentaría la cantidad disponible de minerales para ser depositados en hueso; la mayor absorción conjunta de Ca y P mejora la mineralización.^{18,19} La acción trófica sobre la pared intestinal ejerce, además, efectos de protección frente al desarrollo de infecciones y disminuye la incidencia de alergias.²⁰ El presente estudio experimental fue diseñado para evaluar el efecto de una mezcla de GOS/FOS®, actualmente utilizada en fórmulas lácteas infantiles, sobre la absorción intestinal de Ca, P y magnesio (Mg) y la mineralización, densidad y estructura ósea, en el crecimiento normal y durante la recuperación nutricional. Varios parámetros colónicos indicativos del efecto de la mezcla prebiótica (pH luminal, peso del ciego, recuento de lactobacilos y actividad enzimática) fueron evaluados, para interpretar el mecanismo de acción.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratas machos Wistar al destete (~21 días de edad), con un peso comprendido entre 40-45 g, pertenecientes al bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA), que cuenta con regulación de los ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, control de temperatura (21 ± 2 °C) y 55% de humedad relativa. Los animales fueron mantenidos de acuerdo con las normas de la Guía de Salud de los Institutos Nacionales para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (ILARCLS, 1996). El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de Buenos Aires. Las ratas se colocaron en jaulas individuales de acero inoxidable. Tanto el alimento como el agua fueron administrados *ad libitum*. Al finalizar la experiencia, los animales fueron sacrificados por inhalación de dióxido de carbono (CO₂).



Dietas

La Tabla 1 muestra la composición centesimal de todas las dietas utilizadas. Todas fueron preparadas de acuerdo con las recomendaciones del *American Institute of Nutrition* (AIN-93G) del año 1993.²¹ Dicha dieta satisface los requerimientos nutricionales de los animales durante el crecimiento. La dieta normocálcica aportaba la cantidad recomen-

dada de Ca: 0,5%; la dieta hipocálcica solo aportaba 0,3% de Ca, y la dieta hipoproteica contenía la cantidad adecuada de Ca pero solo aportaba 4% de proteínas. Las dietas que contenían la mezcla prebiótica fueron preparadas adicionando 5,3% de la mezcla GOS/FOS® 9:1(® N.V.Nutricia, Argentina). Los dos niveles de Ca se obtuvieron mediante la adición de carbonato de calcio (grado analítico, Anedra, Argentina).

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales (Reeves PG. y col., 1993).

Dietas	Hipoproteica	AIN-93G (con 0,5% de Ca)	AIN-93G + 5,3% GOS/FOS®	AIN-93G (con 0,3%Ca)	AIN-93G (con 0,3% Ca) + 5,3% GOS/FOS®
	<i>Hipoproteica</i>	<i>DNCa</i>	<i>DNCa+GOS/FOS</i>	<i>DHCa</i>	<i>DHCa+GOS/FOS</i>
Energía (Kcal)	395	395	395	395	395
Proteínas (g)	4	17	17	17	17
Lípidos (g)	7	7	7	7	7
Mezcla de sales libre de Ca (g)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Vitaminas (g)	1	1	1	1	1
Colina (g)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Celulosa (g)	5	5	5	5	5
Dextrina			Para completar 100 g		
Ca (g)	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3
GOS/FOS® mixture (g)	--	--	5,3	--	5,3

*Vitaminas hidro y liposolubles (componentes individuales de Sigma, Missouri, USA). Ergocalciferol 200 UI%.

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

Diseño experimental

1. Crecimiento normal

Al destete, un total de 24 ratas macho fueron asignadas al azar a los 3 grupos estudiados (8 ratas por grupo), los cuales recibieron una de las dietas experimentales hasta los 40 días de edad (T=40).

Grupo Ca.5-40: AIN-93G contenía 0,5% de Ca

Grupo Ca.3-40: AIN-93G contenía 0,3% de Ca

Grupo Ca.P3-40: AIN-93G contenía 0,3% of Ca + 5,3% de la mezcla GOS/FOS® 9:1

2. Recuperación nutricional

Un total de 24 ratas machos al destete fueron asignadas al azar a los 3 grupos estudiados (8 ratas/grupo). Los grupos desnutridos fueron alimentados durante una semana con la dieta hipoproteica de mantenimiento, lo que limita el crecimiento. A continuación y hasta los 50 días de edad recibieron una de las siguientes dietas:

Grupo DCa.5-50: AIN-93G contenía 0,5% de Ca

Grupo DCa.P5-50: AIN-93G contenía 0,5% of Ca + 5,3% de la mezcla GOS/FOS® 9:1

En esta experiencia se evaluó conjuntamente un grupo control hasta los 50 días de edad. Dicho grupo (Ca.5-50) recibió desde el destete y hasta el final de la experiencia (T=50) la dieta AIN-93G que contenía 0,5% de Ca.

Parámetros zoométricos y de absorción

Desde el destete y hasta el final de las experiencias se registró la ingesta de alimentos y el peso y la longitud corporal (PC y LC, respectivamente) con una frecuencia de dos veces por semana. Se evaluó la ganancia de peso y longitud como la diferencia entre los valores finales y los valores al inicio de la experiencia. También fue evaluado el largo de la cola. Al final del estudio se determinaron el peso y la longitud de la tibia derecha (LT).

La absorción se evaluó por metodología de balance, tanto al comienzo de la experiencia (T=0) como al finalizar el estudio (T=40 y T=50). Para ello, los animales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales de acero inoxidable; se registró durante 3 días consecutivos la ingesta de alimento y se recolectaron las heces. Las heces se secaron en estufa a 100 C°, se pesaron y fueron reducidas a polvo homogéneo en un molinillo de acero inoxidable. Con dichos parámetros se calculó la absorción aparente (Abs) (mg/d) y la Abs como porcentaje de la ingesta (Abs%) de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

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

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

La determinación de Ca, Mg y P en heces y dieta se realizó luego de digerir una alícuota de las muestras con HNO₃ concentrado en un sistema de microondas usando bombas Parr para la determinación de Ca, Mg y P.²²

El Ca se determinó mediante absorción atómica empleando cloruro de lantano (concentración de 6500 ppm) como supresor de interferencias.²³

El P y Mg se determinaron por colorimetría utilizando los métodos habituales de laboratorio y empleando un autoanalizador (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

Determinaciones de lactobacilos y actividades enzimáticas en heces

A partir del destete y semanalmente se extrajeron heces frescas por estimulación anal, las cuales fueron inmediatamente transferidas a tubos estériles y homogenizadas formando una suspensión fecal por el agregado de una solución *buffer* fosfato 0,1M que contenía 0,5% de cisteína. Posteriormente, con el fin de cuantificar el desarrollo de colonias de lactobacilos, se realizaron diluciones sucesivas que se sembraron en medio de cultivo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Britania, Argentina), selectivo y específico para lactobacilos y otras bacterias acidolácticas, utilizando la técnica de profundidad. La incubación se realizó en atmósfera microaerófila con 5-10% CO₂, a 35-37 °C durante 48 horas.

Los lactobacilos fueron identificados por el desarrollo de pequeñas colonias de color blanco-grisáceo, lisas o rugosas. El recuento total de colonias por placa 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.

Una segunda alícuota fue utilizada para determinar las actividades enzimáticas por gramo de heces de β-glucosidasa, β-glucuronidasa, triptofanasa y ureasa, provenientes de bacterias intestinales. La β-glucosidasa fue evaluada utilizando p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (Sigma, USA) como sustrato y la β-glucuronidasa utilizando p-nitrofenil-β-D-glucurónido (Sigma, USA) como sustrato; la triptofanasa, utilizando triptófano como sustrato y la ureasa, utilizando urea como sustrato. Las reacciones fueron medidas en espectrofotómetro a 405 nm, 550 nm o 610 nm, respectivamente (Metrolab 2100, Argentina).²⁴⁻²⁹



Determinaciones de peso y pH del ciego

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

Determinaciones bioquímicas y biomecánicas en fémur

Los fémures fueron removidos luego del sacrificio y limpiados de todo resto muscular. El fémur izquierdo se secó 72 horas a 100 °C; se desengrasó con una mezcla de cloroformo-metanol (3:1); se secó y se evaluó el peso y la longitud con una balanza analítica y con un Vernier, respectivamente. Los fémures así tratados se mineralizaron con una mezcla de HCl- HNO₃ (1:1) hasta su completa disolución. Los contenidos de Ca, Mg y P se determinaron por los mismos métodos descritos previamente. El fémur derecho se utilizó para pruebas biomecánicas mediante el test de flexión de tres puntos en un equipo Instron 4411 de análisis universal de materiales. Se determinó fuerza máxima de fractura, rigidez ósea y módulo de elasticidad.

Determinaciones histológicas

Al final de la experiencia se extrajo la tibia derecha, la cual se fijó por inmersión en *buffer* formalina durante un período de 48 horas; se descalcificó con ácido etilen-diaminotetra- acético (EDTA) al 10% (pH 7,4) durante 30 días. Posteriormente se incluyó en parafina a 56-58 °C. Se realizaron cortes longitudinales de un espesor de entre 8 y 10 µm de la parte de hueso subcondral a nivel del tercio medio. Dichos cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y microfotografiados (equipo AXIOSKOP®, Carl Zeiss) para realizar las medidas histomorfométricas en el área central del hueso metafisario. Por medio de la imagen digitalizada y utilizando el programa de com-

putación Image-Pro 4.5, se evaluaron el volumen óseo (BV/TV) (%) y el ancho del cartílago de crecimiento (GPC). Este último incluyó el ancho total del cartílago epifisario (GPC.Th) (µm) y el ancho del cartílago hipertrófico (HpZ.Th) (µm). Se realizaron 12 mediciones sobre rectas paralelas de orientación horizontal previamente trazadas entre dos puntos ubicados sobre los límites superior e inferior del área de estudio, distantes una de otra por 1,5 mm.

Densitometría ósea

Previo al sacrificio se midieron “*in vivo*” el contenido y la densidad mineral ósea (CMO y DMO, respectivamente) de esqueleto total (Et) bajo anestesia intraperitoneal (0,1 ml clorhidrato de ketamina/100 g PC, Holliday-Scott SA, Argentina + 0,02 ml de clorhidrato de xilacina, Xilacina, Lab Richmond Div. Veterinaria SA, Argentina). El equipo DXA utilizado consta de un software diseñado específicamente para evaluar pequeños animales (DPX Alfa, radiación Lunar Corp., Madison, WI).³⁰ 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 coeficiente de variación (CV) fue de 0,9% para DMO de esqueleto total y del 3,0% para CMO. El análisis de las diferentes subáreas se realizó utilizando la imagen del animal visualizada en la pantalla de la computadora mediante operación manual delimitando una ventana específica (ROI) para cada segmento. El CV para DMO de columna lumbar (CL) fue del 1,8% y para tibia proximal (TP) fue del 3,5%. Todos los análisis fueron realizados por el mismo observador con el fin de reducir al mínimo la variación interobservador.³³

Determinaciones bioquímicas en suero

Al finalizar la experiencia se extrajo suero en ayunas. Las determinaciones de Ca, P y Mg

fueron realizadas por espectrometría de absorción atómica, con la misma metodología que la empleada para dietas y materia fecal. Las determinaciones de proteínas totales, albúmina y PCR ultrasensible fueron realizadas con un autoanalizador (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). La fosfatasa alcalina ósea (FAO), previa precipitación de la isoforma ósea con lectina de germen de trigo, se determinó con el autoanalizador citado precedentemente. El telopéptido carboxilo terminal del colágeno Tipo I (sCTX) fue determinado por inmunoensayo (ELISA) de competición proteica (Rat-laps®, Osteometer BioTech, Herlev, Dinamarca o Crosslaps®, Nordic Bioscience Diagnostics A/S).³¹

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm desvío estándar (DE).

La normalidad de las variables fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Los datos normales fueron

analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y aquellos que no presentaron distribución normal (desarrollo de lactobacilos) mediante la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Cuando se constató diferencia entre los distintos grupos se aplicó la prueba “a posteriori” de Bonferroni para determinar entre cuáles de los grupos se encontraban diferencias significativas. Los análisis se realizaron utilizando el programa SPSS 19.0 para Windows (SPSS, Inc. Chicago, IL). Un valor de p inferior a 0,05 ($p < 0,05$) se consideró significativo.

Resultados

Parámetros zoométricos

Todos los animales permanecieron en buen estado de salud y no mostraron a lo largo de todo el estudio, al consumir la dieta con prebióticos, efectos adversos como diarrea. El consumo promedio de alimentos (g/día) no mostró diferencias significativas entre los grupos durante todas las experiencias (Tabla 2).

Tabla 2. Consumo, peso corporal, longitud corporal y longitud de tibia (media \pm DE).

	Ca.5-40	Ca.3-40 Crecimiento normal	Ca.P3-40	Dca.5-50	Ca.5-50 Recuperación nutricional	Dca.P5-50
Consumo diario (g)	12,4 \pm 1,3	11,5 \pm 1,7	12,6 \pm 1,2	13,6 \pm 1,7	12,9 \pm 1,8	13,2 \pm 2,1
Peso corporal (al destete) (g)	42,8 \pm 3,3	42,6 \pm 3,8	42,6 \pm 3,6	41,8 \pm 1,9	41,6 \pm 3,2	41,1 \pm 2,4
Peso Corporal (a la semana)(g)	80,5 \pm 6,9	78,2 \pm 6,3	75,7 \pm 7,0	81,7 \pm 5,3	40,8 \pm 2,8#	42,8 \pm 3,5##
Peso Corporal (al final del estudio)(g)	132,2 \pm 16,0	120,1 \pm 11,2	131,7 \pm 18,2	175,6 \pm 3,1	167,7 \pm 15,1#	169,7 \pm 13,7#,#
Ganancia de peso (g/d)	92,3 \pm 10,4	81,1 \pm 8,0*	97,2 \pm 12,8	134 \pm 5	126 \pm 17	129 \pm 13
Longitud Corporal (al destete) (cm)	11,9 \pm 0,1	11,8 \pm 0,3	11,7 \pm 0,5	12,0 \pm 0,2	11,6 \pm 0,4	11,7 \pm 0,3
Longitud corporal (a la semana) (cm)	14,5 \pm 0,5	14,1 \pm 0,6	14,1 \pm 0,6	14,5 \pm 0,42	12,1 \pm 0,3#	12,3 \pm 0,4#
Longitud corporal (al final del estudio)(cm)	17,8 \pm 0,7	16,7 \pm 0,7*	18,1 \pm 0,7**	20,3 \pm 0,8	16,8 \pm 0,6#	17,6 \pm 0,6#,,#
Ganancia en longitud corporal(cm)	5,8 \pm 0,6	5,1 \pm 0,7*	5,6 \pm 0,5**	8,3 \pm 0,9	5,6 \pm 1,0#	6,2 \pm 0,5#,,#
Ganancia longitud de la cola (cm)	5,3 \pm 0,4	5,7 \pm 0,3	5,3 \pm 0,6	5,9 \pm 1,5	6,1 \pm 0,9	6,0 \pm 1,0
Longitud de tibia(cm)	3,26 \pm 0,08	3,04 \pm 0,10*	3,22 \pm 0,09	3,41 \pm 0,09	3,19 \pm 0,14#	3,21 \pm 0,10#

Datos según Bonferroni luego de aplicar ANOVA. (*): $p < 0,01$ vs. Dca.5-50; (**): $p < 0,01$ vs. Ca.3-40; (#): $p < 0,01$: respecto de Ca.5-50 y (##): $p < 0,01$ respecto de Dca.5-50 y (α) $p < 0,05$ respecto de Dca.5-50.



1. Crecimiento normal.

A T=0 no existieron diferencias en el PC. A T=40, Ca.3-40 presentó el menor PC, aunque sin alcanzar diferencias significativas respecto de Ca.5-40 y de Ca.3 P-40 (Tabla 2).

A T=0 no existieron diferencias en LC. A T=40, Ca.3-40 presentó una LC significativamente menor que Ca.5-40. Sin embargo, el grupo Ca.3 P-40, que consumió prebióticos, a pesar del bajo aporte de Ca, presentó valores similares a Ca.5-40 y significativamente mayores que Ca.3-40 ($p < 0,01$).

No existieron diferencias en la ganancia de longitud de la cola (Tabla 2).

Al final del estudio, Ca.3-40 mostró el menor valor en la longitud de la tibia sin alcanzar diferencias significativas con los demás grupos (Tabla 2).

2. Recuperación nutricional

A T=0 no existieron diferencias en el PC. Luego de recibir la dieta hipoproteica, como era de esperar, los grupos DCa.5-50 y DCa.P5-50 presentaron un PC menor que Ca.5 y Ca.3 de la misma edad ($p < 0,01$), sin diferencias entre ellos. A T=50, DCa.5-50 y DCa.5P-50 presentaron un PC significativamente menor que Ca.5-50, pero superior a los grupos de 40 días de edad.

Un comportamiento similar se observó en la ganancia de PC (Tabla 2). A T=0 no existieron diferencias en LC. Luego de recibir la dieta hipoproteica, los grupos DCa.5-50 y DCa.P5-50 presentaron una LC menor que Ca.5 ($p < 0,01$), sin diferencias entre ellos.

Al finalizar, la experiencia DCa.5-50 presentó una LC significativamente menor que Ca.5-50 ($p < 0,01$).

El consumo de prebióticos aumentó la LC, por lo cual –a pesar del bajo aporte de Ca– los valores alcanzados por Ca.5P fueron significativamente mayores que Ca.3-40 ($p < 0,05$), aunque aún permanecieron significativamente menores que Ca.5-50 ($p < 0,01$).

Un comportamiento similar se observó en la LC. No existieron diferencias en la ganancia de longitud de la cola (Tabla 1).

Al final del estudio, DCa.5-50 alcanzó una longitud de tibia significativamente menor que Ca.5-50 ($p < 0,01$) y el consumo de prebióticos no logró recuperar dicha longitud, por lo cual DCa.5P-50 mostró un valor similar a DCa.5P-40 y significativamente menor que Ca.5-50 ($p < 0,01$) (Tabla 2).

Desarrollo de lactobacilos, pH y peso cecal y enzimas bacterianas

En los dos modelos estudiados, a T=0 todos los grupos presentaron similar desarrollo de lactobacilos y actividad bacteriana.

Sin embargo, a partir de la primera semana y hasta finalizar la experiencia, los grupos que consumieron la mezcla GOS/FOS® aumentaron en forma significativa la cantidad de colonias de lactobacilos y de β -glucosidasa al mismo tiempo que redujeron los niveles de β -glucuronidasa, triptofanasa y ureasa en comparación con las dietas libres de prebióticos (Tabla 3 y Figuras 1a y 1b).

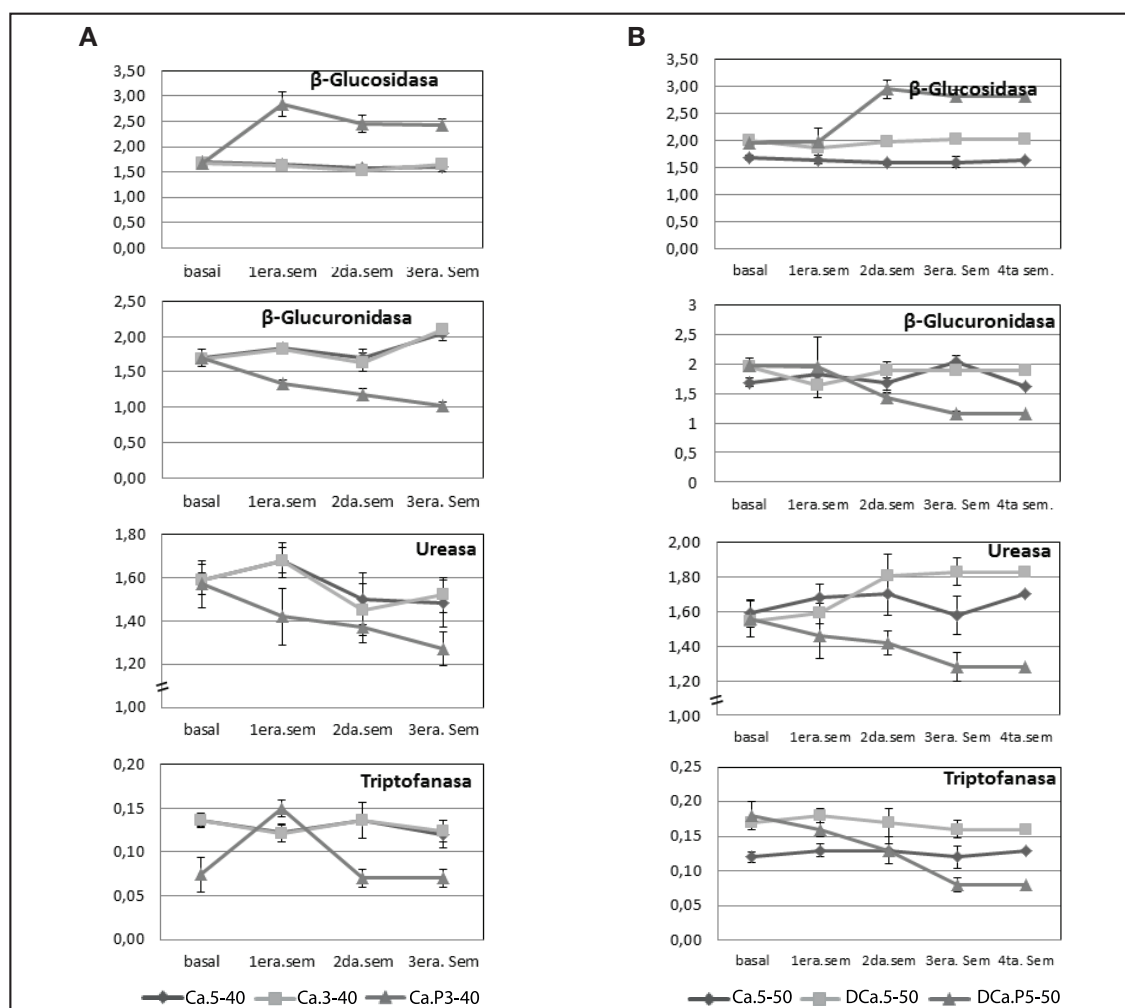
Asimismo, en los dos modelos de crecimiento estudiados, el pH cecal fue significativamente menor y el peso cecal fue significativamente mayor ($p < 0,01$) en los grupos que consumieron la mezcla prebiótica (Tabla 3).

No se observaron diferencias en el peso del hígado, el bazo y los riñones (datos no mostrados).

Tabla 3. Análisis bacteriológico, peso y pH del ciego, y enzimas fecales.

	Ca.5-40	Ca.3-40 Crecimiento normal	Ca.P3-40	DCa.5-50	Ca.5-50 Recuperación nutricional	DCa.P5-50
Lactobacilos (T=0) (lg UFC/g feces)	5,5±0,1	5,5±0,1	5,4±0,2	5,4±0,1	5,4±0,1	5,5±0,2
Lactobacilos (T=50 o T=40) (lg UFC/g feces)	5,7±0,2	5,6±0,1	7,1±0,1*,**	5,6±0,2	5,2±0,2	7,3±0,3#, ##
pH del ciego	7,2±0,2	7,1±0,1	6,4±0,3	7,1±0,2	7,1±0,1	6,4±0,2
Peso del ciego(g)	1,3±0,2	1,3±0,1	2,1±0,1*,**	1,5±0,2	1,2±0,3	2,4±0,3#,##
β-glucosidasa (T=40 o T=50)	1,60±0,10	1,64±0,07	2,42±0,19*,**	1,64±0,14	2,03±0,10#	2,83±0,33#
β-glucuronidasa (T=40 o T=50)	2,04±0,10	2,10±0,08	2,04±0,10*,**	1,61±0,14	1,89±0,16#	1,16±0,13#,##
Ureasa (T=40 o T=50)	1,48±0,11	1,52±0,08	1,17±0,08*,**	1,40±0,15	1,83±0,16#	1,28±0,14#,##
Tryptophanasa (T=40 o T=50)	0,120±0,015	0,123±0,012	0,069±0,014*,**	0,109±0,009	0,138±0,013#	0,078±0,008#,##

Datos según Bonferroni luego de aplicar ANOVA. (*): p<0,01 vs. Ca.5-50; (**): p<0,01 vs. Ca.3-40; (#): p<0,01 respecto de Ca.5-50 y (##): p<0,01 respecto de DCa.5-50.



Figuras 1. Cambios en la actividad enzimática en Heces frescas. A: crecimiento normal y B: desnutrición



Evaluaciones bioquímicas en suero

En los dos modelos de crecimiento estudiado no se observaron diferencias significativas en los niveles de FAO, Ca, P, Mg, proteínas totales y albúmina. Durante el crecimiento normal, el CTX mostró niveles significativamente mayores en Ca.3-40 respecto de Ca.5-40, mientras que el consumo de prebióticos disminuyó el nivel sérico de este marcador de resorción, por lo cual los niveles

de CTX en Ca.P5-50 fueron significativamente menores que en Ca.3-40 ($p < 0,01$) pero aun significativamente mayores que en Ca.5-40 ($p < 0,01$). Durante la recuperación nutricional, los niveles de CTX del grupo DCa.5-50 fueron significativamente menores que los de Ca.5-50 ($p < 0,01$), en tanto que el consumo de prebióticos redujo aún más los niveles de CTX, por lo cual DCa.5P-50 mostró valores significativamente menores que Ca.5-50 ($p < 0,01$) (Tabla 4).

Tabla 4: Determinaciones bioquímicas al final de la experiencia.

	Ca.5-40	Ca.3-40	Ca.P3-40	DCa.5-50	Ca.5-50	DCa.P5-50
	Crecimiento normal			Recuperación nutricional		
FAO (UI/l)	85,0±8,2	84,5±6,0	89,1±3,2	74±9	87±12	81±13
CTX (ng/ml)	141±19	188±38*	154±12*,***	123±19	95±18#	107±10#,€
Ca (mg/dl)	10,2±0,3	9,5±0,3	9,7±0,3	10,3±0,3	10,2±0,6	9,8±0,9
P (mg/dl)	10,6±0,4	10,5±0,3	10,7±0,6	10,6±0,6	10,2±0,9	10,1±1,0
Mg (mg/dl)	2,6±0,2	2,6±0,3	2,7±0,1	2,5±0,3	2,4±0,1	2,5±0,3
Proteínas totales (mg/dl)	5,3±0,5	5,7±0,5	5,6±0,4	5,4±0,4	5,6±0,7	5,4±0,4
Albumina (mg/dl)	3,5±0,3	3,5±0,4	3,6±0,3	3,4±0,3	3,7±0,3	3,6±0,42
PCR ultra sensible (mg/dl)	0,28±0,04	0,26±0,06	0,27±0,08	0,31±0,08	0,41±0,05#	0,28±0,05€

Datos según Bonferroni luego de aplicar ANOVA. (*): $p < 0,01$ vs. Ca.5-50; (**): $p < 0,05$ vs. Ca.3-40; (#): $p < 0,01$: respecto de Ca.5-50 y (€): $p < 0,05$ respecto de DCa.P5-50.

Durante el crecimiento normal no existieron diferencias en los niveles de PCR ultrasensible.

Contrariamente, en el estudio de recuperación, dichos niveles fueron significativamente mayores en DCa.5-50 que en Ca.5-50, mientras que el consumo de prebióticos disminuyó dicho valor, por lo cual DCa.5P-50 mostró niveles significativamente menores que DCa.P5-50 ($p < 0,05$), sin diferencias con Ca.5-50.

Absorción aparente

En ambos modelos de crecimiento, a T=0 no existieron diferencias significativas en la Abs y % Abs de Mg y P. Durante el crecimiento normal, la ICa y la excreción fecal estuvieron relacionadas con el contenido de Ca de la dieta por lo cual Ca.3-40 mostró niveles significativamente menores que Ca.5-40 y DCa.P5-50 (32,1±3,0 vs. 53,8±4,3 y 50,7±3,7 mg/d, respectivamente; $p < 0,01$).

Al finalizar la experiencia, tanto en crecimiento normal como durante la recuperación nutricional se observó el mismo comportamiento. En el primer caso, el grupo Ca.3-40 mostró valores de ICa, CaF y AbsCa significativamente menores que Ca.5-40 ($p < 0,05$). El consumo de prebióticos redujo la excreción fecal respecto de Ca.3-40 y Ca.5-40, por lo cual aumentó la AbsCa aparente y el % AbsCa, aunque solo en esta última se observó diferencia significativa ($p < 0,01$) (Tabla 5).

Durante la recuperación nutricional, la reducción significativa en la excreción fecal de Ca del grupo DCa.P5-50 indujo un aumento significativo en la AbsCa aparente y en el %AbsCa respecto de Ca.5-50 y DCa.5-50 ($p < 0,01$) (Tabla 5).

Un aumento similar se pudo observar en la AbsP y Mg y en el % de AbsP y Mg por el consumo de prebióticos tanto durante el crecimiento normal como durante la recuperación nutricional (Tabla 5).

Tabla 5. Absorción de Ca, P y Mg al final de las experiencias.

	Ca.5-40	Ca.3-40	Ca.P3-40	DCa.5-50	Ca.5-50	DCa.P5-50
	Crecimiento normal			Recuperación nutricional		
Ingesta de Ca (mg/d)	85,5±7,1	47,2±4,8	52,2±1,6	84,1±8,3	82,9±5,5	81,7±6,2
Ca Fecal (mg/d)	18,8±4,7	6,3±1,5*	3,9±1,1*,**	21,5±2,9	21,0±0,7	12,5±0,6#, ##
Absorción de Ca (mg/d)	66,7±5,9	40,9±5,4*	48,8±1,9**	62,2±6,2	61,9±5,1	71,2±6,1#
Absorción de Ca (%)	78,3±2,1	86,7±3,7	93,5±2,1*,**	75,1±2,1	74,6±1,4	84,7±1,3#, ##
Ingesta de P (mg/d)	51,3±8,9	47,2±4,8	52,2±1,6	50,7±5,0	49,8±3,3	49,0±3,7
P fecal (mg/d)	10,6±1,6	9,4±2,5	3,5±1,0*,**	10,8±1,5	11,8±1,3	6,6±1,5#, ##
Absorción de P (mg/d)	40,6±2,0	37,8±5,4	48,8±1,8*,**	40,0±2,6	37,9±3,0	42,4±3,1
Absorción de P (%)	79,3±1,9	80,8±5,1	93,4±1,7*,**	79,5±2,7	76,2±2,1	86,5±2,4#, €
Ingesta de Mg (mg/d)	8,7±1,5	8,0±0,8	8,8±0,3	8,6±0,8	8,5±0,6	8,3±0,6
Mg fecal(mg/d)	3,6±0,6	3,1±0,9	1,6±0,6	3,8±0,3	3,6±0,2	2,1±0,2
Absorción de Mg (mg/d)	5,2±0,5	4,9±1,3	7,5±0,4	4,9±0,3	4,8±0,5	6,2±0,6
Absorción de Mg (%)	59,2±1,1	61,3±5,1	84,6±3,4	58,3±4,3	56,5±3,2	74,6±2,5

Datos según Bonferroni luego de aplicar ANOVA. (*): $p < 0,01$ vs. DCa.5-50; (**): $p < 0,05$ vs. Ca.3-40; (#): $p < 0,01$: respecto de Ca.5-50 ; (##): $p < 0,01$ respecto de DCa.5-50 y (€): $p < 0,05$ respecto de DCa.5-50.

Contenido mineral en fémur y parámetros densitométricos

Durante el crecimiento normal, el consumo de la dieta hipocálcica disminuyó el contenido de Ca y P en fémur respecto de la normocálcica ($p < 0,01$) y el consumo de prebióticos aumentó la cantidad de Ca y P en fémur res-

pecto de Ca.3-40 ($p < 0,05$) y alcanzó niveles similares a Ca.5-40. No se observaron diferencias en el contenido de Mg ni en la relación Ca/P en fémur (Tabla 6). Durante la recuperación nutricional, mientras DCa.5-50 mostró niveles de Ca y P significativamente menores que Ca.5-50 y DCa.P5-50 ($p < 0,01$), el consumo de prebióticos aumentó dichos niveles,



con lo cual DCa.P5-50 alcanzó un contenido de Ca y P en fémur significativamente mayor que DCa.5-50 ($p < 0,01$) y sin diferencias respecto de Ca.5-50 (Tabla 6). La relación Ca/P fue significativamente menor en DCa.5-50 respecto de Ca.5-50 y DCa.P5-50 ($p < 0,01$), los que no mostraron diferencias entre ellos.

Los niveles de Mg en DCa.5 fueron significativamente menores que en DCa.5-50 ($p < 0,01$) y el consumo de prebióticos no aumentó la cantidad de Mg depositada en hueso, con lo cual DCa.P5-50 mostró niveles similares a DCa.5-50, pero significativamente menores respecto de Ca.5-50 ($p < 0,01$) (Tabla 6).

Tabla 6: Contenido mineral en fémur, parámetros densitométricos, histomorfométricos y biomecánicos al final de las experiencias.

	Ca.5-40	Ca.3-40	Ca.P3-40	DCa.5-50	Ca.5-50	DCa.P5-50
	Crecimiento normal			Recuperación nutricional		
Ca en fémur (mg/g)	117,0±2.6	102,4±0,3*	121,0±3,2**	126,7±1,8	98,7±4,8#	120,0±4,6##
P en fémur (mg/g)	70,0±1,1	60,9±1,3*	70,2±1,6**	75,7±1,4	61,7±3,0#	71,9±2,8##
Mg en fémur (mg/g)	1,34±0,03	1,18±0,03	1,32±0,02	1,43±0,06	1,21±0,05#	1,22±0,07#
Relación Ca/P en femur	1,67±0,01	1,68±0,03	1,70±0,03	1,67±0,04	1,60±0,01#	1,67±0,01##
CMO/PC esqueleto total (g/100 g BW)	1,77±0,12	1,41±0,18*	1,73±0,23**	2,22±0,18	2,01±0,11#	2,18±0,13##
DMO esqueleto total (mg/cm ²)	224±6	222±5	226±7	258±15	258±15	259±17
DMO de columna lumbar (mg/cm ²)	185±8	182±6	181±9	175±11	166±11	171±13
DMO de tibia proximal (mg/cm ²)	169±4	158±3*	165±2**	179±8	169±6#	178±7##
Volumen óseo (BV/TV) (%)	27,5±2,5	20,6±1,7*	27,1±2,7**	33,0±3,7	26,8±5,3#	30,7±5,2##
Longitud total cartilago crecim. (GPC.Th) (µm)	525±40	463±30*	511±56**	512±43	490±38#	505±49##
Long. cartilago hipertr. (HpZ.Th) (µm)	243±4	225±7*	232±20**	297±23	234±42#	255±58##
Fuerza de fractura (N)	46,4±3,6	35,6±2,9*	39,5±3,8*	54,6±4,8	32,8±4,1#	35,3±3,1##
Rigidez ósea (N/mm)	103±10	89±4*	98±11**	119±14	74±6#	94±5##,€
Módulo de Elasticidad (Mpa)	623±17	416±24*	558±31**,***	760±19	516±35#	709±26##,€

Datos según Bonferroni luego de aplicar ANOVA. (*): $p < 0,01$ vs. Ca.5-40; (**): $p < 0,05$ vs. Ca.3-40; (#): $p < 0,01$: respecto de Ca.5-50 ; (##): $p < 0,01$ respecto de DCa.5-50 y (€): $p < 0,05$ respecto de DCa.5-50.

Como se esperaba, el CMO expresado por PC mostró en ambos modelos de crecimiento estudiados un comportamiento similar al contenido de Ca en fémur ($p < 0,01$).

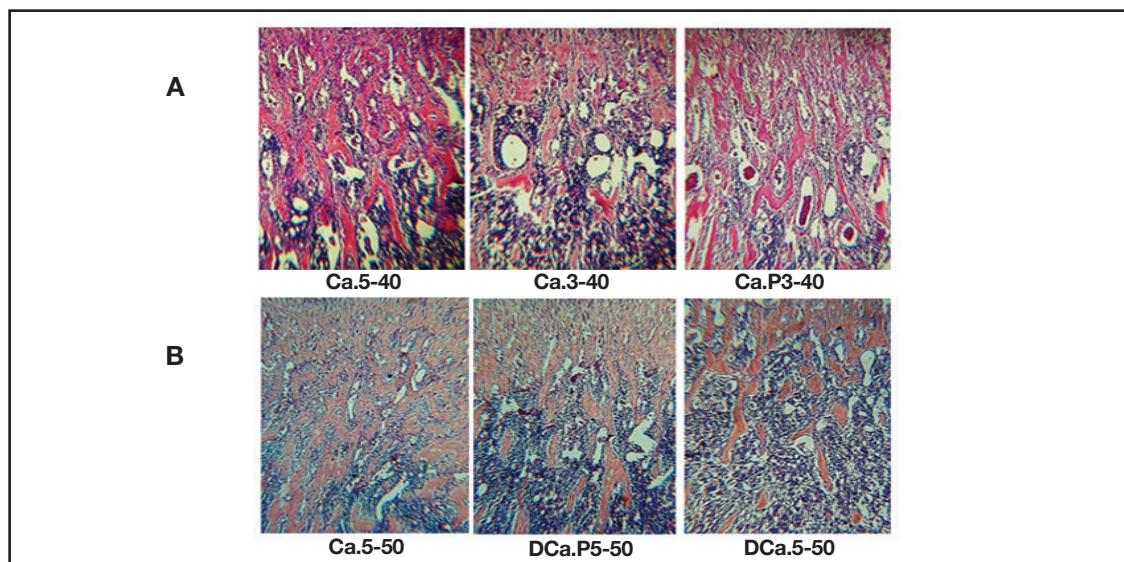
La DMO de esqueleto total en ambos modelos de crecimiento estudiados no mostró diferencia significativa entre los grupos. Durante el crecimiento normal, la DMO de columna lumbar no mostró diferencias significativas, mientras que la DMO de tibia pro-

ximal fue significativamente menor en el grupo Ca.3-40 respecto de Ca.5-40 ($p < 0,05$). El consumo de prebióticos aumentó dicho parámetro, por lo que DCa.P5-50 mostró niveles significativamente mayores que Ca.3-40 pero similares a Ca.5-40 (Tabla 6).

En ambos modelos de crecimiento, el BV/TV%, el GPC.Th y el HpZ.Th mostraron un comportamiento similar al CMO del esqueleto total (Tabla 6).

En las Figuras 2a y 2b se muestran los cortes histológicos del tercio medio de la tibia distal donde fue evaluado el volumen óseo de los grupos estudiados. Se puede observar la reducción en el número de tra-

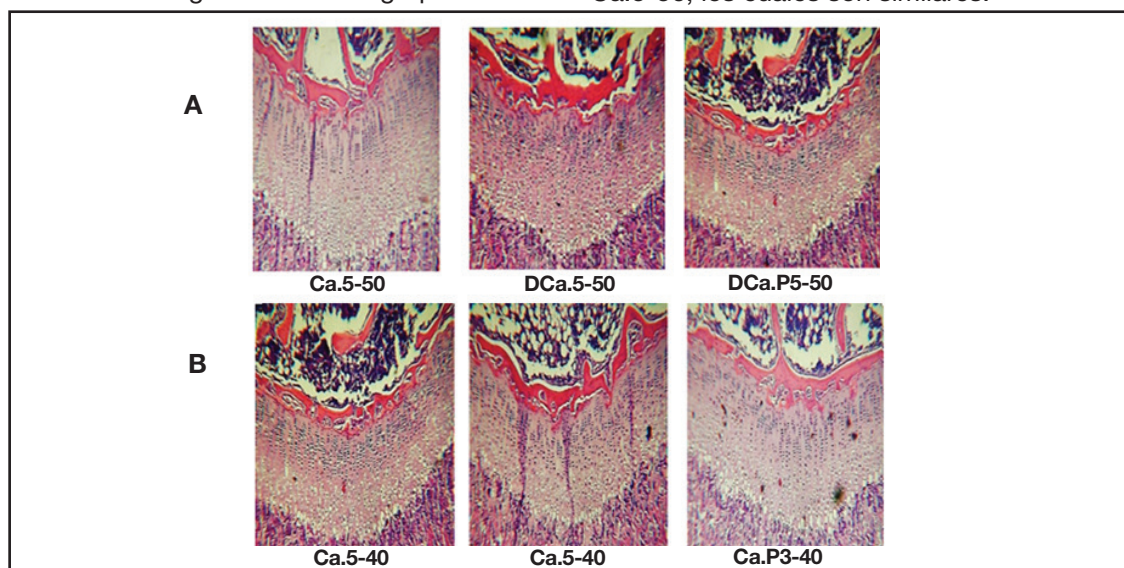
béculas en el grupo Ca.3-40 de crecimiento normal y de DCa.5 de recuperación nutricional; al mismo tiempo se puede observar la similitud entre los grupos Ca.5-40 y Ca.5P y entre DCa.5P y Ca.5-50.



Figuras 2. Histología del tercio medio de tibia proximal sobre hueso decalcificado. La tinción con hematoxilina-eosina muestra las trabéculas en color rojo (aumento x 50). A: Crecimiento normal y B: Recuperación nutricional

En la Figuras 3a y 3b se muestra el corte histológico donde fue evaluada la longitud del cartílago de crecimiento. Dichas figuras muestran la longitud menor del grupo Ca.3-40

respecto de Ca.5-50 y DCa.5-50, los cuales son similares, y al mismo tiempo la menor longitud de DCa.5-50 respecto de DCa.P5-50 y Ca.5-50, los cuales son similares.



Figuras 3. Histología del cartílago de crecimiento en hueso decalcificado. La tinción con hematoxilina-eosina permite distinguir la zona proliferativa de la hipertrófica. (Aumento x 50). A: Crecimiento normal y B: Recuperación nutricional



Pruebas biomecánicas

La Tabla 6 muestra los valores biomecánicos de los grupos estudiados. En ambos tipos de estudio, el consumo de prebióticos no afectó la fuerza de fractura (Ca.3-40 vs. Ca.P3-40 y DCa.5-50 vs. DCa.P5-50, respectivamente). En el caso de crecimiento normal, Ca.3-40 mostró un módulo de elasticidad significativamente menor que Ca.5-40 ($p < 0.01$), mientras que el consumo de prebióticos aumentó dicho parámetro, por lo cual DCa.P5-50 mostró niveles significativamente mayores que Ca.3-40 ($p < 0,01$) y similares a Ca.5-40. En el grupo de desnutridos, DCa.5-50 mostró valores de módulo de elasticidad significativamente menores que Ca.5-50; el consumo de prebióticos aumentó dicho valor respecto de DCa.5-50 ($p < 0,01$) aunque aún presentó valores significativamente menores que Ca.5-50 ($p < 0,05$). Durante el crecimiento normal, Ca.3-40 mostró una rigidez ósea significativamente menor que Ca.5-40 ($p < 0,01$), el consumo de prebióticos aumentó dicho valor respecto de DCa.5 ($p < 0,01$) aunque aun presentó valores significativamente menores que Ca.5-50 ($p < 0,05$). Un efecto similar se observó en el estudio de recuperación nutricional (Tabla 6).

Discusión

Los resultados del presente estudio evidencian que la mezcla de GOS de cadena corta y FOS de cadena larga (GOS/FOS®), en la proporción 9:1, favorece la absorción de Ca, P y Mg y la retención mineral en hueso, beneficiando el desarrollo del cartílago de crecimiento y las propiedades biomecánicas del hueso. Durante el crecimiento normal, el grupo que consumió la mezcla prebiótica en el contexto de la dieta hipocálcica mostró valores de parámetros óseos similares a los observados en el grupo que consumió la dieta recomendada normocálcica (0,5% de Ca), sin el agregado de la mezcla prebiótica. Este hallazgo confirma el efecto benéfico de la mez-

cla de GOS/FOS® utilizada ante el insuficiente aporte nutricional de Ca, condición cada vez más extendida a nivel mundial, independientemente de la edad y el nivel socioeconómico.

El efecto de la mezcla prebiótica también se evidenció durante la recuperación nutricional ya que favoreció la absorción intestinal de Ca y P, sin aumentar el consumo de dichos nutrientes por encima de sus requerimientos nutricionales. Un hallazgo importante durante la recuperación nutricional fue que la mayor parte de los parámetros óseos estudiados aumentaron hasta alcanzar valores similares a aquellos observados en los animales bien nutridos de la misma edad. Por ello se puede concluir que la mezcla prebiótica suministró al hueso una cantidad extra para hacer frente al crecimiento acelerado producto de la recuperación.

Durante el crecimiento normal, todos los animales mostraron una ganancia de peso similar a pesar del diferente aporte de Ca. El consumo de prebióticos no tuvo efecto sobre el peso corporal. Durante la recuperación nutricional, la ganancia de peso fue similar durante el período en el que fueron alimentados con la dieta normocálcica. En este grupo, el consumo de prebióticos tampoco ejerció efecto alguno sobre el peso corporal. Este resultado no es inesperado debido a que las dietas estudiadas eran isocalóricas, y el consumo de alimentos fue similar en los distintos grupos, debido a que la rata consume en términos de requerimientos energéticos.³²

Contrariamente, en los dos estudios realizados, el consumo de prebióticos influyó positivamente la ganancia de longitud corporal, que se encuadraría dentro del efecto beneficioso ejercido sobre el desarrollo del cartílago de crecimiento. Durante el crecimiento normal, los animales que consumieron la mezcla prebiótica y dieta hipocálcica lograron alcanzar el valor observado en aquellos que consumieron la dieta normocálcica, sin prebióticos. Durante la recuperación nutricional, el consumo de la mezcla prebiótica, si bien

ejerció un efecto positivo, no logró recuperar por completo la longitud al compararlos con los animales bien nutridos de la misma edad. Estos resultados no fueron totalmente inesperados ya que, de acuerdo con estudios previos realizados por integrantes del grupo, se debería aumentar el nivel de proteínas para lograrlo en un período de recuperación tan corto como el utilizado en este estudio.³³

Si bien se tenía conocimiento de dicha problemática, no se consideró oportuno introducir una variable adicional al estudio, lo cual enmascararía el efecto que se quería recalcar respecto del efecto de la mezcla prebiótica sobre la salud ósea.

Varios estudios previos determinaron que la mezcla prebiótica utilizada en el presente trabajo experimental se asemeja respecto del tamaño de distribución molecular a la fracción neutra de oligosacáridos de la leche humana.³⁴ También se ha demostrado que la mezcla estimula el crecimiento y la actividad metabólica de *lactobacilos* y *bifidobacterias* en niños prematuros, en aquellos nacidos a término o durante el período de lactancia. Por ello el consumo de la mezcla prebiótica da lugar al mismo patrón de producción de AGCC, los cuales reducen el pH fecal, tal como se ha observado en niños.³⁴⁻³⁶ Sin embargo, la importancia del presente estudio experimental radica en el efecto de la mezcla prebiótica sobre la absorción mineral y la salud ósea durante el crecimiento normal o producto de una recuperación nutricional. Diversos estudios han demostrado el aumento en la absorción de Ca, P y Mg por el consumo de una dieta que contiene FOS u otros tipos prebióticos^{34,37-41} El efecto de estos alimentos funcionales radica en que, si bien la mayor absorción de dichos minerales se produce en el intestino delgado si se mantienen en solución, también es posible su absorción a nivel de colon y ciego. En nuestro estudio se observó que la mezcla prebiótica utilizada incrementó la absorción de Ca, P y Mg en aproximadamente el 12%, en ambos modelos de crecimiento es-

tudiados. Los mecanismos responsables de tal efecto estarían relacionados con el aumento del trofismo del colon y ciego, y con una disminución del pH.⁴² Ambos efectos fueron observados en el presente estudio, en forma directa o indirecta. Por un lado, el peso del ciego mostró un incremento notable al igual que la disminución en el pH cecal respecto de los grupos que no consumieron la mezcla prebiótica. Este último efecto sería producto de la liberación de AGCC que acidifican el medio debido a la fermentación de dichos compuestos por bacterias ácido-resistentes tales como *bifidobacterias* y *lactobacilos*.³⁸ La disminución del pH favorece, por competencia, el crecimiento de bacterias benéficas o probióticos como los *lactobacilos*.⁴¹ El incremento en el desarrollo de tales microorganismos fue confirmado en el presente estudio. Asimismo, el cambio en la actividad bacteriana sugiere una modificación de la flora colónica hacia bacterias benéficas. Si bien no hemos evaluado la producción de AGCC y la proliferación de las células cecales, el aumento en el peso cecal y la disminución en el pH sugieren indirectamente que ambos mecanismos participaron del aumento en la absorción de Ca, P y Mg observado en el presente estudio.

La mayor absorción de estos 3 minerales favoreció la disponibilidad para su utilización en los distintos procesos fisiológicos en que ellos se encuentran involucrados. Respecto del Ca y P, el mayor porcentaje de ambos se encuentra en hueso, por eso se puede hipotetizar que el aumento en la absorción suministró la cantidad extra de ambos minerales, necesaria para incrementar la mayoría de los parámetros óseos asociados a la calidad del hueso.^{17,43}

En este sentido, en ambos modelos experimentales no solo se observó un mayor contenido de ambos minerales en fémur por el consumo de la mezcla prebiótica sino también se evidenció un aumento en la masa ósea del esqueleto total, en la DMO de tibia proximal, en el volumen óseo del tercio medio de la tibia



proximal y ciertos parámetros de la estructura ósea. El consumo de prebióticos no modificó la DMO de columna o de esqueleto total. En el primer caso, si bien la tibia proximal y la columna presentan un mayoritario porcentaje de hueso trabecular, el diferente comportamiento observado en el presente estudio respecto de la densidad ósea se debe a que en cuadrúpedos, y en especial en la rata, la tibia soporta una carga mecánica superior a la columna que añadiría un efecto beneficioso sobre la DMO. Respecto del esqueleto total, se debe recordar que un 80% del esqueleto está constituido por hueso cortical, metabólicamente menos activo que el trabecular. Sin embargo, cierto beneficio pudo observarse en el hueso cortical ya que la mezcla prebiótica introdujo mejoras tanto en las propiedades estructurales como materiales del hueso como la rigidez y mineralización del tejido. Además del mayor aporte de minerales también se debe aclarar que el consumo de prebióticos redujo en ambos modelos experimentales el proceso de resorción evidenciado por los menores niveles séricos observados en el CTX. Esta disminución sería responsable del incremento en la masa ósea y densidad de hueso trabecular, metabólicamente más activo. Por otra parte, además del efecto positivo observado en la retención ósea y en la calidad del hueso formado, la ganancia en el crecimiento corporal observado por el consumo de la mezcla prebiótica en ambos modelos estuvo acompañada por un incremento en la longitud de la tibia y de la zona hipertrófica del cartílago de crecimiento. Este hecho evidencia un efecto beneficioso sobre el crecimiento a pesar del bajo aporte de Ca en el modelo de crecimiento normal y de la detención del crecimiento producida en el modelo de desnutrición proteica. Respecto del Mg, se ha señalado que el Mg soluble en el ciego se encuentra inversamente relacionado con la ingesta de Ca.³³ Asimismo se ha postulado que el Ca podría interactuar con el Mg y disminuir su absorción intestinal.^{16,37} En el presente estudio, la absor-

ción de Mg se vio incrementada por el consumo de la mezcla prebiótica en ambos modelos de crecimiento utilizados. En tal sentido se debe recordar que los oligosacáridos de cadena corta inducen selectivamente la fermentación bifidogénica en el colon proximal, mientras que los de cadena larga, los cuales son fermentados más lentamente, pueden mantener la actividad metabólica de la flora en las partes más distales del colon.³⁸ La mezcla prebiótica utilizada contiene ambos tipos de oligosacáridos, por lo cual la fermentación tendría lugar a lo largo de todo el intestino, favoreciendo simultáneamente la absorción de Ca y Mg. Respecto de la biodisponibilidad del Mg, se debe recordar que es un mineral fundamentalmente intracelular que participa de distintas vías de señalización o como cofactor enzimático en la síntesis de proteínas y de nucleótidos. En el hueso su función radica en inhibir el crecimiento cristalino para mantener el tamaño adecuado de los cristales de hidroxiapatita que asegure el cumplimiento de las funciones biomecánicas. Esto podría explicar el hecho de que, a pesar de una mayor absorción intestinal de Mg, su contenido del mineral a nivel óseo no aumentó significativamente. Sin embargo, se observó un aumento en las funciones biomecánicas del fémur, lo que indirectamente sugiere que su presencia contribuyó a que se produjera una adecuada mineralización del tejido.

Una limitación del presente estudio es que la excreción urinaria no fue evaluada. Este parámetro podría haber clarificado el efecto sobre la reabsorción de Mg y con ello en su biodisponibilidad. Sin embargo, el diseño del presente estudio no incluyó estudios de balance que solo evidenciarían el efecto de la mezcla prebiótica sobre el metabolismo fosfocálcico durante un período de tiempo corto. En cambio, la retención de estos minerales en fémur, las medidas de densidad, histológicas y biomecánicas son más adecuadas para observar el impacto del consumo a largo plazo de la mezcla prebiótica utilizada.

Conclusiones

Bajo nuestras condiciones experimentales es posible concluir que la suplementación de una dieta hipocálcica durante el crecimiento normal o normocálcica durante la recuperación nutricional con la mezcla prebiótica de GOS/FOS® utilizada en el presente estudio incrementa la mineralización, densidad y estructura del hueso debido a un incremento en las absorciones colónicas de Ca, Mg y P. Dicho aumento estuvo relacionado directa o indirectamente con el aumento de la microflora láctica responsable del descenso de pH observado y con el trofismo colónico, lo cual podría mejorar la salud ósea y favoreciendo la adquisición del PMO.

Agradecimientos: se agradece la ayuda brindada por la técnica de laboratorio Julia So-moza y por los técnicos de Bioterio Ricardo Orzuza y Cecilia Mambrin.

Este estudio fue parcialmente financiado por el subsidio PIP-CONICET 0004 con el apoyo de la Universidad de Buenos Aires y ® N.V.Nutricia.

Conflicto de interés: los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: febrero 2015.
Aceptado: marzo 2015)

Referencias

1. Zhu K, Prince RL. Calcium and bone. *Clin Biochem* 2012; 45:936-42.
2. Schettler AE, Gustafson EM. Osteoporosis prevention starts in adolescence. *J Am Acad Nurse Pract*. 2004; 16:274-82.
3. Forshee RA, Anderson PA, Storey ML. Changes in calcium intake and association with beverage consumption and demographics: comparing data from CSFII 1994-1996, 1998 and NHANES 1999-2002. *J Am Coll Nutr* 2006; 25:108-16.
4. Greer FR, Krebs NF. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. Optimizing bone health and calcium intakes of infants, children, and adolescents. *Pediatrics* 2006; 117:578-85.
5. Bailey RL, Dodd KW, Goldman JA, et al. Estimation of total usual calcium and vitamin D intakes in the United States. *J Nutr* 2010; 140: 817-22.
6. Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS). La alimentación de los niños menores de 2 años. Ministerio de Salud, ENNyS; 2000-2009. <http://www.msal.gov.ar>
7. Kogan L, Abeya Gilardón E, Mangiolavori G, Bilibieri A, Zeni SN. Calcium intake and its relationship to overweight and obesity. Data obtained from the National Survey of Nutrition and Health (ENNyS). *Bone* 2009; 45:S150 [Abstract].
8. Bonjour JP, Ammann P, Chevalley T, Rizzoli R. Protein intake and bone growth. *Can J Appl Physiol* 2001; 26 Suppl 1:S153-66.
9. Bonjour JP. Protein intake and bone health. *Int J Vitam Nutr Res* 2011; 81:134-42.
10. Reichling TD, German RZ. Bones, muscles and visceral organs of protein-malnourished rats (*Rattus norvegicus*) grow more slowly but for longer durations to reach normal final size. *J Nutr* 2000; 130:2326-32.
11. Farnum C, Lee A, O'Hara K, Wilsman N. Effect of short-term fasting on bone elongation rates: an analysis of catch-up growth in young male rats. *Pediatr Res* 2003; 53:33-41.
12. Younes H, Demigné C, Rémésy C. Acidic fermentation in the caecum increases absorption



- of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. *Br J Nutr* 1996; 75:301-14.
13. Lidestri M, Agosti M, Marini A, Boehm G. Oligosaccharides might stimulate calcium absorption in formula-fed preterm infants. *Acta Paediatr Suppl* 2003; 92:91-2.
 14. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125:1401-12.
 15. Flint HJ. Prokaryote diversity in the human GI tract. In: Logan N, Lappin-Scott H, Oyston P (eds). *Prokaryotic Diversity: Mechanisms and Significance*. Society for General Microbiology Symposium no. 66, Warwick April 2006, pp. 65-90: Cambridge: Cambridge University Press.
 16. Cummings JH, Macfarlane GT. Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br J Nutr* 2002; 87:S145-51.
 17. Pérez-Conesa D, López G, Ros G. Effects of probiotic, prebiotic and symbiotic follow-up infant formulas on large intestine morphology and bone mineralization in rats. *J Sci Food Agric* 2007; 87:1059-68.
 18. Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM, et al. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:471-6.
 19. Macfarlane GT, Macfarlane S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45:S120-7.
 20. Romeo J, Nova E, Wärnberg J, Gómez-Martínez S, Díaz Ligia LE, Marcos A. Immunomodulatory effect of fibres, probiotics and synbiotics in different life-stages. *Nutr Hosp* 2010; 25:341-9.
 21. 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.
 22. Sapp RE, Davidson SD. Microwave digestion of multicomponent foods for sodium analysis by atomic absorption spectrometry. *J Food Sci* 1991; 56:1412-4.
 23. Perkin Elmer Corp. Analytical method for atomic absorption spectrophotometry. Norwalk, CT: Perkin Elmer Corp., 1971.
 24. Gutmann I, Bergmeyer HU. Urea. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press Bergmeyer HU 1974; 1791-4.
 25. Kim DH, Kang HJ, Kim SW, Kobayashi K. pH-inducible beta-glucuronidase and beta-glucosidase of intestinal bacteria. *Chem Pharm Bull* 1992; 40:1967-9.
 26. Kim DH, Lee JH, Bae EA, Han MJ. Induction and inhibition of indole of intestinal bacteria. *Arch Pharm Res* 1995; 18:351-3.
 27. Park SH, Kim YA, Chung MJ, Kang BY, Ha NJ. Inhibition of proliferation by anti-microbial peptide isolated from *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus spp.* in colon cancer cell line (HT-29, SW 480 and Caco-2). *J Environ Toxicol* 2007; 22:65-71.
 28. An HM, Baek EH, Jang S, et al. Efficacy of *Lactic Acid Bacteria* (LAB) supplement in management of constipation among nursing home residents. *Nutr J* 2010; 9:5.
 29. Lee do K, Park SY, Jang S, et al. The combination of mixed lactic acid bacteria and dietary fiber lowers serum cholesterol levels and fecal harmful enzyme activities in rats. *Arch Pharm Res* 2011; 34:23-9.
 30. 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; 39:837-44.
 31. Zeni SN, Gómez-Acotto C, Di Gregorio S, Mautalen C. Differences in bone turnover and skeletal response to thyroid hormone treatment between estrogen-depleted and repleted rats. *Calcif Tissue Int* 2000; 67:173-7.
 32. Coates ME. The influence of the diet of laboratory animals on experimental research in Laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. Rothschild HA, Rosenkranz A, Moura Duarte FA. Ed. ICLAS-CEMIB-FESBE Scientific Meeting. Aguas de Lindoia, SP, Brazil, 1986. p.13-21.

33. Portela ML, Zeni SN, Rio M. Theory about inter-relationship between macromineral nutrient and growth rate during recovery from undernutrition. *Medical Hypothesis* 1985; 18:129-34.
34. Brommage R, Binacua C, Antille S, Carrié AL. Intestinal calcium absorption in rats is stimulated by dietary lactulose and other resistant sugars. *J Nutr* 1993; 123:2186-94.
35. Boehm G, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Marini A. Prebiotic concept for infant nutrition. *Acta Paediatr Suppl* 2003; 91:64-7
36. Fanaro S, Boehm G, Garssen J, et al. Galactooligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: a review. *Acta Paediatr* 2005; 94:22-6.
37. Knol J, Scholtens P, Kafka C, et al. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40:36-42.
38. Moro G, Minoli I, Mosca M, et al. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 34:291-5.
39. Ohta A, Motohashi Y, Ohtsuki M, Hirayama M, Adachi T, Sakuma K. Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin-D9k differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. *J Nutr* 1998; 128:934-9.
40. Younes H, Coudray C, Bellanger J, Demigné C, Rayssiguier Y, Rémésy C. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br J Nutr* 2001; 86:479-85.
41. Kruger MC, Brown KE, Collett G, Layton L, Schollum LM. The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228:683-8.
42. Weaver CM, Martin BR, Nakatsu CH, et al. Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut fermentation. *J Agric Food Chem* 2011; 59:6501-10.
43. Lavanda I, Isay Saad SM, Lobo A, Colli C. Prebióticos y su efecto en la biodisponibilidad del calcio. *Rev Nutr* 2011; 24:333-44.