

ARTÍCULOS ORIGINALES / *Originals*

EFECTO DE UNA MEZCLA DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS (GOS) / FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS (FOS) SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL Y RETENCIÓN ÓSEA DE CALCIO, FÓSFORO Y MAGNESIO: MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS DURANTE EL CRECIMIENTO NORMAL

Gabriel Bryk,^{1,2*} Magalí Zeni Coronel,² Daniela Medina,² Gretel Pellegrini,^{1,2} María Luz Pita Martín de Portela,³ 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 Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Resumen

Según las últimas encuestas nutricionales, la ingesta de calcio (Ca) está por debajo de las recomendaciones diarias internacionales. El aumento en la absorción y biodisponibilidad sería una estrategia ante la baja ingesta para prevenir efectos negativos sobre la masa ósea. Los galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS) favorecen la absorción activa y pasiva de Ca. Objetivo: evaluar el efecto de GOS/FOS®, sobre la absorción y retención de Ca, magnesio (Mg) y fósforo (P) en un modelo experimental de ratas normales en crecimiento. Métodos: al destete, ratas machos Wistar recibieron: AIN93-G (A) o las siguientes fórmulas lácteas: Nutrilon (N), Vital (V) y Nutrilon Sin Lactosa (NSL) hasta los 40 días. N y NSL contienen 5,3% de GOS/FOS®, y V contiene los mismos nutrientes que N sin la mezcla prebiótica. Se evaluaron consumo

de alimentos, absorción de Ca, Mg y P (mg/d y %) y desarrollo de lactobacilos; tras el sacrificio se midieron pH cecal, contenido mineral en fémur (CMF), biomecánica ósea y parámetros densitométricos (Lunar DXA). Resultados: el desarrollo de lactobacilos aumentó y el pH cecal disminuyó en los grupos N y NSL respecto de A y V ($p < 0,0001$). La absorción de Ca, Mg y P aumentó significativamente ($p < 0,05$) al igual que el CMF ($p < 0,05$), los parámetros densitométricos ($p < 0,01$) y biomecánicos ($p < 0,05$). Conclusión: la mezcla GOS/FOS® utilizada favoreció la absorción de Ca, Mg y P, lo que indujo una mayor retención de mineral en hueso; esto asegura su efecto para suministrar una cantidad extra de Ca para favorecer la salud ósea.

Palabras clave: calcio, fósforo, magnesio, galactooligosacáridos (GOS)/fructooligosacáridos (FOS), absorción, retención ósea.

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



Summary

EFFECT OF A MIXTURE OF GALACTOOLIGOSACCHARIDES (GOS) / FRUCTOOLIGOSACCHARIDES (FOS) ON THE INTESTINAL ABSORPTION AND BONE RETENTION OF CALCIUM, PHOSPHORUS AND MAGNESIUM: EXPERIMENTAL MODEL IN RATS DURING NORMAL GROWTH

Calcium requirements are generally not covered regardless of age and socioeconomic status. Increase Ca intake would be adequate to prevent deficiency; however, if it is not possible, to increase intestinal absorption would be an useful tool to obtain an extra-supply of mineral. Colonic flora fermentation of galactooligosaccharides (GOS) and fructooligosaccharides (FOS) enhances active and passive Ca absorption. Objective: to evaluate GOS/FOS® effect on Ca, Mg and P absorption and retention in an experimental growing rat model. Methods: At weaning, Wistar male rats (n = 8) received AIN93-G (A), Vital, Nutrilon or Nutrilon Lactose Free (N, V and NSL respectively) formula milks until 40 days of life. NSL and N supplies 5.3% of GOS / FOS® while A and V does not. Food consumption, Ca, Mg and P absorption, and lactobacilli development in fresh feces was evaluated weekly; caecum pH, femur mineral content and biomechanical, total skeleton mineral and subareas of bone mineral content and density (BMC, BMD) (Lunar DXA) were measured after sacrifice. Results: No significant differences in caloric terms of food consumption were found among groups. N and NSL increased lactobacilli development ($p < 0.0001$); reduced caecum pH ($p < 0.0001$); increased Ca, Mg and P absorptions ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.0005$, respectively); femur mineral content ($p < 0.05$); total skeleton BMC and tibia BMD ($p < 0.01$) and biomechanical parameters ($p < 0.05$) vs. A and V.

Conclusion: The mixture GOS / FOS® supplied an extra amount of bone minerals that benefited bone acquisition.

Key words: *calcium, phosphorous, magnesium, galactooligosaccharides (GOS)/fructooligosaccharides (FOS), absorption, bone retention.*

Introducción

El mantenimiento de la homeostasis del calcio (Ca) es vital para maximizar el pico de masa ósea que se alcanza al final del crecimiento y, más adelante, limitar la pérdida que normalmente ocurre en la edad adulta.¹ La hipocalcemia induce la secreción de la hormona paratiroidea (PTH), que aumenta la resorción ósea para normalizar los valores de Ca en sangre. Este efecto, con el tiempo, se traduce en una pérdida de masa ósea que afectará negativamente la salud del hueso.²

La leche y sus derivados constituyen la mayor fuente de Ca; sin embargo, existe una tendencia en la juventud a reemplazar este tipo de alimentos por otros deficientes en Ca introduciendo un factor de riesgo para la pérdida de masa ósea a largo plazo.³ En este contexto, el comité de nutrición de Estados Unidos concluyó que la ingesta de calcio (ICa) cae del 80 al 50% en niños entre 1-5 años.⁴ Este hecho se traduce en la existencia de un alto porcentaje de la población mundial, incluidos los niños, que no cubren su recomendación diaria, a pesar de la importancia de una óptima ICa.⁵ Según la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS) realizada en la Argentina durante 2004-2006, la insuficiencia en la ICa alcanzó un 16-21% en niños y se eleva aún más en mujeres en edad fértil.^{6,7}

El incremento de la ICa sería lo más eficaz para prevenir su deficiencia/insuficiencia nutricional. Si ello no es posible, el aumento en la absorción intestinal se convertiría en una estrategia sencilla para aumentar la biodisponibilidad de dicho mineral. En este sentido, se debe recordar que la mayor parte de la absorción de Ca se produce en el intestino delgado, aunque alrededor del 10% podría ocurrir en el colon.⁸

Los oligosacáridos no digeribles (OND) constituyen la principal fuente de glúcidos después de la lactosa en la leche materna.⁹ Los OND con función prebiótica tienen la propiedad de actuar benéficamente en el colon del huésped estimulando el crecimiento y/o la actividad de un número selectivo de bacterias sacarolíticas que generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y gases.¹⁰ La liberación de AGCC desciende el pH y aumenta la solubilidad de diferentes sales de Ca y con ello su absorción.¹¹ Por otra parte, uno de los AGCC, 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.^{12,13} Este incremento en la absorción colónica aumentaría la cantidad disponible de mineral que podría ser depositado en hueso si una cantidad adicional de P también fuera absorbida, con lo cual se mejoraría la adquisición de masa ósea en los niños y se evitaría la pérdida en la edad adulta.^{14,15}

Sobre estas bases se estudió el efecto de una mezcla de GOS/FOS®, actualmente utilizada en fórmulas lácteas, sobre la absorción intestinal y la retención ósea de Ca, P y Mg en un modelo experimental de ratas en crecimiento.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos al destete (~21 días de edad), con un peso comprendido entre 33-37 g, pertenecientes al bioterio de la Cátedra de Nutrición de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Los animales fueron mantenidos de acuerdo con las normas de la Guía de Salud de 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 (Res. CS 4081/04).

Las ratas fueron colocadas en jaulas de acero inoxidable respetando los ciclos de

luz-oscuridad de 12 horas, con temperatura controlada en 21 ± 2 °C y 55% de humedad relativa. Tanto el alimento como el agua fueron administrados *ad libitum*. Al finalizar la experiencia, los animales fueron sacrificados por punción cardíaca, previa anestesia con solución de clorhidrato de ketamina (50 mg/ml) (Holliday-Scott SA, Argentina) inyectada vía intraperitoneal (IP) 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

Un total de 32 ratas (8 por grupo) recibieron desde el destete hasta los 40 días de edad una de las 4 dietas experimentales ensayadas (Tabla 1): la dieta control (A) fue preparada de acuerdo con las recomendaciones del American Institute of Nutrition (AIN93'G) del año 1993.¹⁶ Dicha dieta satisface los requerimientos nutricionales de los animales durante el crecimiento. Las otras 3 dietas fueron fórmulas lácteas comerciales en polvo: Nutrilon, Vital y Nutrilon Sin Lactosa (N, V y NSL, respectivamente) (Nutricia-Bagó, SA). Estas dietas lácteas fueron adicionadas con minerales, vitaminas y proteínas hasta alcanzar los valores recomendados por AIN93'G. Las leches N y NSL contienen 5,3% de una mezcla de GOS/FOS®, mientras que la leche V contiene los mismos nutrientes que N sin la mezcla prebiótica. Mientras que N y V contienen ~50% de lactosa, las dietas A y NSL están libres de esta.

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 (T=0) como al finalizar el estudio (Tf=40). Para ello, los animales fueron colo-



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

DIETA	A	V	N	NSL
Energía (Kcal)	400	474	462	462
Proteína (g)	17,8	17,8	17,8	17,8
Lípidos (g)	7	23	23	23
Mezcla de sales (g)	4		De acuerdo a AIN93'G	
Vitaminas* (g)	1		De acuerdo a AIN93'G	
Colina (g)	0,1		De acuerdo a AIN93'G	
Cisteína (g)	0,37		De acuerdo a AIN93'G	
Celulosa (g)	5	5	5	5
GOS/FOS®	0	0	5,3	5,3
Dextrina **		hasta completar 100g		

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

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

cados 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 (AP) total (mg/d) y la AP como porcentaje de la ingesta (%A) de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

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

$$2) \quad \% AP = \frac{I - F}{I} \times 100$$

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

Las heces y dieta fueron digeridas con HNO₃ concentrado en microondas usando bombas Parr para la determinación de Ca, Mg y P.¹⁷

El Ca se determinó mediante absorción atómica empleando cloruro de lantano (concentración de 6500 ppm) como supresor de interferencias.¹⁸

El P y Mg se determinaron por colorimetría

utilizando los métodos habituales de laboratorio y un autoanalizador (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

Pruebas microbiológicas y pH

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

blancogrisáceo, lisas o rugosas. El recuento total de colonias por placa se informó como unidad formadora de colonias (UFC) y se expresó como \log_{10} 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 pHmetro calibrado (Adwa AD110, Hungría) en la luz cecal.

Determinaciones bioquímicas y biomecánicas en fémur

El fémur izquierdo fue removido luego del sacrificio; se limpió de todo resto muscular y se secó 72 horas a 100 °C. Se desengrasó con una mezcla de cloroformo-metanol (3:1), se secó y se evaluaron el peso y la longitud con una balanza analítica y con un Vernier, respectivamente. Los fémures así tratados se mineralizaron con una mezcla ácida de HCl-HNO₃ (1:1) hasta su completa disolución. Esta solución fue utilizada para evaluar Ca, Mg y P por los mismos métodos descriptos previamente.

El fémur derecho limpio de todo resto muscular se utilizó para 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.

Densitometría ósea

Previo al sacrificio se determinaron "in vivo" el contenido y la densidad mineral ósea (CMO y DMO, respectivamente) del esqueleto total (et) 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).¹⁹ 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 fue de 0,9% para DMO de esqueleto total y el 3,0% para CMO. El análisis de las diferentes subáreas se realizó utilizando la imagen del animal visualizado en la pantalla de la computadora mediante operación manual delimitando una ventana específica (ROI) para cada segmento. El CV para DMO de columna lumbar (CL) fue de 1,8% y para tibia proximal (TP) fue de 3,5%. Todos los análisis fueron realizados por el mismo observador con el fin de reducir al mínimo la variación interobservador.²⁰

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 normales fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y aquellos que no presentaron distribución normal (desarrollo de lactobacilos) mediante el test de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Cuando se constató diferencia entre los distintos grupos se aplicó *a posteriori* el test de Bonferroni para determinar entre cuáles de los grupos se encontraban diferencias significativas. El cálculo estadístico de la absorción mineral por evaluarse solo dos grupos fue realizado mediante el test de Student. Los análisis se realizaron utilizando el programa SPSS 19.0 para Windows (SPSS, Inc. Chicago, IL). Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados

Parámetros zoométricos

El grupo A (control) tuvo un promedio de consumo de alimentos (g/d) significativamente mayor que el resto de los grupos ($p < 0,05$) (Tabla 2); sin embargo, cuando se calculó la ingesta diaria en Kcal, no existieron diferen-



cias significativas entre los grupos. El PC no mostró diferencias significativas entre los 4 grupos ni al inicio ni al final de la experiencia (Tabla 2).

Desarrollo de lactobacilos, pH y peso cecal

Al comienzo de la experiencia, todos los grupos presentaron similar desarrollo de lactobacilos. 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 en comparación con los que recibieron dietas libres de prebióticos (Figura 1).

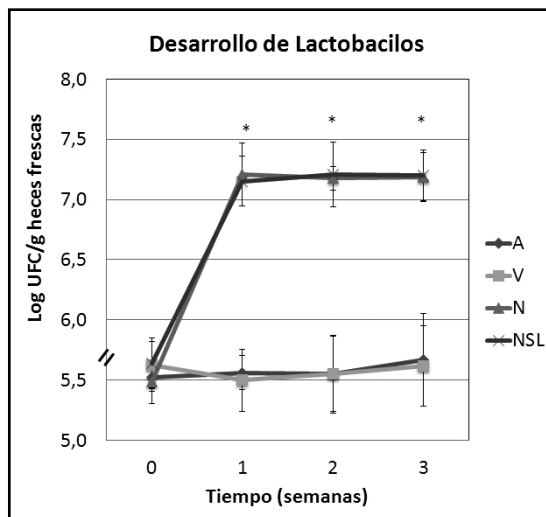


Figura 1. Efecto de la mezcla GOS/FOS sobre el desarrollo de lactobacilos (media \pm DE). * $p < 0,0001$ entre N-NSL vs A-V. Datos analizados mediante Kruskal Wallis y test "a posteriori" de Bonferroni.

El pH cecal fue significativamente inferior ($p < 0,0001$) en los grupos V, N y NSL respecto de A. La menor acidez cecal se observó en el grupo N ($p < 0,05$), mientras que los grupos V y NSL presentaron similar pH (Tabla 2).

Los grupos que consumieron la fórmula láctea que contenía lactosa (V y N) presentaron en ciego distintas zonas con gases, lo que imposibilitó su correcta pesada (Figura 2). El

peso cecal de NSL fue significativamente superior al de A ($p < 0,0001$).

Absorción aparente

Luego del consumo de dieta y durante 4 días, las ratas pertenecientes a los grupos V y N presentaron signos de diarrea. El motivo se atribuyó al elevado contenido de lactosa (~50%) varias veces superior al umbral de tolerancia de la rata (~12%). Este hecho obligó a realizar la comparación en la absorción sólo entre los 2 grupos libres de lactosa (A y NSL).

Al comienzo de la experiencia no existieron diferencias importantes en la ingesta, excreción y absorción aparente de Ca, Mg y P (datos no mostrados).

Al finalizar la experiencia, el grupo NSL presentó un valor significativamente inferior en la excreción de Ca, Mg y P respecto del grupo A ($p < 0,01$) (Tabla 3). Esto condujo a que el grupo NSL presentara, respecto del grupo A, valores significativamente superiores tanto de absorción aparente de Ca, Mg y P (mg/dL) ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,0005$, respectivamente) como porcentual ($p < 0,0005$; $p < 0,05$ y $p < 0,0001$, respectivamente) (Figura 3; Tabla 3).

Contenido mineral en fémur y parámetros densitométricos

Los grupos N y NSL presentaron valores significativamente superiores de Ca y P en fémur respecto de los grupos A y V ($p < 0,05$); asimismo, V presentó un valor significativamente mayor que A ($p < 0,05$). Sin embargo, el contenido de Mg fue similar en todos los grupos estudiados (Tabla 4).

El CMO fue significativamente menor en el grupo A respecto de los otros 3 grupos estudiados ($p < 0,005$). Asimismo, se observó que el grupo NSL presentó el valor significativamente más alto y el grupo A el valor significativamente más bajo en la DMO de esqueleto total ($p < 0,05$). La DMO de tibia proximal fue significativamente mayor en los grupos N y NSL respecto de A y V ($p < 0,01$) aunque sin

Tabla 2. Consumo, peso corporal y pH cecal (media \pm DE). Letras diferentes determinan una diferencia significativa entre grupos $p < 0,05$; * $p < 0,0001$ NSL respecto de A.

	A	V	N	NSL
Consumo diario (g/d)	12,9 \pm 1,1a	9,5 \pm 0,4b	9,5 \pm 0,6b	10,1 \pm 0,5b
Consumo diario (Kcal)	51,6 \pm 4,1	46,6 \pm 4,6	44,1 \pm 4,6	44,8 \pm 4,8
Peso inicial (g)	44,0 \pm 3,9	46,0 \pm 7,5	44,9 \pm 6,1	41,7 \pm 3,7
Peso final (g)	132,3 \pm 16,3	123,6 \pm 14,6	122,4 \pm 12,1	127,5 \pm 11,0
pH cecal	7,1 \pm 0,2a	6,6 \pm 0,3b	5,7 \pm 0,1c	6,5 \pm 0,2b
Peso cecal (g)	1,51 \pm 0,17			2,26 \pm 0,19*

Datos analizados mediante el test de Bonferroni luego de aplicar ANOVA.

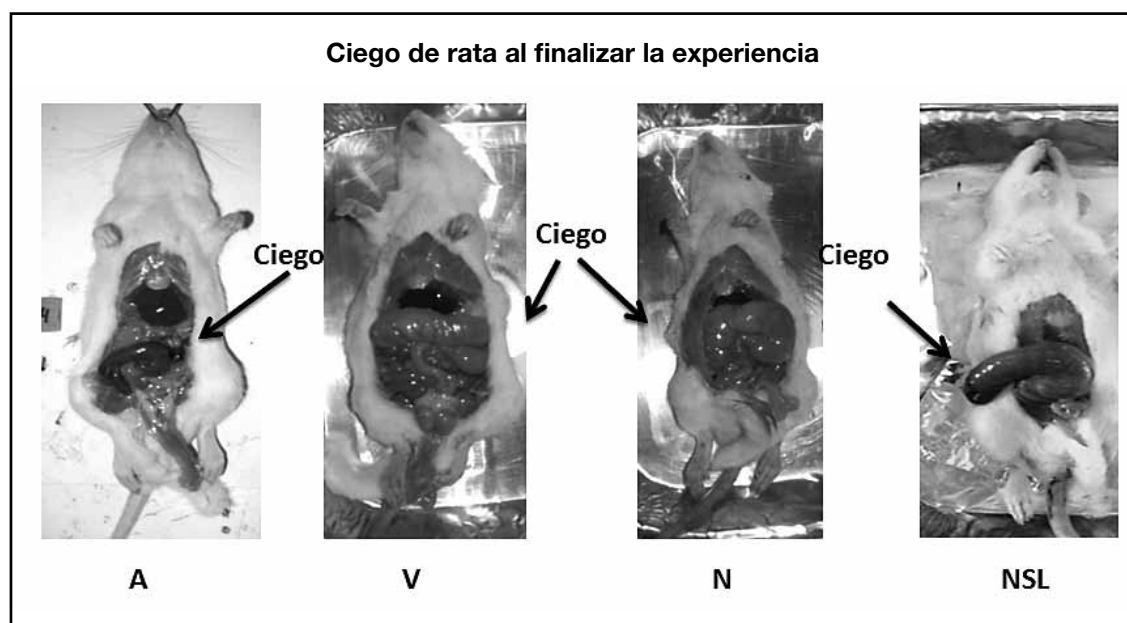


Figura 2. Aspecto de los ciegos al finalizar la experiencia (Tf=40).

diferencia entre ellos. La DMO de columna no mostró diferencias entre los distintos grupos (Tabla 4).

Pruebas biomecánicas

La Tabla 4 muestra los valores biomecánicos de los grupos estudiados. La fuerza máxima de fractura, el módulo de elasticidad y la

rigidez ósea fueron significativamente mayores en los grupos N y NSL respecto de A y V ($p < 0,05$), sin diferencias entre ellos.

Discusión

Los resultados del presente estudio confirman el efecto positivo del consumo de OND con características prebióticas sobre la absor-



Tabla 3. Absorción aparente de Ca, Mg y P en tiempo inicial y final de los grupos estudiados (media \pm DE).

	Tiempo Final		
	A	NSL	p
Consumo de dieta (g/d)	17,1 \pm 3,0	16,9 \pm 0,6	ns
Ingesta de Ca (mg/d)	85,5 \pm 7,1	84,6 \pm 2,9	ns
Ca en heces (mg/d)	18,8 \pm 4,7	9,4 \pm 1,9	0,0075
Absorción aparente de Ca (mg/d)	66,7 \pm 3,9	75,2 \pm 3,4	0,0326
Ingesta de Mg (mg/d)	8,7 \pm 1,5	8,6 \pm 0,3	ns
Mg en heces (mg/d)	3,5 \pm 0,4	2,6 \pm 0,5	0,0407
Absorción aparente de Mg (mg/d)	5,1 \pm 0,5	6,1 \pm 0,2	0,0077
Ingesta de P (mg/d)	51,3 \pm 8,9	50,8 \pm 1,7	ns
P en heces (mg/d)	10,6 \pm 1,6	4,3 \pm 1,0	0,0005
Absorción aparente de P (mg/d)	40,6 \pm 2,7	46,5 \pm 2,1	0,01

Datos analizados con la prueba t de Student. ns: no significativo

Tabla 4. Contenido mineral en fémur, parámetros densitométricos y parámetros biomecánicos (media \pm DE). Letras diferentes determinan una diferencia significativa entre grupos $p < 0,05$.

	A	V	N	NSL
Contenido mineral en fémur				
Contenido de Ca (mg/g)	117 \pm 2,6c	133,1 \pm 2,2b	152,4 \pm 2,3a	147,7 \pm 2,5a
Contenido de Mg (mg/g)	1,35 \pm 0,05	1,40 \pm 0,02	1,39 \pm 0,05	1,40 \pm 0,07
Contenido de P (mg/g)	70,0 \pm 1,1c	78,1 \pm 1,3b	85,7 \pm 2,3a	83,3 \pm 2,1a
Parámetros densitométricos				
CMO/PC Esqueleto Total (g/100g PC)	2,00 \pm 0,21b	2,27 \pm 0,30a	2,25 \pm 0,11a	2,27 \pm 0,25a
DMO de Columna (mg/cm ²)	185 \pm 5	179 \pm 2	177 \pm 12	181 \pm 7
DMO de Tibia proximal (mg/cm ²)	172 \pm 5b	169 \pm 11b	188 \pm 12a	185 \pm 22a
Parámetros biomecánicos				
Fuerza máxima de fractura (N)	46,4 \pm 2,6b	42,6 \pm 4,2b	56,1 \pm 1,2a	59,2 \pm 2,2a
Rigidez ósea (N/mm)	109 \pm 10b	105 \pm 2,9b	148 \pm 13a	141,7 \pm 14a
Módulo de elasticidad	662 \pm 118b	721 \pm 196b	1185 \pm 211a	1131 \pm 95a

Datos analizados mediante el test de Bonferroni luego de aplicar ANOVA.

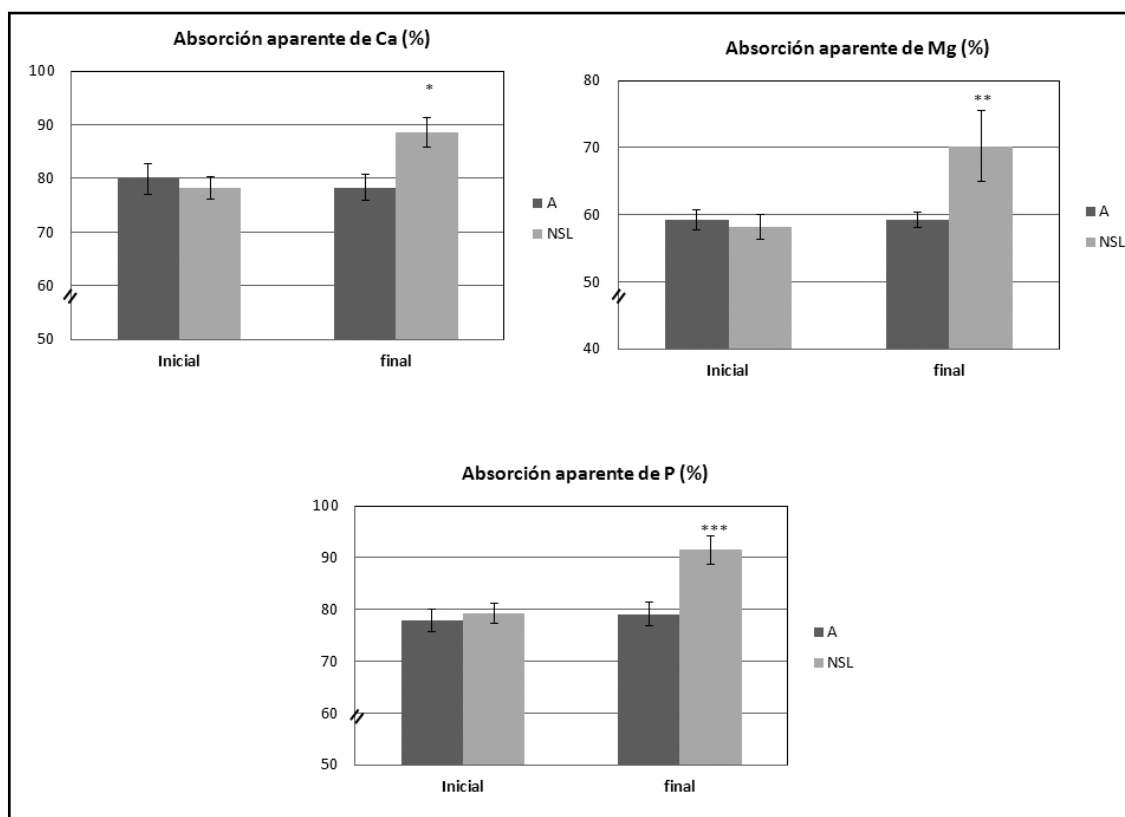


Figura 3. Absorción aparente porcentual al finalizar la experiencia (Tf=40) (media \pm DE).

* $p < 0,0005$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$. Datos analizados mediante test de Student.

ción de Ca, P y Mg. Por otra parte, esa mayor absorción se tradujo en una mayor biodisponibilidad mineral que mejoró no solo la retención de Ca en hueso sino las propiedades biomecánicas del tejido.

Si bien el consumo diario expresado en gramos fue diferente entre AIN93 y las 3 fórmulas lácteas empleadas, cuando se expresó el consumo en términos calóricos no existieron diferencias entre ellas. Este resultado es consecuencia de que la rata consume en términos de requerimientos energéticos.^{21,22} Un inconveniente que se presentó en el estudio fue el elevado porcentaje de lactosa en las leches V y N, que indujo diarrea osmótica. A pesar de ello, el peso corporal alcanzado

al final del estudio fue similar en los 4 grupos estudiados.

La mayor absorción de Ca, P y Mg se produce en el intestino delgado pero, si estos minerales se mantienen en solución, también es posible su absorción a nivel de colon y ciego. Diversos estudios han demostrado el aumento en la absorción de Ca, P y Mg por el consumo de una dieta que contenía prebióticos.²³⁻²⁸

Los OND favorecen la solubilidad de las sales de Ca, P y Mg al inducir la producción de AGCC que acidifican el medio debido a la fermentación de dichos compuestos por bacterias acidorresistentes tales como bifidobacterias y lactobacilos.²⁹ En el presente estudio, la acidificación del medio por el consumo de



GOS/FOS® se evidenció a través de la reducción del pH cecal observado en los grupos que consumieron las fórmulas lácteas con prebióticos. Esta disminución favorece, por competencia, el crecimiento de bacterias benéficas o probióticos como los lactobacilos, cuyo mayor desarrollo fue confirmado en el presente estudio.³⁰ El menor pH colónico se observó a través del consumo de la dieta que aportaba lactosa y GOS/FOS®, ambos con características prebióticas; mientras que una menor disminución en el pH, aunque significativa, fue observada en los grupos NSL y V, los cuales sólo aportan uno de aquellos dos componentes prebióticos. Sin embargo, la lactosa no indujo aumento en el número de lactobacilos, posiblemente por la diarrea osmótica.

En el presente estudio se demostró una clara asociación entre el incremento de lactobacilos y el aumento en la absorción Ca, Mg y P por el consumo de GOS/FOS®. El aumento que se produjo en la absorción de estos 3 minerales favoreció la disponibilidad para su utilización en los distintos procesos fisiológicos en los que ellos se encuentran involucrados. Respecto del Ca y P, como el mayor porcentaje de estos compuestos se encuentra en hueso, es lógico suponer un aumento en los depósitos en tejido óseo. En el presente estudio se evidenció el aumento en la retención de Ca y P. Asimismo, si bien no pudo evaluarse la absorción en los grupos N y V, la cantidad de Ca y P depositado en fémur por el consumo de estas dietas aumentó sugiriendo también en estas dos dietas un aumento en la biodisponibilidad por la presencia de GOS/FOS® + lactosa o de lactosa, respectivamente. Respecto del Mg se debe recordar que es un mineral fundamentalmente intracelular que actúa en distintas vías de señalización o como cofactor enzimático en la síntesis de proteínas y de nucleótidos. En 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. Este hecho podría explicar que, a pesar de una mayor absorción intestinal de Mg, el 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.

Varios estudios han demostrado un aumento en la CMO por el consumo de diferentes prebióticos.^{14,31} En concordancia con estos estudios, el aumento que se observó en el contenido de Ca y P femoral se tradujo en un mayor depósito de hueso en todo el tejido, lo cual se evidenció por una mayor masa ósea a nivel del esqueleto total. El consumo de prebióticos favoreció asimismo el aumento de la DMO a nivel tibia proximal, sin efecto a nivel de columna. Si bien ambos tipos de hueso presentan un mayoritario porcentaje de hueso trabecular, el diferente comportamiento respecto de la densidad ósea se debe a que en los cuadrúpedos, y en especial en la rata, la tibia soporta una carga mecánica superior a la columna. Por otra parte el hueso cortical también se vio beneficiado al observarse una mayor resistencia a las fracturas con mejoras tanto en las propiedades estructurales como materiales del hueso y con ello en la rigidez y mineralización del tejido.

Conclusiones

La mezcla de GOS/FOS® indujo un aumento en la absorción colónica de Ca, Mg y P y una mejora en los parámetros óseos de los animales normales en crecimiento. Dicho aumento estuvo relacionado directa o indirectamente con el aumento de la microflora láctica responsable del descenso de pH observado. Estos resultados podrían ser extrapolados al ser humano, por lo cual la adición de una mezcla de dichos componentes a fórmulas infantiles es útil para mejorar la biodisponibilidad de minerales que afectan la salud en general y la ósea en particular.

Agradecimientos

Se agradece la ayuda brindada por la técnica de laboratorio Julia Somoza 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 Nutricia-Bagó S.A. ® N.V.Nutricia

(Recibido: agosto 2013.
Aceptado: septiembre 2013)

Referencias

1. Schettler AE, Gustafson EM. Osteoporosis prevention starts in adolescence. *J Am Acad Nurse Pract* 2004; 16:274-82.
2. Ondrak KS, Morgan DW. Physical activity, calcium intake and bone health in children and adolescent. *Sports Med* 2007; 37:587-600.
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-Gilardon E, Mangiolavori G, Biblieri 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.
8. Younes H, Demigné C, Réémésy 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.
9. Lidestri, M, Agosti, M, Marini, A, Boehm, G. Oligosaccharides might stimulate calcium absorption in formula-fed preterm infants. *Acta Paediatrica* 2003; 92:91-2.
10. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125:1401-12.
11. 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.
12. Cummings JH, Macfarlane GT. Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br J Nutr* 2002; 87 (Suppl 2):S145-51.
13. 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.
14. 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.



15. Macfarlane GT, Macfarlane S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45 (Suppl):S120-7.
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.
17. Sapp RE, Davidson SD. Microwave digestion of multicomponent foods for sodium analysis by atomic absorption spectrometry. *J Food Sci* 1991; 56:1412-14.
18. Perkin Elmer Corp. Analytical method for atomic absorption spectrophotometry. Perkin Elmer Corp. Norwalk CT, 1971.
19. 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.
20. 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.
21. Collier G, Hirsch E, Kanarek, R. La operante vista de nuevo. En: Honig WK, Staddon JER (eds.). Manual de conducta operante. México: Trillas;1983. pp. 47-78.
22. 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 (eds.). ICLAS-CEMIB-FESBE SCIENTIFIC MEETING. Aguas de Lindoia, SP, Brazil; 1986. pp.13-21.
23. 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(12):2186-94
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Lavanda I, Isay Saad SM, LOBO A, COLLI C. Prebióticos y su efecto en la biodisponibilidad del calcio. *Rev Nutr* 2011; 24:333-4.
29. Pérez-Conesa D, López G, Abellan P, Ros G. Bioavailability of calcium, magnesium and phosphorus in rats fed probiotic, prebiotic and synbiotic powder follow-up infant formulas and their effect on physiological and nutritional parameters. *J Sci Food Agric* 2006; 86:2327-36.
30. 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.
31. Legette LL, Lee W, Martin BR, Story JA, Campbell JK, Weaver CM. Prebiotics enhance magnesium absorption and inulin-based fibers exert chronic effects on calcium utilization in a postmenopausal rodent model. *J Food Sci* 2012; 77:H88-94.