



GMD Facultad Cs. Médicas
Biblioteca

TDM 2686



Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Médicas
Laboratorio de Biología Ósea

**“ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE CALCIO
DE LA DIETA MATERNA EN EL CRECIMIENTO Y CALIDAD
ÓSEA DE LA PROGENIE”**

Villarreal Laureana

Director: Dr. Belizan José

Co-Director: Dra. Lombarte Mercedes

Tesis Doctoral

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS.....	5
RESUMEN.....	7
ABREVIATURAS y SÍMBOLOS	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Tejido Óseo	10
Estructura y función del tejido óseo	10
Clasificación según su organización estructural	11
Clasificación según la morfología del hueso	13
Osteogénesis, modelado y remodelado óseos	15
1.2 Homeostasis del calcio.....	18
El calcio en el organismo	18
Hormonas reguladoras del calcio.....	19
Absorción intestinal de calcio	22
1.3 Homeostasis del calcio materno y de la progeñie	25
Metabolismo mineral durante el embarazo y la lactancia	25
Metabolismo mineral en el desarrollo y en neonatos.....	29
1.4 Suplementación con Ca durante el embarazo.....	30
Importancia de la suplementación con Ca.....	30
Efecto óseo de la suplementación con Ca en las madres	31
Efecto óseo de la suplementación con Ca en la descendencia.....	32
2. PREGUNTA E HIPÓTESIS	34
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo General.....	35
3.2 Objetivos Específicos	35
Objetivo Especifico 1	35
Objetivo Especifico 2	35
Objetivo Especifico 3	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1 Diseño experimental.....	36
4.2 Descripción de los procedimientos y de las técnicas realizadas	37

Animales y dietas	37
Obtención de muestras	39
Captación intestinal de Ca.....	39
Resistencia ósea	41
Dimensiones óseas macroscópicas	44
Densidad mineral ósea	46
Histomorfometría y conectividad del tejido trabecular	47
Parámetros bioquímicos	49
Análisis estadísticos de los resultados	49
5. RESULTADOS	51
5.1 Objetivo Específico 1.....	51
Resistencia ósea de fémures y vertebras (G1).....	51
Análisis morfométricos de fémures (G1)	52
Evaluación de la DMO en tibias y vertebras (G1).....	52
Histomorfometría y conectividad del tejido trabecular en tibias (G1).....	54
Evaluación de la absorción intestinal de Ca (G1)	55
Evaluación de parámetros relacionados al metabolismo fosfocálcico (G1)	56
5.2 Objetivo Específico 2.....	57
Resistencia ósea de los fémures y las hemimandíbulas (G2)	57
Evaluación de la DMO en las tibias (G2)	58
Histomorfometría y conectividad del tejido trabecular en tibias (G2).....	59
5.3 Objetivo Específico 3.....	60
Peso corporal de las crías (G2)	60
Análisis morfométricos de fémures y hemimandíbulas (G2).....	61
Evaluación de parámetros relacionados al metabolismo fosfocálcico (G2)	62
6. DISCUSIÓN	64
7. CONCLUSION	72
ANEXO.....	73
Análisis del contenido de Ca en el alimento.....	73
Balances de consumo de alimentos y líquidos (G1)	73
Histomorfometría dinámica.....	74

PRODUCCIÓN.....	77
BIBLIOGRAFÍA	79

AGRADECIMIENTOS

Hace poco leí este texto: *“Se que la libertad es un sueño imposible, porque todo no se puede y porque llegamos a este mundo marcados por un deseo que otros, generalmente nuestros padres, han puesto sobre nosotros. Nacemos en un hogar determinado y al llegar nos están esperando una familia, un nombre y un mundo que no hemos elegido. Aun así, debemos enfrentar la vida con las fichas que nos han tocado. Sin embargo, tenemos un mínimo de decisión para hacer con ellas una buena o una mala partida, ése es el margen de libertad con el que contamos. Parece poco, pero por pequeño que sea, alcanza para darnos la oportunidad de construir una vida que tenga algún sentido”.*

Si bien las fichas que me tocaron no fueron siempre las mejores, tuve la suerte de llegar a una familia que me permitió y ayudó a seguir mis sueños. También tuve la suerte de elegir y que me elijan amigos incondicionales. Por eso les agradezco infinitamente a todos ellos:

A mi Mamá, mi Papá y mis hermanas Ale y Yani que son, sin dudas, la mejor familia que alguien podría siquiera imaginarse tener, ahora con un nuevo integrante, Beni, que sin todavía saber lo que significa para nosotros es el ser más importante del mundo. A mi abuela, porque como le dije una vez, junto al abuelo formaron una familia maravillosa, una familia que sin importar las decisiones que cada uno tome, siempre estamos para el otro, sin peros ni porqués y en eso incluyo a mis cuñados Dami y Meli, a Pri, Maru y Fer; a Rosi y Mirto.

A mis “amigas de Casilda” Juli, Vicki, Eli y Lauri, ese sobrenombre que les tuve que poner porque hablo tanto de ustedes que quiero que siempre se sepa que, aunque me mudé hace varios años sigo perteneciendo a ese lugar gracias a que ustedes siguen formando parte de mi vida y me permiten seguir siendo parte de las suyas, como si no me hubiera ido nunca.

A esos seres casildenses, Ri, Ari y Lu que se fueron como yo a la “gran ciudad” para estudiar, compartimos años de cotidianidad rosarina y ahora siguen volando por el mundo, fueron, son y serán un gran sostén en mi vida.

A mis amigas facultativas, Lula, Cie, Ro, Fiore, Pau y Barbi, nuestras carreras se separaron hace ya bastante tiempo, pero las veo hacer lo que les gusta,

animarse a cosas nuevas y siguen siendo como el primer día una inspiración para mí y me dan la certeza de que uno puede, si realmente se lo propone, hacer lo que nos hace tan feliz en cualquier parte del mundo que eso implique.

También tuve la suerte de llegar a un laboratorio excepcional para hacer la tesina de mi carrera de grado y como no quería irme de ahí decidí apostar por más y le metí de mis fichas al doctorado, fue un largo camino, pero un día llegó mi director trayendo una idea loca y ahí estaba mi codirectora dispuesta a escuchar y a trabajar.

Le agradezco a mi director José por confiar, a veces ni uno se tiene tanta confianza como la que te dan los demás y eso me ayudó enormemente a ampliar un poco mi margen de libertad. Gracias por apostar por mí, por darme la oportunidad de crecer en este mundo lleno de vaivenes que es la ciencia. A mi codirectora Mechi, gracias por estar siempre codo a codo y por tu sinceridad por sobre todas las cosas. A Vero, Pato, Lucas y a todo el team del LBO, por tantos años compartidos, casi una década aprendiendo de ustedes. Agus y Dami gracias por tanto y perdón por tan poco, realmente si casi llegue a los 10 añitos fue gracias a contar con su presencia en ese subsuelo.

Entonces, en este momento me encuentro en el intento de construir una vida que tenga algún sentido. Y claramente no lo tendría si no fuera porque una de las mejores fichas que supe mover fue la del amor. Diego, sos la persona más buena que conocí en mi vida y me esfuerzo por llegar a ser la persona que te mereces tener al lado. Agradezco desde el fondo de mi corazón tu ilimitado e incondicional apoyo.

Ahora, me gustaría cerrar este espacio con una frase que me enseñó uno de los mejores profesores que tuve durante mi carrera de grado: "*La complejidad, no deriva de una complejidad equivalente, sino de las reglas combinatorias de una simplicidad subyacente*". Me acompaña desde que logré entender su significado más allá de las palabras, porque él no lo decía sólo por cómo es el desarrollo de los eucariotas. O, en realidad, quizás si...

RESUMEN

Durante el embarazo y la lactancia el requerimiento de Ca para el crecimiento óseo fetal y del bebé se satisface principalmente mediante aumentos en la absorción de Ca y cambios metabólicos que movilizan el mineral esquelético materno.

Investigaciones previas han demostrado que, en comunidades con una dieta deficiente de Ca (<1100 mg Ca/día), la suplementación durante el embarazo se asocia con una reducción significativa en la incidencia de preeclampsia. Sin embargo, se han encontrado resultados contradictorios sobre el efecto de la suplementación en la densidad mineral ósea (DMO) y el contenido mineral óseo (CMO) tanto de las madres como de su descendencia. En este trabajo se evaluó el efecto de la suplementación con Ca durante la preñez en la descendencia (G2) de ratas Wistar Kyoto y también en las madres (G1). Las mismas se dividieron en 2 grupos: G1 Control y G1 Suplemento. El Ca se administró a través de la dieta (grupo G1 Control: dieta HipoCa (0,3%) y grupo G1 Suplemento: durante un período de adaptación recibió dieta HipoCa, luego durante el apareamiento y preñez recibió NormoCa (1,2%) y finalmente durante la lactancia volvió a recibir dieta HipoCa). La progenie quedó dividida entonces en función de si eran descendencia de madres que no habían sido suplementadas (G2 Control) o si lo eran de las madres que fueron suplementadas (G2 Suplemento). Luego del destete todas las crías recibieron dieta NormoCa.

Con respecto a las madres, en esta tesis, no se halló diferencias en la DMO, como así tampoco cambios en las propiedades biomecánicas ni en la absorción intestinal de Ca. Por otro lado, se halló una disminución significativa en la DMO de las tibias de las crías del grupo G2 Suplemento con respecto al grupo G2 Control, pero este resultado no está respaldado por los análisis de biomecánica o morfometría ósea. Por lo tanto, sería importante considerar un seguimiento más prolongado para determinar si estas diferencias se mantienen, se acentúan o se disipan con el tiempo.

La administración de suplementos de Ca durante el embarazo en mujeres con baja ingesta de este ion es una práctica recomendada por la OMS y con un gran

respaldo científico como estrategia para reducir el riesgo de preeclampsia que es una de las principales causas de muerte materno infantil. Una de las principales críticas a la administración de suplementos de Ca durante el embarazo es su posible efecto negativo sobre la salud ósea de las madres observado en un único ensayo clínico realizado en Gambia. Con lo cual los resultados de esta tesis, que examinan diversos aspectos relacionados con la salud ósea, junto con futuros experimentos que amplíen el número de animales, la edad de las crías y los tiempos de administración de los suplementos de Ca a las madres, podrán contribuir a respaldar un tratamiento de bajo costo y de gran relevancia en la salud materno infantil.

ABREVIATURAS y SÍMBOLOS

ALP: fosfatasa alcalina

CaSR: receptor sensor de Ca

CMO: Contenido Mineral Óseo

DMO: Densidad Mineral Ósea

DXA: Absorciometría dual de rayos X (Dual-Energy X-ray Absorptiometry)

ENNyS: Encuesta Nacional de Nutrición y Salud

G1: generación 1

G2: generación 2

HipoCa: hipocálcico/a [Ca]=0,3%

H&E: Hematoxilina- Eosina

LEC: líquido extracelular

LIC: líquido intracelular

NormoCa: normocálcico/a [Ca]=1,2%

OMS: Organización Mundial de la Salud

PTH: hormona paratiroidea

TRPV: canales epiteliales de Ca

VDR: receptor nuclear para la vitamina D

[Ca²⁺]: concentración de calcio iónico

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tejido Óseo

Estructura y función del tejido óseo

El sistema esquelético está conformado por huesos los cuales son estructuras constituidas principalmente por un tipo especializado de tejido conjuntivo. Este sistema es multifuncional ya que además de proveer soporte estructural y protección para los órganos internos, interviene en muchos procesos biológicos como ser producción de células sanguíneas, homeostasis y metabolismo mineral y posee funciones endócrinas (1).

El hueso consiste esencialmente en una matriz extracelular mineralizada y células especializadas llamadas osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. El principal componente orgánico de la matriz es el colágeno tipo I, que supone alrededor del 90% de la misma y el 10% restante lo componen una serie de proteínas no estructurales. La fase inorgánica está compuesta por hidroxapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, un mineral que forma cristales pequeños que se incrustan entre las fibras de colágeno para formar un material que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia lo que produce un tejido muy duro capaz de proporcionar sostén y protección, además de funcionar como reserva de iones como el calcio y el fosfato (2).

En cuanto a las células que lo componen encontramos a los osteoblastos, estas células que derivan de progenitores mesenquimales presentes en la médula ósea son formadoras de hueso y trabajan en grupos para segregar y mineralizar la matriz ósea. Los osteoblastos expresan abundante fosfatasa alcalina, enzima que contribuye a la mineralización de la matriz liberando fosfato inorgánico. Además, las superficies óseas quiescentes están recubiertas por una monocapa de células inactivas aplanadas que derivan de los osteoblastos y se denominan células de revestimiento.

Durante la formación ósea, algunos osteoblastos quedan englobados en la matriz, que se va depositando a su alrededor y se diferencian a osteocitos, formando una red de células dispersas interconectadas. Los osteocitos

intervienen en la respuesta del hueso a los estímulos mecánicos, actuando como mecanorreceptores que se comunican con los osteoblastos y los osteoclastos presentes en las superficies óseas. Los osteoclastos son los encargados de la resorción o degradación del tejido óseo. Son células grandes, móviles, multinucleadas, que reabsorben las superficies óseas formando lagunas y surcos de bordes estrellados. Los principales tipos celulares, su origen y su disposición se muestran en la Figura 1.

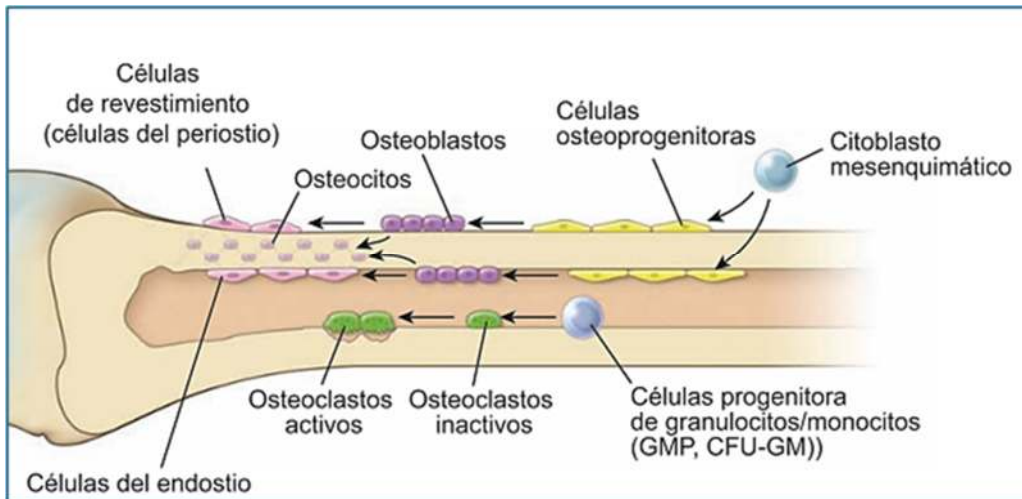


Figura 1. Representación esquemática de las células asociadas al hueso. Los citoblastos mesenquimáticos dan origen a los osteoblastos que se transforman en células de revestimiento o en osteocitos según la zona ósea. Las células progenitoras de granulocitos dan origen a los osteoclastos en el endostio o superficie interna del hueso (adaptado de referencia (3)).

En síntesis, el hueso es un material con características únicas que sirve a necesidades contradictorias: por un lado, debe ser resistente a la deformación, pero a la vez debe ser flexible para poder soportar las cargas a las cuales está sometido sin quebrarse, además debe ser liviano para facilitar el movimiento del cuerpo (3).

Clasificación según su organización estructural

A nivel macroscópico el tejido óseo puede clasificarse en cortical y trabecular. El tejido cortical o compacto representa el 80 % del esqueleto y se encuentra en la superficie ósea externa de los huesos. Por su parte el tejido trabecular o esponjoso, constituye el 20 % restante y se encuentra en la parte interna de los huesos. En la Figura 2 se muestra una representación de ambos tejidos (4).



Figura 2. El interior del hueso presenta una configuración esponjosa y representa al hueso trabecular. La porción externa del hueso tiene una estructura sólida y representa al hueso compacto.

En el hueso cortical, la matriz extracelular mineralizada se dispone en láminas concéntricas alrededor de los conductos de Havers en cuyo interior existen tejido nervioso y vasos sanguíneos. En este tipo de huesos se pueden distinguir dos superficies óseas que lo recubren: la superficie perióstica o externa y la superficie endóstica o interna. En la superficie perióstica una cápsula de tejido conjuntivo fibroso cubre al hueso en crecimiento activo (excepto en la región articular donde se encuentra cartílago) y se compone de dos capas, una fibrosa externa y una capa celular más interna que contiene las células osteoprogenitoras. En cuanto a la superficie endóstica, suele estar revestida sólo por una capa de células osteoprogenitoras.

El hueso trabecular está formado por finas espículas anastomosadas o trabéculas separadas por un laberinto de espacios medulares intercomunicados. Las trabéculas tienen una orientación que se correlaciona con la magnitud y la dirección de las cargas que soporta el hueso. Esto permite redirigir las fuerzas hacia la zona cortical ya que es más resistente que la zona esponjosa. Entonces, aunque ambos tipos de hueso están constituidos por las mismas células y los mismos elementos de la matriz, funcionalmente se diferencian entre sí; ya que el hueso trabecular cumple funciones fundamentalmente metabólicas, mientras que el hueso cortical está relacionado con las funciones de sostén y protección.

Debido a esto la ubicación y la proporción del tejido óseo compacto con respecto al tejido óseo esponjoso varía de acuerdo con la forma del hueso (3).

Clasificación según la morfología del hueso

Los huesos se clasifican de acuerdo con su forma en huesos largos, huesos cortos, huesos irregulares y huesos planos.

Como ejemplos de huesos largos tenemos al fémur y a la tibia, en los cuales predomina la longitud sobre el espesor y el ancho. Constan de un cuerpo o diáfisis que está constituida por una cavidad medular rodeada por hueso compacto y de dos extremos o epífisis, constituidos por hueso esponjoso rodeados por una delgada lámina de hueso compacto. La zona que une la diáfisis con la epífisis se denomina metáfisis y es la zona donde ocurre el crecimiento longitudinal de este tipo de huesos (Figura 3).

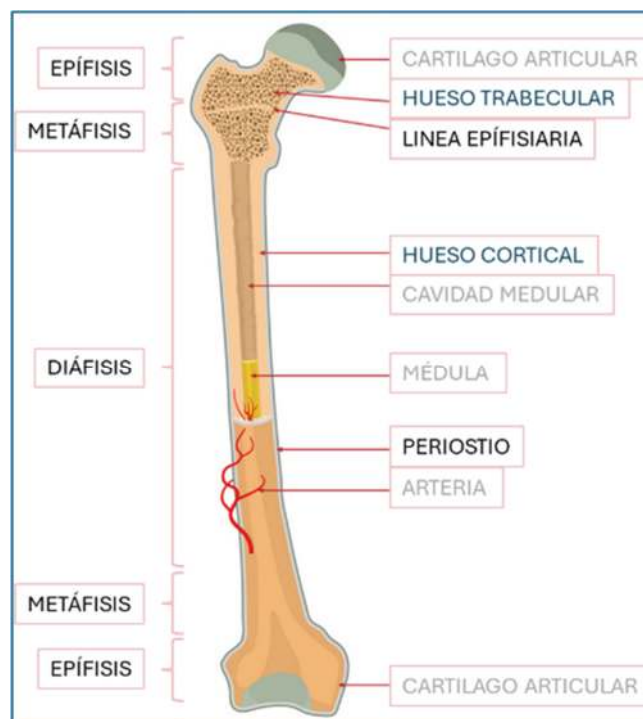


Figura 3. Esquema de las partes del fémur como ejemplo de un hueso largo. Se reconocen tres partes anatómicas: en sus extremidades encontramos la epífisis y la metáfisis y en la zona central la diáfisis. En las epífisis y las metáfisis predomina el hueso trabecular, mientras que en la diáfisis predomina el hueso cortical.

Como ejemplo de huesos irregulares se puede mencionar a las vértebras, que están constituidas por un cuerpo, es decir, una masa ósea que forma su parte

anterior y además cuenta con un arco vertebral posterior (Figura 4). El cuerpo vertebral está constituido principalmente por tejido esponjoso, espeso, sólido y resistente ya que sus trabéculas están orientadas en el sentido de las presiones contribuyendo a la sustentación de la columna.

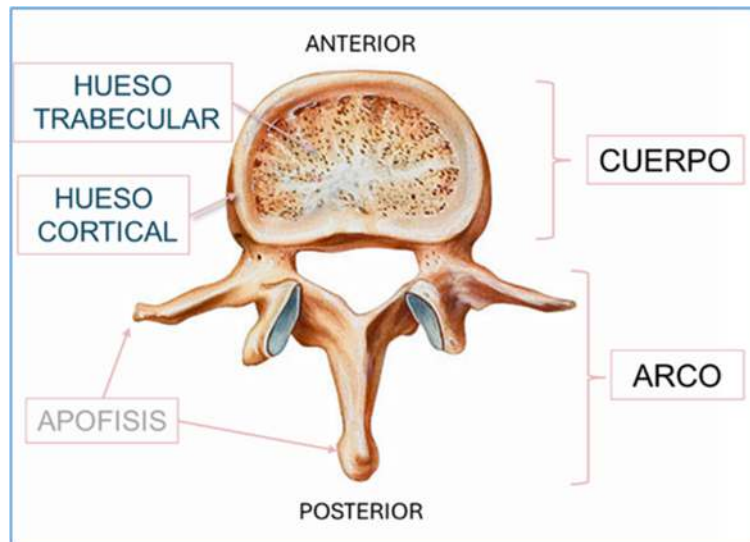


Figura 4. Esquema de las partes de una vértebra como ejemplo de hueso irregular. En la parte anterior se encuentra el cuerpo y en la parte posterior el arco vertebral. El cuerpo de la vértebra se compone principalmente de hueso trabecular y se encuentra rodeado por hueso cortical.

Como se mencionó anteriormente, otro tipo de huesos son los huesos planos, que se caracterizan por poseer el espesor reducido, con predominio de la longitud y el ancho. En este tipo de piezas el hueso esponjoso se dispone entre dos láminas de hueso compacto. La mandíbula es un hueso plano que está anatómicamente dividido en dos mitades y que en el caso de los humanos se fusionan en la sínfisis mandibular en la región central (5), no así en las ratas, pudiéndose estudiar las hemimandíbulas por separado. Además, otra característica distintiva de las mandíbulas de roedores es que poseen un diente de crecimiento continuo, el incisivo, que se encuentra en la parte anterior de la mandíbula, específicamente asociados con la sínfisis mandibular (6,7). En la Figura 5 veremos un esquema anatómico de las mandíbulas humanas y de las hemimandíbulas de las ratas, en ella se comparan las diferencias y las similitudes entre dichos huesos de ambas especies.

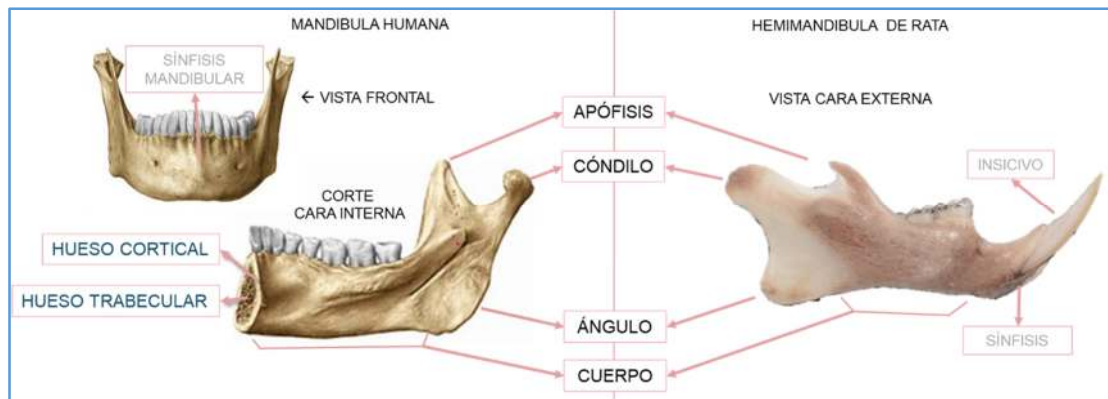


Figura 5. Esquema de mandíbulas y sus partes anatómicas. En el panel de la derecha se observan dos representaciones de una mandíbula humana, en el panel de la izquierda se observa una imagen de una hemimandíbula de rata. Si bien tienen distintos orígenes, tienen similar estructura anatómica: poseen una apófisis coronaria, el cóndilo y el cuerpo mandibular. Mientras que la mandíbula humana se fusiona durante el desarrollo formando una única pieza ósea, la mandíbula de la rata se compone de dos hemimandíbulas.

Osteogénesis, modelado y remodelado óseos

La osteogénesis u osificación es el conjunto de fenómenos histológicos, fisiológicos y anatómicos que conducen a la formación y crecimiento de los huesos. Este proceso puede llevarse a cabo por dos mecanismos diferentes: osificación endocondral y osificación intramembranosa e inicia durante la sexta y séptima semana del estadio embrionario y continúa luego del nacimiento hasta aproximadamente los 25 años de edad para los seres humanos (8), mientras que para las ratas inicia aproximadamente durante la segunda semana de gestación (9) y se observa un "estirón" de crecimiento alrededor de los 4 meses de edad, seguido de una desaceleración y una meseta alrededor de los 6 meses de edad (10).

La formación de los huesos largos como el fémur se da por osificación endocondral y tiene lugar a partir de las células mesenquimales de los esbozos embrionarios de las extremidades, que se diferencian y forman un cartílago avascular rudimentario. Estos rudimentos son después invadidos por vasos sanguíneos que erosionan la zona central del cartílago permitiendo la llegada de los osteoblastos que comienzan a generar la matriz extracelular mineralizada. Al ir avanzando este proceso, en la metafisis del hueso se va formando una zona de cartílago proliferante que se denomina "placa o cartílago de crecimiento". Se

forman bandas de tejido cartilaginoso que sirven como molde temporal para el depósito de hueso y facilitan el crecimiento longitudinal de manera rápida y controlada. Por otro lado, los huesos planos como los del cráneo se forman por osificación intramembranosa donde el mesénquima-embrionario se diferencia directamente hacia la línea osteoblástica, sin aparición intermedia de cartílago. Otros huesos, se forman por una combinación de ambos procesos, es decir, por osificación endocondral e intramembranosa. Como es el caso de la mandíbula cuya formación implica el crecimiento, fusión y moldeado de una gran variedad de tejidos en el arco faríngeo, que comienza durante la gestación por medio de dos centros de osificación intramembranosa donde el cartílago de Meckel sirve como guía, pero no forma parte del proceso de osificación. Por otra parte, a diferencia del resto de la mandíbula, en el cóndilo se da una osificación del tipo endocondral (8).

El modelado óseo es el proceso mediante el cual los huesos crecen en tamaño y van modificando su forma para adecuarse a la forma final del hueso. Este proceso comienza en el periodo fetal y se vuelve muy importante entre el cuarto y quinto mes de gestación. El modelado consiste en la resorción en algunos sitios del hueso y la formación ósea en otros sitios, es decir que, durante este proceso la resorción y la formación ósea no están acopladas en tiempo, ni en espacio, ya que es un proceso de adaptación que responde a las deformaciones provocadas por el entorno mecánico. En la Figura 6 se puede visualizar un ejemplo de cómo distintas zonas óseas son modeladas para lograr el adecuado crecimiento de la epífisis de un hueso largo. Los procesos de osificación y de modelado óseo están estrechamente sincronizados para lograr darle la forma correcta al hueso durante el desarrollo y el crecimiento (3).

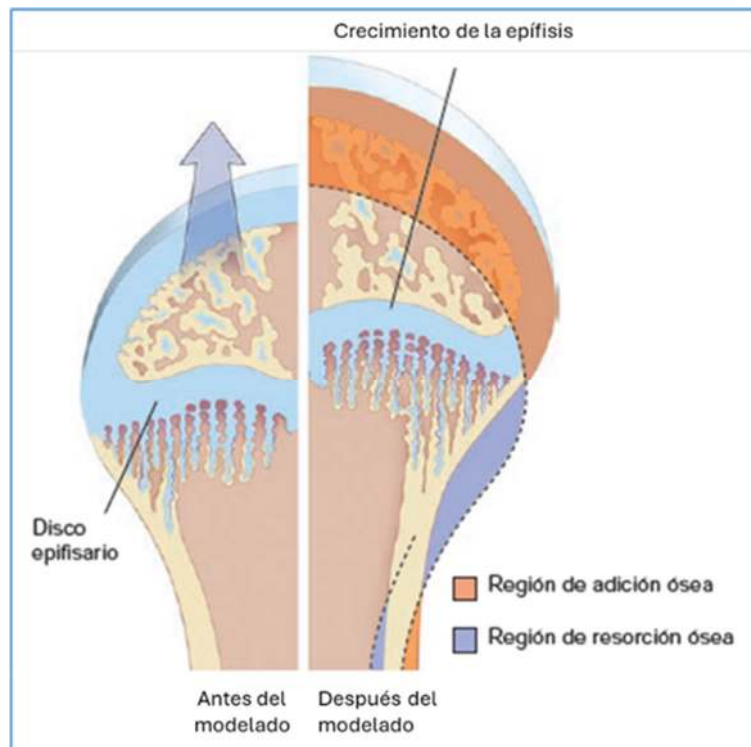


Figura 6. Modelado de la epífisis de un hueso largo. Antes del modelado el hueso tiene una forma que al crecer debe mantenerse, por lo cual luego del modelado podremos identificar zonas en las que se ha resorbido el hueso preexistente (marcadas en azul) mientras que en otras zonas se ha generado hueso nuevo (marcado en naranja) (adaptado de referencia 3).

Por otra parte, el remodelado óseo es el mecanismo por el cual se produce el reemplazo de la matriz ósea y la reparación de pequeños defectos, renovando el esqueleto en el tiempo, pudiendo ocurrir dentro de cualquiera de las cuatro regiones óseas: perióstica, endóstica, trabecular y cortical. Éste es un proceso que ocurre a lo largo de toda la vida e implica la actividad conjunta de osteoclastos mediando la resorción ósea y de osteoblastos mediando la formación ósea. El proceso presenta una serie de etapas (Figura 7) que comienza con el reclutamiento y activación de los osteoclastos que reabsorben la matriz mineralizada defectuosa. En la siguiente etapa, la fase de inversión, éstos mueren por apoptosis o migran a otros sitios dejando una laguna de resorción. Esta laguna es invadida por células mononucleares precursoras de los osteoblastos, que posteriormente se encargan de la síntesis de matriz ósea y rellenan el defecto generado por los osteoclastos. Cuando cesa la formación, los osteoblastos inmersos en la matriz se diferencian a osteocitos mientras que

los osteoblastos de la superficie adquieren una forma aplanada y la superficie ósea queda quiescente (11).

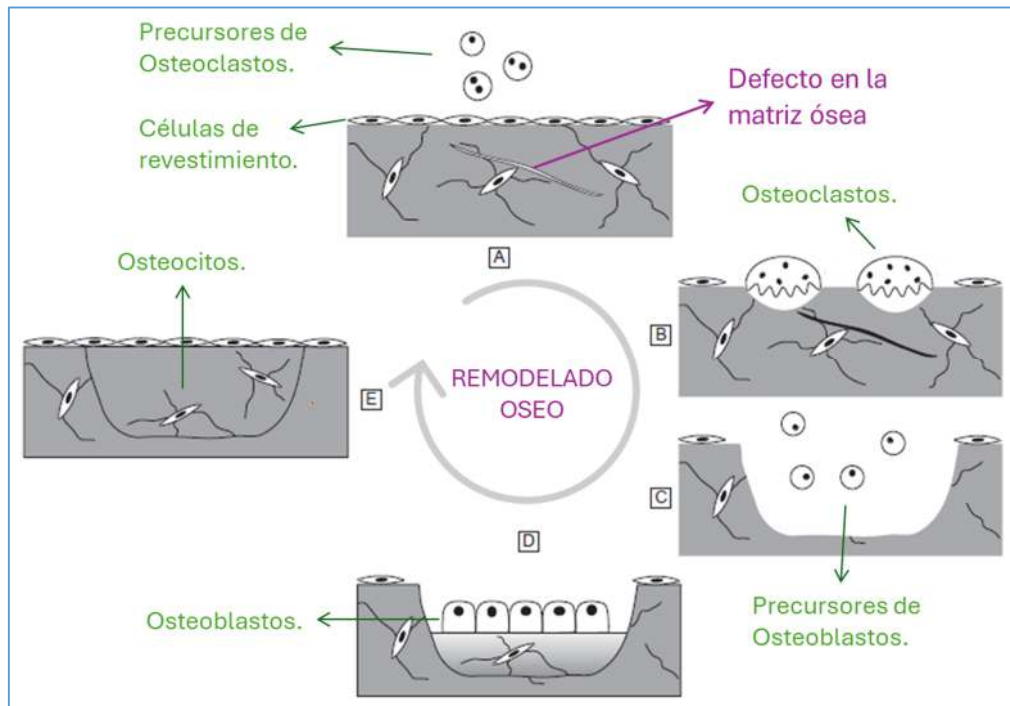


Figura 7. Esquema del remodelado en el hueso trabecular. Involucra cinco estados: **A:** Activación de los osteoclastos. **B:** Resorción de la matriz ósea. **C:** Reversión o Inversión: muerte o migración de los osteoclastos y llegada de precursores de osteoblastos. **D:** Formación de nueva matriz por parte de los osteoblastos. **E:** Quiescencia, el hueso ha sido reparado. (Adaptado de referencia (11)).

1.2 Homeostasis del calcio

El calcio en el organismo

El calcio en su forma ionizada (Ca^{2+}) es esencial para la vida humana porque, como se mencionó anteriormente, forma parte de la matriz extracelular de los tejidos duros, pero también, está involucrado en la neurotransmisión, el aprendizaje y la memoria, en la contracción muscular, en la división celular, en la movilidad, la secreción, la fecundación y en la coagulación sanguínea. Es por ello que el Ca^{2+} es un micronutriente esencial en la dieta.

Si bien existen tres formas de calcio circulante (libre ionizado, ligado a proteínas o en forma de complejo con aniones como fosfato, carbonato o citrato) su forma libre representa el 50% del calcio circulante total y como ésta es la forma más

importante para muchas funciones celulares la concentración de calcio iónico ($[Ca^{2+}]$) es estrictamente regulada tanto a nivel intracelular como extracelular. Debido a esto, existe un control hormonal directo que mantiene la calcemia dentro de un rango de 8,5 a 10,5 mg/dL. La presencia de poco calcio (hipocalcemia) o de un exceso de calcio (hipercalcemia) en sangre puede causar muchas alteraciones fisiopatológicas, que incluyen disfunción neuromuscular, disfunción del sistema nervioso central, insuficiencia renal, calcificación de las partes blandas y patologías esqueléticas.

Las personas cuentan con un extenso depósito de este ion en los huesos (> 1 kg) formando la hidroxapatita que además le otorga estructura al tejido óseo. Contar con esta reserva le sirve al organismo para mantener una calcemia normal cuando hay limitación dietética y cuando aumentan los requerimientos como sucede, por ejemplo, durante el embarazo y la lactancia (12).

Hormonas reguladoras del calcio

El 98,9% del calcio está depositado en el hueso, aproximadamente el 1% se halla en el líquido intracelular (LIC) y el 0,1% en el líquido extracelular (LEC). Como se mencionó anteriormente, la concentración de calcio en el plasma es de unos 10 mg/dL y suele mantenerse entre límites muy estrechos (8,5-10,5 mg/dL). Normalmente, la concentración de calcio en el LEC y en el plasma varía muy poco, lo que sirve para mantener la concentración del calcio intracelular (13). Debido a su importancia en diversos procesos fisiológicos existe un mecanismo que permite una estrecha regulación en la distribución entre el hueso y el LEC (14). Este mecanismo, se encuentra bajo control directo por retroalimentación del ion y bajo control endócrino indirecto, donde participan principalmente dos hormonas (calcitriol y hormona paratiroidea) y también la calcitonina.

La 1,25-dihidroxitamina D o calcitriol y la hormona paratiroidea (PTH) regulan tanto los mecanismos de absorción a nivel intestinal y la liberación del calcio hacia el torrente sanguíneo tras la reabsorción ósea, como la excreción renal y la mineralización del tejido óseo, para mantener la calcemia en los niveles adecuados. Estas hormonas calciotrópicas actúan sobre tres lugares claves (tubo digestivo, riñones y hueso) para mantener la homeostasia del Ca en el torrente sanguíneo (Figura 8) (12).

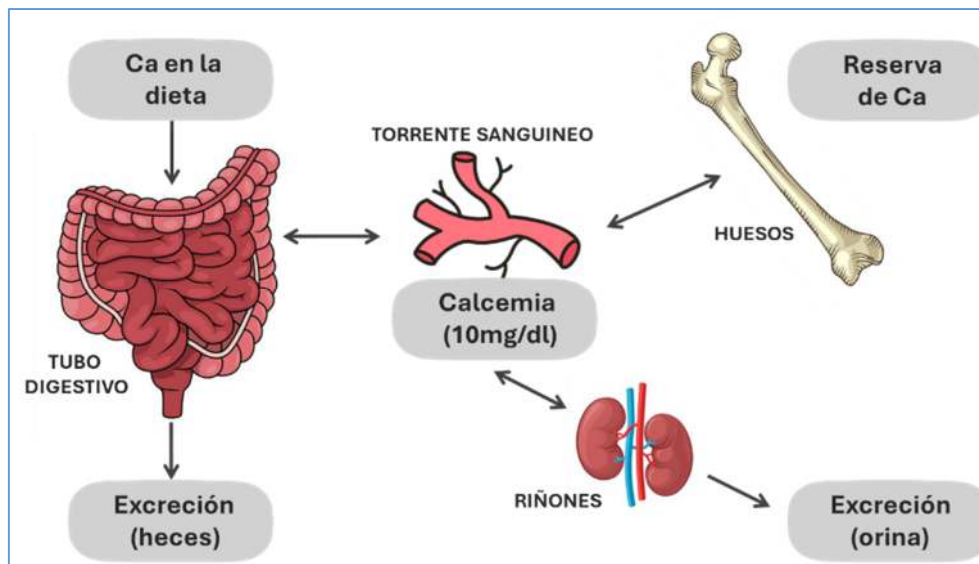


Figura 8. Flujo diario de Ca. Parte del Ca que ingresa por la dieta se excreta en las heces, otra parte es absorbida por el intestino y viaja por el torrente sanguíneo donde se mantiene aproximadamente en una $[Ca^{2+}] = 10 \text{ mg/dl}$. Una parte se deposita en los huesos y el exceso de Ca puede eliminarse por orina.

La PTH es la principal hormona protectora frente a la hipocalcemia, es una hormona peptídica que se sintetiza de forma inactiva y por medio de proteólisis cambia a su forma activa manteniéndose en vesículas para segregarse. La principal señal que estimula la secreción de PTH es una $[Ca^{2+}]$ circulante baja, esta señal es percibida por los receptores sensores de Ca (CaSR) presentes en las células principales de la glándula paratiroides. Por otra parte, cuando la $[Ca^{2+}]$ circulante es alta, el Ca en exceso se une al CaSR lo que activa vías de transmisión de señales que reprimen tanto la secreción de PTH como su síntesis. El receptor de la PTH se expresa en los osteoblastos y en los túbulos proximal y distal del riñón mediando las acciones sistémicas de la PTH que permiten un aumento en la concentración plasmática de Ca.

La vitamina D es una prohormona que se produce en la piel o es ingerida en la dieta y debe ser hidroxilada dos veces para convertirse en su forma más activa, 1,25-dihroxivitamina D o calcitriol. La primera hidroxilación se da en el hígado por la 25-hidroxilasa y luego la 25-hidroxivitamina D que llega al riñón es hidroxilada por la 1α -hidroxilasa, convirtiéndose en calcitriol. Esta hormona regula la absorción de Ca a nivel intestinal y también interviene en la remodelación del hueso y en la reabsorción renal del Ca, ya que todos estos

órganos cuentan con el receptor nuclear para la vitamina D (VDR). El VDR es un factor de transcripción, por lo tanto, la principal acción del calcitriol es regular la expresión génica en los tejidos diana mencionados anteriormente.

Mientras que la PTH favorece la producción del calcitriol estimulando la actividad de la 1 α -hidroxilasa renal, el calcitriol tiene acción negativa sobre la síntesis de la PTH, ya que la llegada de éste a las glándulas paratiroides inhibe la transcripción de su gen (12).

Como se mencionó anteriormente, en respuesta a una elevada [Ca²⁺] en el LEC, ocurre una disminución de la secreción de PTH causada por la unión del Ca a los CaSR paratiroides y con ello una disminución de la producción renal de calcitriol. La caída de estas hormonas produce una disminución de la liberación del Ca esquelético, una disminución de la absorción intestinal de Ca, una reducción de la reabsorción tubular renal de Ca y la estimulación de la formación ósea, este conjunto de acciones en definitiva disminuye la [Ca²⁺] y la vuelven a la normalidad (12,15). Además, la hipercalcemia estimula la secreción de la calcitonina, hormona producida por las células parafoliculares de la glándula tiroides que se encarga de disminuir la concentración de Ca plasmática estimulando la formación ósea, igualmente la calcitonina resulta ser menos eficaz que la PTH en la homeostasis del Ca (14).

Cuando la concentración de Ca en plasma disminuye, ocurre la secuencia opuesta de eventos, es decir, la baja [Ca²⁺] es detectada por CaSR en la membrana plasmática de las glándulas paratiroides, lo que aumenta la expresión del gen de la PTH y su posterior secreción. Esta hormona (PTH) favorece indirectamente la diferenciación de las células precursoras de osteoclastos lo que aumenta la resorción ósea y eleva la concentración de Ca plasmático. Además, incrementa la reabsorción renal de Ca y aumenta la absorción intestinal de este ion estimulando la producción de calcitriol (12).

Cuando la calcemia está en sus niveles adecuados, el calcitriol no solo favorece la absorción de calcio y fósforo, sino que modula directamente la diferenciación y función de los osteoblastos, promoviendo la formación ósea a través de la activación del VDR, la expresión de genes osteogénicos y la producción de factores de crecimiento.

Tanto las acciones que elevan la concentración de calcio plasmáticas, como las que la disminuyen se esquematizan en la Figura 9.

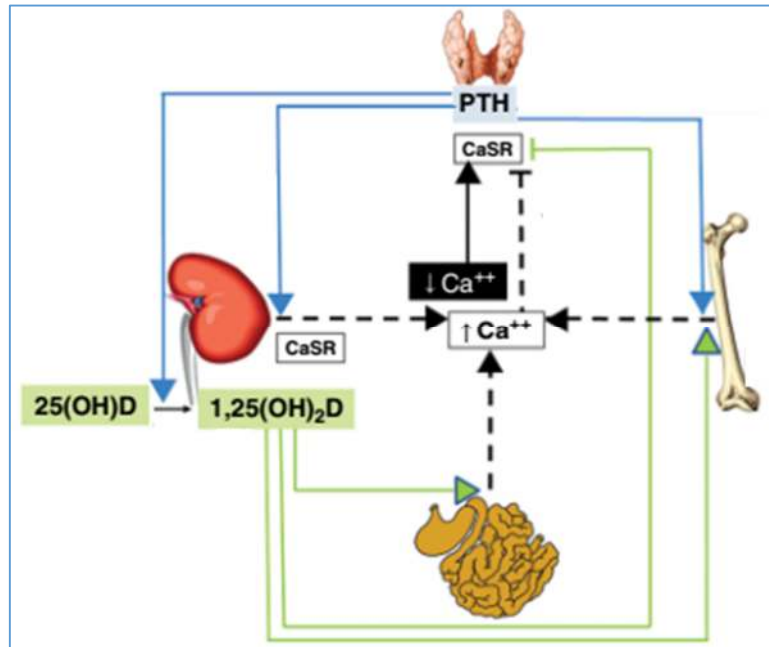


Figura 9. Regulación hormonal de la homeostasis del Ca. La baja concentración de Ca plasmático detectado por los receptores CaSR de las células de las glándulas paratiroides estimula la secreción de la PTH. Ésta hormona produce la liberación del Ca del esqueleto, para así aumentar la concentración de Ca plasmático (derecha de la figura). Además, la PTH aumenta la reabsorción de Ca en los túbulos renales, impidiendo su eliminación a través de la orina, también promueve la activación de 25(OH)D a 1,25(OH)₂D lo que contribuye a aumentar la absorción intestinal del Ca por el tubo digestivo y por lo tanto aumentar la concentración de Ca en el plasma (izquierda de la figura) Figura adaptada de referencia 13.

Absorción intestinal de calcio

El sistema digestivo tiene como principales procesos fisiológicos la motilidad y la secreción, como así también el almacenamiento, la digestión y la absorción de nutrientes presentes en el bolo alimenticio y la excreción de los desechos. Esencialmente, el tubo digestivo es un cilindro hueco dividido en grandes segmentos funcionales. Las estructuras principales a lo largo del tubo son: boca y faringe, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, colon, recto y ano. Juntos, el duodeno, el yeyuno y el íleon conforman el intestino delgado. La

función predominante del intestino delgado es la digestión y la absorción de macromoléculas complejas, en cambio en el colon se reabsorben agua e iones para asegurar que no sean eliminados del organismo. Si bien las capas del duodeno responden a la organización general del tubo digestivo (Figura 10 – A) la mayor especialización del duodeno es la gran superficie con capacidad de absorción lograda gracias a la presencia de vellosidades y criptas que sirven para aumentar el área de la superficie de la mucosa (Figura 10 - B) (12).

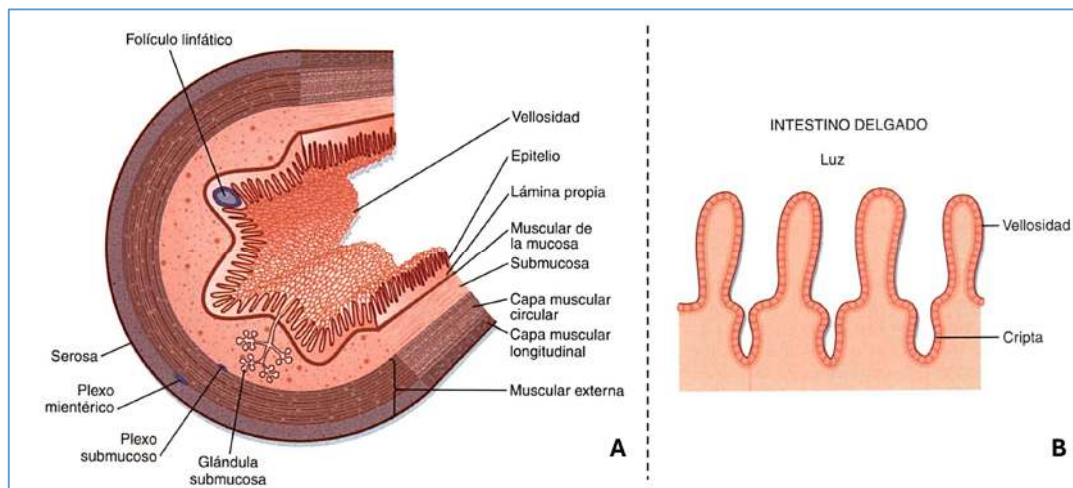


Figura 10. En el panel (A) se visualiza la organización general de las capas del tubo digestivo, que está compuesto por cuatro capas concéntricas conocidas como: mucosa, submucosa, muscular (constituida por una capa externa circular y una interna longitudinal) y serosa. Además, se visualiza la presencia de glándulas y folículos. En el panel (B) se observa una ampliación de la mucosa, es decir la capa más interna (del lado luminal) del intestino delgado que forma pliegues intestinales (vellosidades y criptas) para aumentar la superficie de absorción de nutrientes en el mismo. Figuras adaptadas de referencia 10.

Particularmente la absorción del Ca es diferente en los distintos segmentos del tracto digestivo. En condiciones fisiológicas, los iones Ca son absorbidos principalmente en el intestino delgado, responsable de alrededor del 90% de la absorción total de Ca. Mediante un estudio realizado en ratas se determinó que el 88% de la absorción de Ca se produce en el íleon, el 4% en el yeyuno y el 8% en el duodeno. Si bien el duodeno no es el segmento del tracto digestivo de mayor absorción de Ca, es donde más está regulado el transporte activo del mismo, además de ser el segmento donde mayor tiempo permanece durante el tránsito intestinal (16).

En las vellosidades intestinales de la capa mucosa se encuentran los enterocitos maduros que son los encargados de la absorción intestinal de Ca, la misma se produce por dos mecanismos, el paracelular y el transcelular (17). En el transporte paracelular el Ca no atraviesa las células, sino que se mueve entre ellas, pasando por las uniones estrechas (dominios de membrana especializados situados en la región apical de los enterocitos) permitiendo la absorción por difusión simple de un escaso porcentaje de este ion. Este movimiento de Ca es un proceso pasivo que depende de su concentración, de su solubilidad y de los gradientes eléctricos del epitelio en los distintos segmentos del intestino (18).

Sin embargo, la mayor parte de la absorción de Ca es mediante el proceso de absorción transcelular, por el cual el Ca atraviesa toda la célula pasando por la membrana apical y luego por la basolateral. Este mecanismo está fisiológicamente regulado por el calcitriol, que estimula la síntesis de proteínas transportadoras ubicadas en ambas membranas celulares (18,19). En esta vía están implicados canales epiteliales de Ca (TRPV), de los cuales existen dos isoformas, TRPV5 principalmente presente en el riñón y TRPV6 muy expresada en el intestino, sus principales diferencias se encuentran en la región amino y carboxilo terminal. La absorción intestinal de Ca desde la luz intestinal a través de los canales de Ca (TRPV6) en la membrana plasmática se da a favor del gradiente de concentración y está estimulada por el calcitriol que activa la transcripción del gen de TRPV6 cuando se une a su receptor nuclear VDR (18). Además, cuando el calcitriol se une a VDR estimula la expresión de la calbindina, una proteína que se une al Ca presente en el citosol de las células de la mucosa intestinal, encargada de facilitar el transporte de Ca intracelular impidiendo que la concentración de Ca libre sea lo suficientemente alta como para formar sales insolubles con los aniones intracelulares (13,20,21).

Otro de los múltiples efectos del calcitriol es acelerar la velocidad de expulsión del Ca a través de la membrana basolateral de las células epiteliales intestinales, ya que eleva la expresión de los genes de la bomba Ca-ATPasa y de un canal intercambiador Na-Ca (17).

En la Figura 11 se representan los mecanismos de transporte de Ca tanto paracelular como transcelular y los intermediarios que participan para que el transporte sea efectivo.

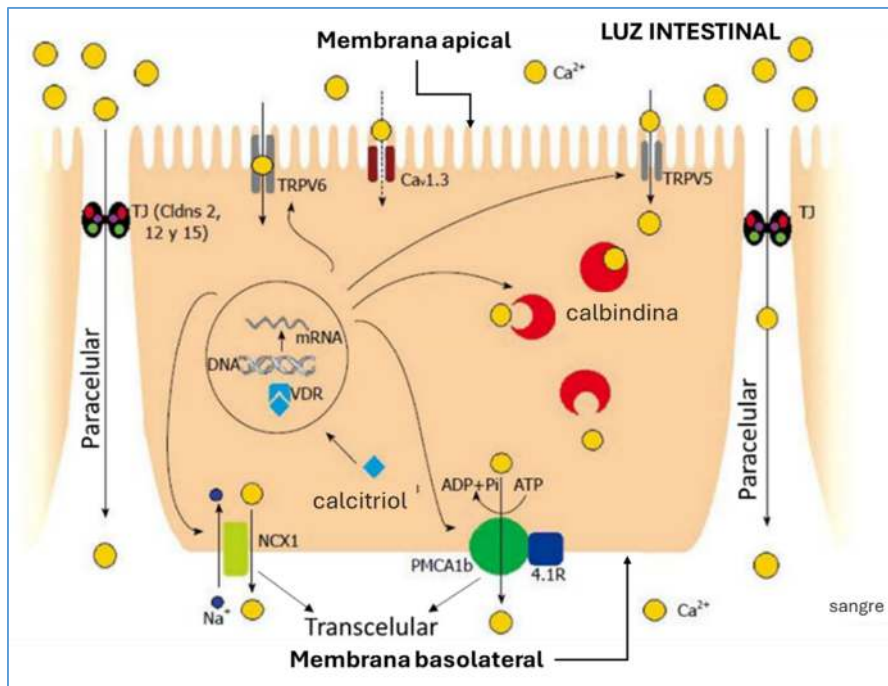


Figura 11. Absorción y transporte del Ca intestinal. El Ca penetra en las células epiteliales del intestino a través de canales de Ca (TRPV6) en la membrana apical a favor de un gradiente de potencial electroquímico. En el interior la calbindina, fija los iones Ca y los transporta hasta la membrana basolateral donde se encuentran dos proteínas que se encargan de expulsar el Ca en contra de su gradiente, una Ca-ATPasa y un canal antiporte Na-Ca. El calcitriol es el encargado de estimular la expresión de genes para la síntesis de los intermediarios mencionados (adaptado de referencia 17).

1.3 Homeostasis del calcio materno y de la progenie

Metabolismo mineral durante el embarazo y la lactancia

El embarazo y la lactancia son situaciones donde la homeostasis mineral materna se enfrenta al desafío de cubrir las demandas propias y del hijo. Por ello, se requieren cambios significativos en el metabolismo mineral materno para cumplir con los requerimientos de Ca. Estos procesos están regulados por

cambios hormonales y a menudo conducen a la disminución de la masa ósea de la madre.

Durante el embarazo, aproximadamente 30 g de Ca de la madre se transfieren para formar el esqueleto del feto. La mayor parte de este Ca se deposita durante la segunda mitad del embarazo; la tasa de acumulación de minerales óseos fetales aumenta de 50 mg/día a las 20 semanas de gestación a 330 mg/día a las 35 semanas de gestación. Debido a este requerimiento se produce un aumento de la absorción intestinal de Ca en la madre, mediada por un aumento del calcitriol, permitiendo así que los iones se acumulen en los tejidos fetales en formación (14). Sin embargo, muchos estudios en roedores, aunque no todos, han demostrado que durante el embarazo se produce un aumento de la absorción intestinal de Ca y fósforo sin necesidad de calcitriol; siendo la prolactina, el lactógeno placentario, la hormona del crecimiento y otros factores los que pueden contribuir al aumento en la absorción al aumentar directamente la expresión de proteínas encargadas del transporte de Ca (22). Además, los modelos animales sugieren que la masa ósea materna puede aumentar al inicio de la preñez, mientras que al final la masa ósea es aproximadamente igual o ligeramente más baja que los valores previos al embarazo (23). El remodelado óseo aumenta durante el final de la preñez, cuando también aumenta la secreción de PTH, estos cambios se acentúan cuando se administra una dieta baja en Ca. Los datos disponibles de mujeres embarazadas indican que también se produce un balance de Ca positivo en la primera mitad del embarazo, pero no se ha determinado si la densidad mineral ósea (DMO) aumenta objetivamente en este momento (24).

Durante la lactancia, el requerimiento neonatal de minerales en los primeros 6 meses posparto es de aproximadamente 200 mg/día y este valor aumenta a 260 mg/día entre los 6 y los 12 meses de edad. Esto le permite al niño acumular en promedio unos 100 mg de Ca al día (16). Entonces, para satisfacer esta demanda de Ca, lo que ocurre principalmente es que aumenta la resorción esquelética materna y la absorción intestinal de Ca, que estaba aumentada durante el embarazo, se normaliza (25,26). La resorción ósea provoca una disminución temporal de la masa ósea de la madre en la zona lumbar y en la cadera, en especial cuando la ingesta de Ca materna es baja (27). Esta

desmineralización temporal del esqueleto se da por medio de dos procesos: la resorción ósea mediada por osteoclastos y la osteólisis osteocítica, un recambio de la matriz ósea, proceso estimulado por concentraciones intermitentes de la PTH.

Cuando la ingesta de Ca es adecuada la PTH suele suprimirse durante la lactancia, sin embargo, está elevada en mujeres que suelen tener dietas con baja ingesta de Ca y una alta ingesta de fitato el cual impide la correcta absorción del Ca a nivel intestinal (26). En animales de laboratorio se ha visto que la ingesta baja de Ca y el mayor número de crías provocan un mayor aumento de la PTH (28,29). Además, en la mayoría de los estudios en ratas lactantes con una amplia gama de dietas que contienen entre un 0,4% y un 1,4% de Ca, la PTH también resulta aumentada (30).

Sin embargo, se ha visto que la resorción ósea durante la lactancia en humanos está aumentada gracias al péptido relacionado a la paratohormona (PTHrP), quien parece tener un rol crucial en las adaptaciones que ocurren durante este periodo. El PTHrP es producido por la placenta, las glándulas mamarias, y posiblemente por el útero y los tejidos fetales. Comienza a aparecer en el plasma materno y aumenta progresivamente desde el primer trimestre del embarazo hasta el parto, después del cual los niveles disminuyen, a menos que se inicie la lactancia. Los efectos del PTHrP incluyen el mantenimiento del Ca iónico, la estimulación de la enzima α -1-hidroxilasa para producir niveles elevados de calcitriol y la supresión y reemplazo de la PTH (31).

Además de la PTH (en roedores) y la PTHrP (en humanos), los metabolitos de la vitamina D, la prolactina y el lactógeno placentario son reguladores clave del metabolismo del Ca en los mamíferos. Juntos son responsables del aumento de los niveles de Ca, aumentando la resorción ósea, estimulando la absorción intestinal de Ca a través de la síntesis de calcitriol y reduciendo la excreción urinaria de Ca (32).

En los roedores a diferencia de las mujeres, el aumento de la absorción intestinal de Ca que se produce durante el embarazo continúa durante la lactancia. Es probable que esto esté mediado en parte por niveles altos de calcitriol, pero también por mecanismos independientes del mismo (33–35). Por el contrario,

como se mencionó anteriormente la absorción intestinal de Ca desciende durante la lactancia en mujeres, acompañada de una caída del calcitriol. La ingesta alta o baja de Ca y la ingesta alta de vitamina D no parecen alterar esta tasa de absorción intestinal de Ca en mujeres lactantes. Por otro lado, la excreción urinaria de Ca disminuye permitiendo conservar el Ca para proporcionarlo a la leche (26).

La calcitonina puede ser normal o estar aumentada tanto en roedores como en mujeres lactantes. Además, estudios en modelos animales aportan evidencia convincente de que la calcitonina protege contra la resorción ósea excesiva durante la lactancia (26,36–39).

Los cambios en el remodelado óseo materno durante la lactancia conducen a una disminución en la masa ósea, se producen pérdidas de 25 a 35% en la columna lumbar durante 3 semanas de lactancia en roedores, mientras que pérdidas de 5 a 10% en la columna lumbar son inducidas por 6 meses de lactancia en mujeres, además de pérdidas menores en otros sitios esqueléticos (24,26).

Después del destete, el esqueleto materno pasa por una fase rápida de remineralización (25,40). El remodelado óseo continúa aumentando con respecto a los valores de antes del embarazo, pero ahora está desacoplado en la dirección opuesta a la de la lactancia, lo que favorece la ganancia ósea neta. La PTH desciende (29), mientras que el calcitriol aumenta (41), los marcadores de resorción ósea disminuyen y los de formación ósea aumentan (42). La recuperación del estradiol a la normalidad después del destete probablemente facilita la recuperación esquelética, pero no puede explicarla por completo (26). La absorción intestinal de Ca y fósforo es normal durante la recuperación post-destete en ratas (33). En roedores se recupera completamente la mineralización y la resistencia ósea en 2-8 semanas mientras que las mujeres probablemente lo logran más cerca de un año después de interrumpida la lactancia (24). Sin embargo, se requiere una dieta adecuada de Ca (25), ya que se vio que una dieta baja en Ca impide la recuperación esquelética en ratas, mientras que la normalización de la dieta 3 semanas después permite una recuperación normal (43). Además, en mujeres una adecuada ingesta de Ca

durante el embarazo parece estar asociada a una mejor DMO a los 5 años del parto (44).

Metabolismo mineral en el desarrollo y en neonatos.

Al nacer, un feto a término contiene aproximadamente entre 20 y 30 g de Ca, 16 g de fósforo, 750 mg de magnesio y 50 mg de zinc. Como se mencionó anteriormente la mayor acumulación fetal de minerales ocurre desde la mitad de la gestación, siendo máxima durante el tercer trimestre (26), mientras que para las ratas la mayor acumulación de minerales ocurre durante el final de la gestación y se intensifica significativamente durante el periodo postnatal de rápido crecimiento que se da en las primeras semanas de vida (10,45).

Los minerales se transportan activamente desde la circulación materna al feto a través de la placenta. Los intestinos y los riñones del feto tienen una importancia relativamente menor en la homeostasis mineral durante la vida intrauterina. Estudios en animales sugieren que la placenta suele ser capaz de extraer los minerales necesarios incluso cuando las concentraciones maternas son bajas (26).

Los niveles de PTH fetal suelen estar suprimidos debido a las altas concentraciones de Ca fetal, mientras que el PTHrP circula en niveles elevados. Se cree que es el PTHrP el que estimula el transporte placentario activo de Ca. El metabolismo mineral y el desarrollo óseo fetal parecen no depender del calcitriol, del factor de crecimiento de fibroblastos 23, de la calcitonina o de las hormonas sexuales (26).

La circulación fetal normal se caracteriza por concentraciones séricas de Ca y fósforo significativamente más altas que las de la madre y de los adultos. Aunque el flujo neto de minerales es hacia el esqueleto, también ocurre resorción ósea fetal, que contribuye al mantenimiento de los altos niveles de Ca sérico (26).

Tras el nacimiento se desencadena un cambio rápido en la regulación del metabolismo mineral ya que se pierde el aporte placentario de minerales, y la primera respiración causa un aumento del pH sanguíneo. Debido a estos cambios el Ca sérico disminuye, mientras que el fósforo sérico aumenta transitoriamente durante las primeras 24 a 48 horas y luego vuelven a los valores

normales, probablemente debido a un aumento de la PTH sérica en respuesta a la caída del Ca. El calcitriol aumenta lentamente a los valores normales del adulto después del nacimiento, probablemente también en respuesta a la PTH (26).

Luego de estos procesos de adaptación a la vida extrauterina los intestinos se convierten en la principal fuente de minerales, la absorción de Ca es inicialmente pasiva, pero con el tiempo se vuelve activa y dependiente del calcitriol. Los riñones comienzan a reabsorber minerales, y el recambio óseo se vuelve más importante para mantener las concentraciones séricas de Ca y fosfato (26).

Como se mencionó en la sección anterior los requerimientos de minerales del neonato son cubiertos por la leche materna y la madre atraviesa adaptaciones fisiológicas para cubrirlos. Además, se sabe que la leche materna contiene concentraciones muy altas de PTHrP, pero no está claro si se absorbe intacta en el intestino del recién nacido ni cuál es su función fisiológica. Algunos estudios sugieren una posible relación entre el contenido de PTHrP en la leche y la acumulación de Ca esquelético en los lactantes (26).

Si bien las adaptaciones fisiológicas durante el embarazo y la lactancia suelen asegurar un suministro mineral adecuado al feto, una ingesta materna muy baja de Ca, acompañada de deficiencia de vitamina D y cambios hormonales, puede influir negativamente en el metabolismo mineral y el desarrollo óseo fetal y neonatal (25,26).

1.4 Suplementación con Ca durante el embarazo

Importancia de la suplementación con Ca

Se sabe que las recomendaciones de ingesta de Ca varían en función de la edad y de las necesidades en ciertas etapas de la vida, por ejemplo, un adulto debe consumir 1000 mg/día de Ca mientras que para los niños (9-13 años) o las mujeres de entre 14 y 18 años embarazadas el requerimiento aumenta a 1300 mg/día. En Argentina la ingesta de Ca está por debajo de estas recomendaciones, según la segunda Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS) realizada entre los años 2017 y 2018, el consumo de Ca promedio en adultos fue de 639 mg/día (46), siendo este valor menor al informado en la primera ENNyS hecha en 2007 donde la mediana en la muestra nacional era de 702

mg/día. Además, en la ENNyS 2007 se informó que las mujeres embarazadas consumen en promedio 446 mg/día de Ca, mientras que las mujeres de edades comprendidas entre 19 y 49 años consumen aproximadamente 367 mg/día y solamente un 1% de ellas consume suplementos de Ca (47).

La suplementación con Ca durante el embarazo permite reducir el riesgo de trastornos hipertensivos del embarazo que en sí mismos plantean serios riesgos para la madre y el feto (48,49). Es por ello que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la suplementación con Ca durante el embarazo, en dosis de 1,5 a 2,0 g/día, para la prevención de la preeclampsia a todas las mujeres con baja ingesta de Ca, pero especialmente a aquéllas con mayor predisposición o riesgo de padecer dicha complicación (50). Sin embargo, el efecto óseo de la suplementación con Ca durante el embarazo ha sido poco estudiado hallándose resultados contradictorios tanto cuando se analiza a las mujeres como cuando se estudian a sus hijos (51–61).

Efecto óseo de la suplementación con Ca en las madres

En un ensayo doble ciego controlado con placebo de suplementación con Ca (1500 mg Ca/día) en mujeres embarazadas en Gambia, África Occidental, con ingestas muy bajas de Ca (350 mg Ca/día), se halló una disminución del CMO y DMO a las 13 y 52 semanas postparto principalmente a nivel de la columna lumbar y la cadera, siendo en todos los casos el descenso mayor en el grupo suplementado con Ca. Sin embargo, otros estudios donde también suplementaron a mujeres con Ca durante el embarazo hallaron un aumento de la DMO y de la formación ósea, siendo mayor en las mujeres que tomaron suplementos que en aquéllas que no lo hicieron (49,55–58). En estos estudios, a diferencia del realizado por Jarjou y colaboradores en Gambia, los suplementos de Ca también se administraron durante la lactancia (49,55,56,58), en algunos casos acompañados de vitamina D (57,58,61) y además las mujeres tenían ingestas de Ca superiores a las de los grupos analizados por Jarjou y colaboradores (600-1100 mg Ca/día). En el estudio llevado adelante por Diogenes y colaboradores se administraron los suplementos de Ca sólo durante el embarazo y se evaluó la masa ósea durante el periodo de lactancia mostrando un aumento de la DMO a las 5 semanas postparto en contraposición al hallazgo

del estudio de Jarjou y colaboradores (57,58,61). Este estudio además de incluir vitamina D junto al suplemento de Ca fue realizado en adolescentes embarazadas. Se sabe que el pico de masa ósea se alcanza alrededor de los 25 años por lo cual el metabolismo mineral entre embarazadas adolescentes y adultas puede ser muy diferente. Además, este efecto positivo sobre la DMO a las 5 semanas postparto no se observa luego de un año postparto. Por consiguiente, el efecto positivo de la suplementación con Ca y vitamina D durante el embarazo parece ser transitorio, no generando beneficios a largo plazo en mujeres adolescentes (61).

Como se plantea en un reciente metaanálisis que reúne los trabajos mencionados anteriormente no es posible extraer conclusiones firmes debido al escaso número de estudios, el bajo número de participantes y la gran cantidad de datos faltantes en los estudios incluidos. Además, estos estudios fueron heterogéneos en términos de ingesta dietética basal de Ca, duración de la suplementación y dosis de Ca, entre otros factores (62). Por lo tanto, se puede decir que el efecto de la suplementación con Ca sobre el metabolismo mineral materno es aún desconocido.

Efecto óseo de la suplementación con Ca en la descendencia

Cuando se analizó a la descendencia de las mujeres de Gambia suplementadas con Ca durante el embarazo hallaron que dicha suplementación no tuvo un efecto significativo sobre las concentraciones de Ca en la leche materna en el período de lactancia subsiguiente y que no proporcionó beneficios significativos a los hijos en términos de peso al nacer, crecimiento o masa ósea (medida por densitometría del radio y cuerpo entero) durante el primer año de vida (63). No obstante, en un seguimiento a largo plazo, hallaron efectos específicos por sexo de la suplementación materna con Ca en la descendencia de entre 8 y 12 años. Las niñas cuyas madres recibieron Ca fueron de estatura más baja, más livianas y con huesos más pequeños y con menos mineral que las niñas del grupo placebo. En contraste, los niños de madres en el grupo de Ca tendieron a tener una mayor circunferencia del brazo medio, más masa grasa y, en general, mayor masa ósea y tamaño que los niños del grupo placebo, aunque estas últimas

diferencias no siempre fueron significativas después de ajustar por tamaño corporal (64).

Estos resultados nuevamente se contradicen con otros estudios que hallaron efectos positivos de la suplementación con Ca durante el embarazo en la DMO de los hijos (65,66); o no hallaron efecto ni positivo ni negativo (62).

Por ejemplo, se ha observado que la suplementación materna con Ca más vitamina D en adolescentes brasileñas con baja ingesta de Ca no afectó las longitudes femorales y humerales fetales a las 36 semanas de gestación. Además, los incrementos en peso y longitud desde el nacimiento hasta las 5 semanas fueron similares en ambos grupos, y no hubo diferencias significativas en la masa, densidad y área ósea a las 5 semanas de vida (67).

Por otro lado, un estudio que evaluó la salud dental de los hijos de las madres suplementadas halló un efecto positivo de los suplementos de Ca durante el embarazo sobre la salud dental en la infancia. Específicamente, el 63,3% de los niños en el grupo de suplementación materna de Ca tenían al menos una pieza dental cariada, perdida u obturada, en comparación con el 86,6% en el grupo placebo. Esto representó una reducción del 27% en el riesgo de desarrollar enfermedades dentales (68).

En resumen, los resultados en la descendencia varían según el parámetro medido y la edad de evaluación. Los efectos sobre la salud ósea temprana (masa ósea neonatal e infantil) no fueron significativos. Sin embargo, el seguimiento a largo plazo (8-12 años) de los niños de Gambia reveló efectos específicos por sexo en el crecimiento y la composición corporal y ósea en la niñez tardía, lo que sugiere una influencia compleja de la suplementación materna con Ca en el desarrollo de la descendencia. A pesar de estos resultados los hallazgos sobre la salud ósea de la descendencia se pueden calificar como no concluyentes debido a la gran variabilidad de las poblaciones estudiadas y a las marcadas diferencias en los esquemas de suplementación en los distintos grupos (62).

2. PREGUNTA E HIPÓTESIS

Por lo tanto, nos preguntamos: ¿La suplementación con Ca durante el embarazo tiene un efecto negativo en la masa ósea de las madres y en el desarrollo óseo de sus hijos?

Como respuesta a esta pregunta nos planteamos la siguiente hipótesis:

La suplementación con Ca en las mujeres embarazadas que están habituadas a una dieta deficiente del mismo afecta en su masa ósea reflejada en una menor DMO comparadas con mujeres que no fueron suplementadas y esto puede deberse a cambios en el metabolismo fosfocálcico.

Además, dicha suplementación, afecta el desarrollo óseo de la descendencia, provocando diferencias en la calidad ósea de la prole de madres adaptadas a una dieta hipocálcica que fueron suplementadas con Ca durante la gestación, cuando se las compara con la descendencia de aquellas que no son suplementadas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar los cambios inducidos por la suplementación con Ca durante la preñez en la calidad ósea y el metabolismo fosfocálcico de animales alimentados con una dieta baja en Ca, así como el impacto en el crecimiento y la calidad ósea de su progenie.

3.2 Objetivos Específicos

Objetivo Especifico 1

Evaluar el impacto de la suplementación con Ca durante la preñez, sobre el tejido óseo materno y el metabolismo fosfocálcico en animales adaptados a una dieta baja en Ca.

Objetivo Especifico 2

Identificar los cambios inducidos por la suplementación con Ca durante la preñez en la calidad y cantidad de tejido óseo en las crías de madres adaptadas a una dieta baja en Ca.

Objetivo Especifico 3

Identificar los cambios inducidos por la suplementación con Ca durante la preñez en el crecimiento óseo y en el metabolismo fosfocálcico de las crías de madres adaptadas a una dieta baja en Ca.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño experimental

Se utilizaron ratas de la línea Wistar Kyoto hembras, de 5 semanas de edad (Laboratorio de Animales de Experimentación, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata). Se dio comienzo al experimento con 18 animales a los que se les administró una dieta baja en Ca (HipoCa; [Ca]= 0,3%) durante 4 semanas. Este periodo de tiempo sirvió para que los animales se adapten al bioterio y a las dietas. Luego, se procedió a armar planteles donde se colocaron 3 hembras por macho para dar lugar al apareamiento. Al momento de armar los planteles las hembras fueron asignadas aleatoria y homogéneamente a uno de dos grupos experimentales, a un grupo se lo llamó “G1 HipoCa o Control” y se les administró la dieta HipoCa durante todo el experimento, al otro grupo se lo llamó “G1 Suplemento” y a estos animales se les administró una dieta con contenido de Ca normal (NormoCa; [Ca]= 1,2 %) desde el apareamiento, durante toda la preñez y hasta el nacimiento de las crías. Al momento en que las hembras del grupo G1 Suplemento tuvieron las crías se les volvió a administrar la dieta HipoCa. Este esquema de cambio de dieta durante la preñez simuló la suplementación con Ca que se realiza en mujeres embarazadas que presentan una dieta deficiente en este mineral.

En ambos grupos de madres se homogeneizó el número de crías un día después del nacimiento, ajustándolo a seis animales por madre. Luego del destete (21 días) se practicó la eutanasia de las madres en cámara de CO₂ previa sedación con xilacina (69).

Quedaron constituidos a su vez dos grupos de crías, en función de si fueron descendencia de las madres del grupo G1 Control o del grupo G1 Suplemento. A estos grupos se los llamó grupo “G2 HipoCa o Control” y grupo “G2 Suplemento” respectivamente. Las crías consumieron dieta NormoCa desde el destete hasta los 25 días de vida, momento en el cual se procedió a la eutanasia.

En la Figura 12 se muestra un esquema de la administración de las dietas y los tiempos correspondientes por etapa.

grupos	ADAPTACIÓN	PREÑEZ	LACTANCIA	
G1 Control	HipoCa	HipoCa	HipoCa	
G1 Suplemento	HipoCa	NormoCa	HipoCa	
G2 Control			Leche materna	NormoCa
G2 Suplemento			Leche materna	NormoCa

Tiempo del experimento (semanas)	0	4	7	10	10,6
				Eutanasia madres (G1)	Eutanasia crías (G2)

Figura 12. Esquema de administración de dietas (NormoCa o HipoCa) en función de las etapas atravesadas (Adaptación al bioterio y a la dieta; Preñez y Lactancia) para los grupos de las madres (G1) y de las crías (G2).

Si bien se comenzó el experimento con un total de 18 animales (n=9 por grupo), en el grupo G1 Control se preñaron 6 hembras de un total de 9 (67%), mientras que en el grupo G1 Suplemento fueron 8 de 9 (89%). Debido a esto y a que las distintas técnicas empleadas en esta tesis tienen dificultades diferentes en cuanto a la obtención de muestras y al procesamiento de estas, el n por grupo empleado en cada técnica se incluye en los resultados.

4.2 Descripción de los procedimientos y de las técnicas realizadas

Animales y dietas

Los animales se alojaron en el bioterio del Laboratorio de Biología Ósea (Facultad de Ciencias Médicas, UNR) en racks ventilados con agua y alimento balanceado *ad libitum*. Durante el tiempo que duró el experimento las ratas se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada entre 23-25°C, con un ciclo de 12h de luz seguidas de 12h de oscuridad y circulación de aire filtrado a intervalos de tiempo programados. El alimento fue elaborado por el equipo de trabajo acorde a las normas internacionales AIN93 con diferentes niveles de Ca, en la Tabla 1 se muestran todos los ingredientes utilizados y sus cantidades correspondientes (70). Los animales que se utilizaron, como se mencionó anteriormente, fueron provistos por el bioterio de La Plata, donde consumieron hasta las 5 semanas de vida una dieta comercial ACA de nutrición animal que

contiene entre 1-1,4 % de Ca, por lo cual se decidió emplear una concentración de Ca igual a 0,3 % para realizar la dieta HipoCa y una concentración igual a 1,2 % para realizar la dieta NormoCa.

Ingredientes	g/Kg de alimento	
	AIN 93G	AIN 93M
Almidón de Maíz	397,5	465,7
Caseína	200	140
Sacarosa	115	100
Maltodextrina	132	155
Aceite de soja /girasol	70	40
Celulosa / Salvado de Trigo	50	50
Mezcla de minerales	20	35
Mezcla de vitaminas	10	10
L- Cistina	3	2
Bitartrato de colina	2,5	3
CaCO ₃ en la dieta HipoCa	7,5	7,5
CaCO ₃ en la dieta NormoCa	30	30

Tabla 1. Ingredientes de la dieta balanceada para roedores AIN-93G, formulado para crecimiento, y AIN-93M, para mantenimiento. Los ingredientes marcados en rosa fueron iguales tanto para la dieta HipoCa como para la dieta NormoCa. El único ingrediente diferencial fue el contenido de carbonato de calcio (CaCO₃) marcado en celeste para la dieta HipoCa y en azul para la dieta NormoCa.

El tratamiento, mantenimiento y el control del estado general de los animales fue realizado por miembros del proyecto de investigación, con la debida capacitación en las técnicas a utilizar. Todos los experimentos que involucraron animales se

llevaron a cabo bajo las normas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio (71,72).

Obtención de muestras

Al momento de la eutanasia de las madres se procedió a la obtención de muestras de sangre por punción cardíaca. Además, luego de la eutanasia se obtuvieron, de cada animal, un segmento del duodeno, ambas tibias, ambos fémures, las vértebras lumbares L2 y L4 y las vértebras torácicas T8 y T9. El duodeno se empleó inmediatamente para el análisis de la absorción de Ca, las tibias y las vértebras torácicas se colocaron en formol PBS 10%, se almacenaron a temperatura ambiente y se utilizaron para el análisis densitométrico, además las tibias también se usaron para el análisis histológico. Las vértebras L2 y L4 y ambos fémures se envolvieron en gasa embebida con solución fisiológica y se conservaron a -20°C para realizar los análisis de morfometría y biomecánica.

De los grupos de las crías también se obtuvo sangre por punción cardíaca al momento de la eutanasia y posteriormente se obtuvieron, de cada animal, ambas tibias, ambos fémures y las dos hemimandíbulas. Las tibias primero se fijaron en formol PBS 10% (72 h) y luego se conservaron en alcohol 70% a temperatura ambiente, posteriormente se utilizaron para el análisis histológico y densitométrico. Los fémures y las hemimandíbulas se conservaron a -20°C envueltos en gasas embebidas en solución fisiológica para realizar los análisis de morfometría y de biomecánica.

Las muestras de sangre de ambas generaciones se utilizaron para obtener el plasma y realizar las correspondientes determinaciones bioquímicas.

Captación intestinal de Ca

La absorción intestinal de Ca se evaluó por medio de la técnica de sacos duodenales evertidos en las madres (G1). Inmediatamente después de la eutanasia se realizó una laparotomía de 3-4 cm y se extrajo el segmento proximal del duodeno, para lo cual se localizó el píloro (que está ubicado debajo del estómago, debajo del lóbulo izquierdo del hígado y parcialmente cubierto por el bazo) y se cortó a ese nivel, se separó con cuidado de su mesenterio, para no ocasionar lesiones en el tejido. Una vez que se completó esta separación, se

buscó un punto de alta resistencia debido a la presencia del ligamento de Treitz (aproximadamente a los 9 cm del píloro) donde se marcó el final del duodeno. Una vez extraído el segmento proximal, sin preservar la irrigación ni la inervación, se evertió y se eliminó el contenido intestinal para evitar interferencias. La eversión del segmento intestinal se hizo introduciendo el embolo de una jeringa, luego se ató un extremo y se retiró el segmento desde el otro extremo quedando así la superficie mucosa expuesta y la superficie serosa en el interior (Figura 13 – panel A).

En el interior del saco, en contacto con la superficie serosa, se colocó una solución buffer sin Ca (Tris 1mM: MgCl₂ 1M, glucosa 160 mM). Luego se seccionó en dos fragmentos constituyendo dos sacos por cada segmento duodenal extraído (Figura 13 – panel B).

La superficie mucosa (exterior) fue expuesta a una solución de igual composición que la solución interna con el agregado de 500 mg/L de CaCl₂. Los sacos fueron incubados en esta solución durante 30 minutos a 37°C (Figura 13 – panel C).

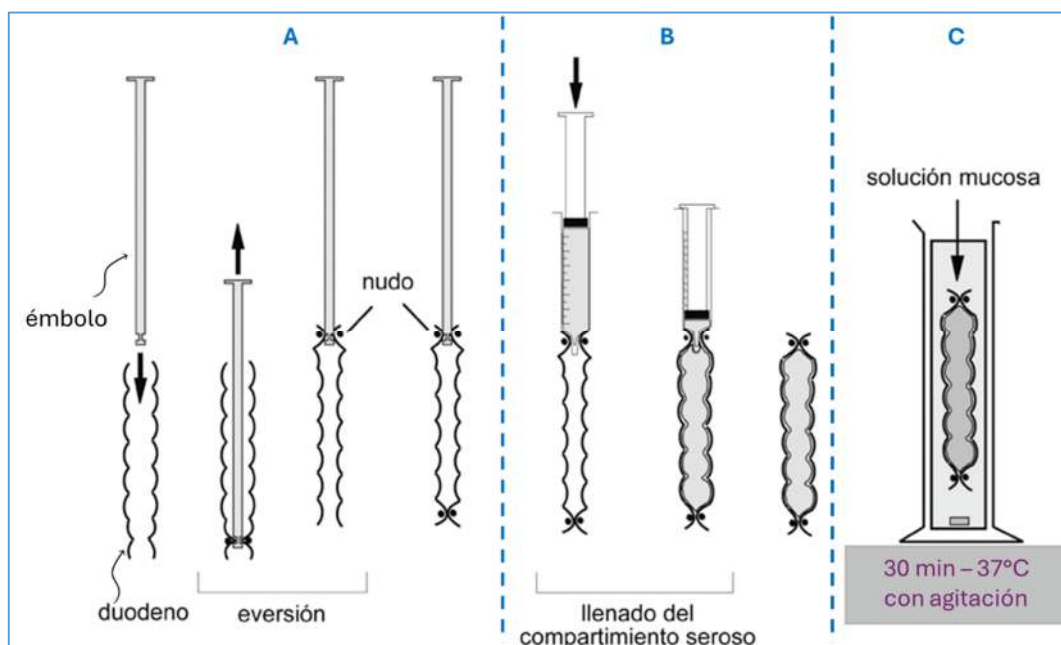


Figura 13. Representación esquemática de la técnica de sacos duodenales evertidos. Panel A: Se colocó el embolo de una jeringa de 1mL en el segmento de duodeno y se realizó una ligadura, con la ayuda del embolo se realizó la eversión del segmento de duodeno. Panel B: Se introdujo una solución buffer sin contenido de Ca sobre el extremo libre y finalmente se

ligó para contener la solución. Se seccionó el segmento en dos fragmentos iguales (no mostrado). Panel C: Se incubaron los fragmentos a 37°C en una solución buffer con CaCl₂ 500mg/l con agitación (imagen adaptada de referencia (73)).

Al final del período de incubación se recolectó una muestra del compartimento seroso y posteriormente se le determinó la concentración de Ca. Con este valor y el tiempo de incubación se calculó la tasa de absorción de Ca en mg/min (73).

Para la determinación de la concentración de Ca se utilizó un kit comercial Ca-color AA (Wiener Lab Rosario). El método se fundamenta en la reacción del Ca con la o-cresolftaleina complexona a pH 10,8 que produce un complejo de color magenta cuya absorbancia a 570 nm se midió utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11. Se construyó una curva de calibración con una solución patrón de 10 mgCa/dL y por extrapolación se determinó la concentración de Ca en las soluciones.

Resistencia ósea

Para determinar la resistencia ósea se utilizaron los fémures (G1 y G2), las vértebras lumbares L2 y L4 (G1) y las hemimandíbulas (G2), conservadas a -20°C, cuyas propiedades biomecánicas fueron evaluadas utilizando un instrumento diseñado por el Laboratorio de Biología Ósea. Este equipo cuenta con una celda de carga de 200 N de capacidad máxima, con sensibilidad de 0,01 N y una precisión de 10 micras para el desplazamiento. Al someter al hueso a la acción de una fuerza se produce un desplazamiento que genera un voltaje que es proporcional a la fuerza aplicada. Los valores de voltaje y desplazamiento son adquiridos por un software de desarrollo propio (Biomedical data acquisition suite 1.0). El software transforma los datos de voltaje a fuerza y luego calcula las siguientes variables biomecánicas: la energía absorbida (área bajo la curva), variables de comportamiento plástico como la fuerza máxima soportada (F_{máx}) y fuerza de fractura (F_x) y de comportamiento elástico como la rigidez del hueso (pendiente de la zona lineal de la gráfica). Todos estos parámetros se muestran en la Figura 14.

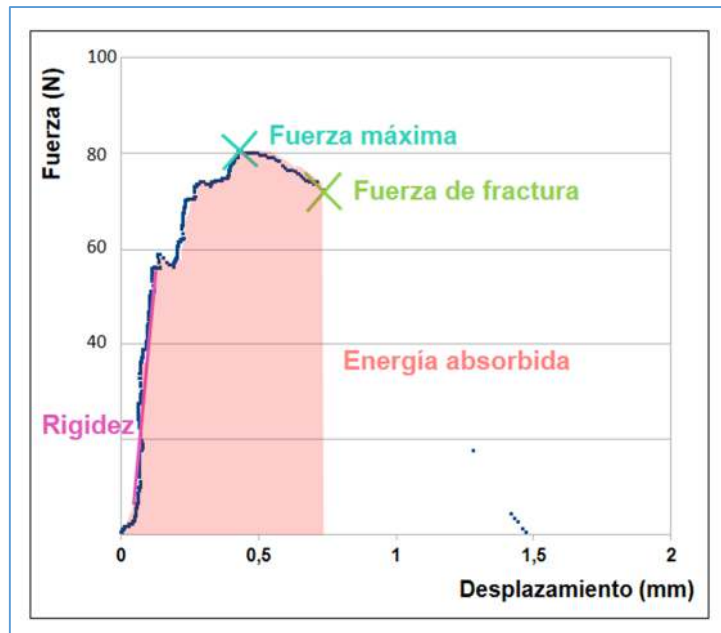


Figura 14. Ejemplo de gráfico de Fuerza (N) en función del Desplazamiento (mm) arrojado por el software Biomedical data acquisition suite 1.0. La rigidez del hueso es equivalente a la pendiente de la zona lineal inicial, el punto de fuerza máxima soportada por el hueso corresponde al punto máximo de fuerza registrado y el punto de fuerza de fractura corresponde al punto donde la gráfica cambia drásticamente la pendiente, luego de la fuerza máxima. El área bajo la curva hasta el punto de fuerza de fractura es equivalente a la energía absorbida por el hueso.

Se realizaron dos tipos de ensayos en función de la pieza ósea a analizar, tanto los fémures como las hemimandíbulas se analizaron mediante el ensayo de flexión a tres puntos y las vértebras mediante el ensayo de compresión. En todos los casos la fuerza se ejerció sobre el punto medio del hueso, a una velocidad constante de 0,012 mm/s, hasta producirse su fractura o deformación de manera permanente.

Fémures: se colocó el hueso en una posición horizontal sobre dos puntos de apoyo separados a una distancia conocida (G1: 12,5 mm, G2: 9,5mm), el tercer punto es el que aplica una fuerza constante de forma perpendicular al largo del hueso como se muestra en el panel A de la Figura 15.

Mandíbulas: se colocó la pieza de manera paralela al plano del equipo con el lado lingual hacia arriba, el punto central del equipo fue alineado sobre el cuerpo mandibular a la altura del segundo molar, sitio donde se aplicó la fuerza

constante. Los puntos de apoyo se colocaron separados por 10,5 mm como se muestra en el panel B de la Figura 15.

Vertebras: Utilizando un accesorio con punta plana redonda de 2,5 mm de diámetro las vértebras fueron sometidas a una fuerza progresiva en la zona trabecular (cuerpo de la vértebra), en este tipo de ensayo las piezas óseas se apoyan directamente sobre la celda de carga como se muestra en el panel C de la Figura 15.

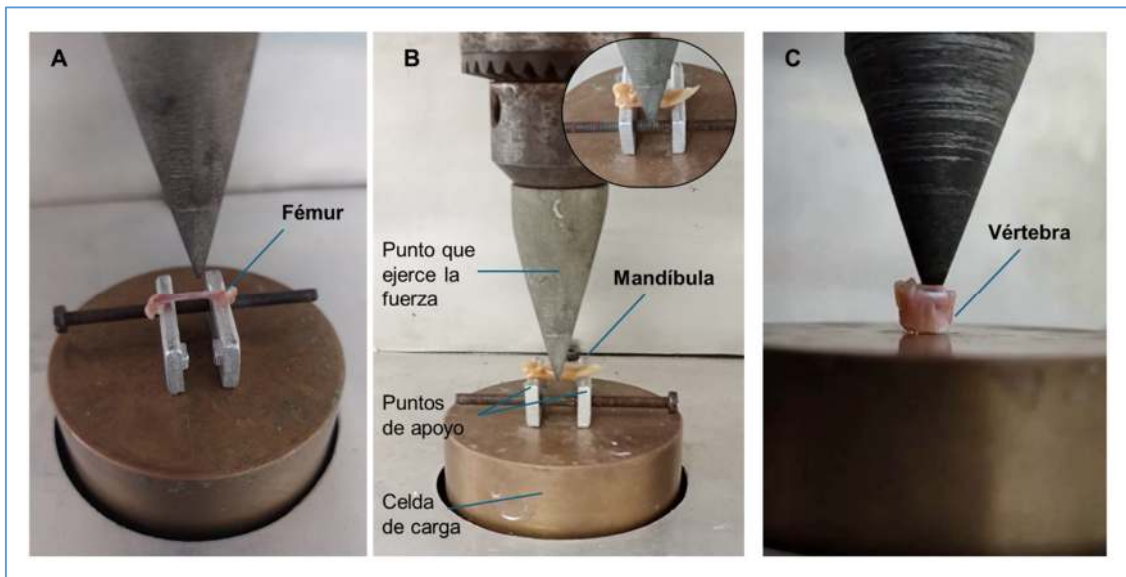


Figura 15. Disposición de cada una de las piezas óseas en el equipo de biomecánica. En el panel A: fémur y panel B: mandíbula, se observa la disposición de los dos puntos de apoyo para realizar el ensayo de flexión a tres puntos, donde el tercer punto es el que ejerce la fuerza. En el panel C: vértebra, se observa la disposición necesaria para realizar el ensayo de compresión.

Con los datos extraídos del gráfico y las variables morfométricas (explicados en la siguiente sección) se pueden calcular los parámetros biomecánicos: deformación y tensión, y con ellos, el módulo de Young o de elasticidad que son propios del material con el que está constituido el hueso, es decir, es una medida de la rigidez del material y de su capacidad para resistir la deformación elástica bajo carga. Un mayor módulo de Young indica que el hueso está constituido por un material más rígido y menos deformable, mientras que un módulo de Young más bajo indica que el material es más flexible.

Dimensiones óseas macroscópicas

Sobre los fémures (G1 y G2) y las hemimandíbulas (G2) que estaban conservados a -20°C se realizaron mediciones morfométricas para evaluar el crecimiento óseo a nivel macroscópico.

Primero se midió la longitud de los fémures con un calibre (Stainless Hardened, USA), tomando la distancia desde el trocánter mayor hasta el cóndilo como se muestra en la Figura 16.

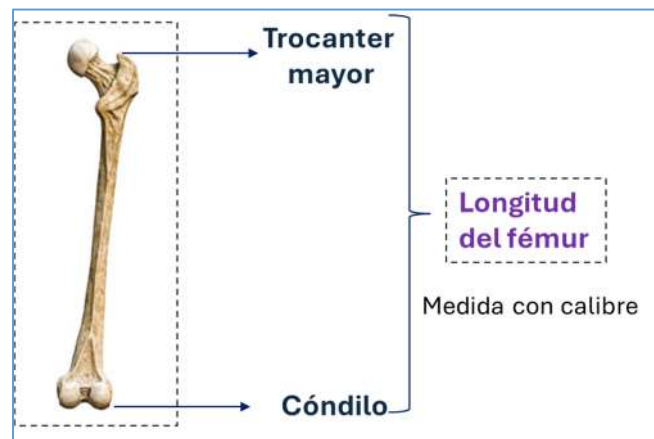


Figura 16. Medida morfométrica del largo del fémur que se obtuvo midiendo desde el trocánter mayor hasta el cóndilo usando un calibre Stainless Hardened.

Luego los fémures se utilizaron para realizar el ensayo de biomecánica descrito anteriormente y una vez finalizado este ensayo se procedió a cortar una sección transversal de 2,5 mm de espesor en una zona lo más cercana posible al punto de fractura de las piezas (aproximadamente al 50% de la diáfisis), las cuales fueron fotografiadas junto a un patrón de longitud, utilizando una lupa y una cámara (Touptek XCAM1080PHA). Las fotografías se analizaron empleando el software Image J 1.40. Se procedió a delimitar con la herramienta “*polygon selection*” el perímetro perióstico y el perímetro endóstico (zona medular). Por otro lado, considerando la geometría irregular del fémur, para determinar las medidas de los diámetros (interno y externo) se tomaron 4 medidas individuales que luego fueron promediadas (Figura 17).

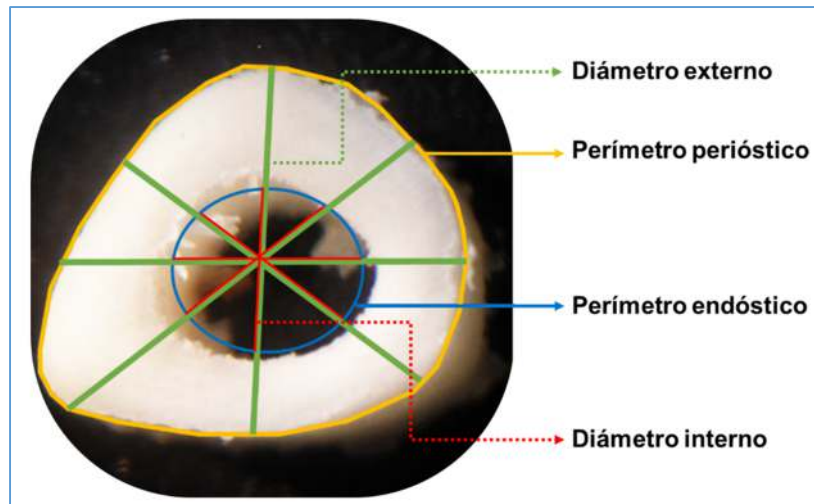


Figura 17. Fotografía con lupa de cortes transversales de 2,5 mm de espesor del fémur. Se esquematiza el perímetro externo o perióstico (amarillo), perímetro interno o endóstico (azul), los 4 diámetros externos (verde) y los 4 diámetros internos (rojo).

Además, calculando el área delimitada por el perímetro perióstico y restándole el área delimitada por el perímetro endóstico (área medular) se obtuvo el área de hueso cortical.

Las hemimandíbulas también fueron fotografiadas junto a un patrón de longitud y se analizaron las imágenes obtenidas con el software Image J 1.40. Se tomaron como referencias anatómicas los siguientes puntos (Figura 18):

- A: punto medio del cóndilo
- B: punto más posterosuperior de la apófisis coronoides
- C: punto más posterior de la mandíbula
- D: punto más inferior de la rama ascendente mandibular
- O: punto más anteroinferior de la mandíbula

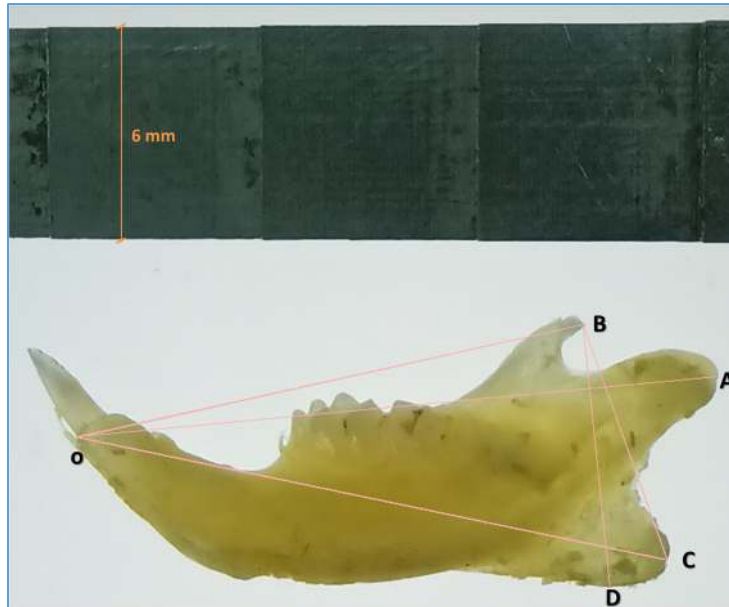


Figura 18. Referencias anatómicas para las medidas en hemimandíbula. O: punto más anteroinferior de la mandíbula; A: punto medio del cóndilo; B: punto más posterosuperior de la apófisis coronoides; C: punto más posterior de la mandíbula; D: punto más inferior de la rama ascendente mandibular. En la parte superior de la imagen se observa un patrón de longitud cuyo ancho mide 6 mm.

Utilizando estas referencias se determinaron: la longitud mandibular (O-A), la longitud de la base de la mandíbula (O-C), la altura de la mandíbula (B-D) y el área mandibular ($\triangle OBC$).

Densidad mineral ósea

Sobre las tibias (G1 y G2) y las vértebras torácicas (G1) conservadas en formol PBS 10% o en etanol 70% según correspondiera, se realizaron densitometrías empleando el equipo Hologic Discovery WI con software APEX4 para pequeños animales. Para ello se colocó la tibia izquierda sobre la placa del equipo y por absorciometría dual de rayos X (DXA) se obtienen los valores de CMO y del área total medida, con los que posteriormente se calcula automáticamente la DMO empleando un patrón interno. En la Figura 19 se observa una fotografía del informe que arroja el equipo con los datos que se obtienen durante el proceso.

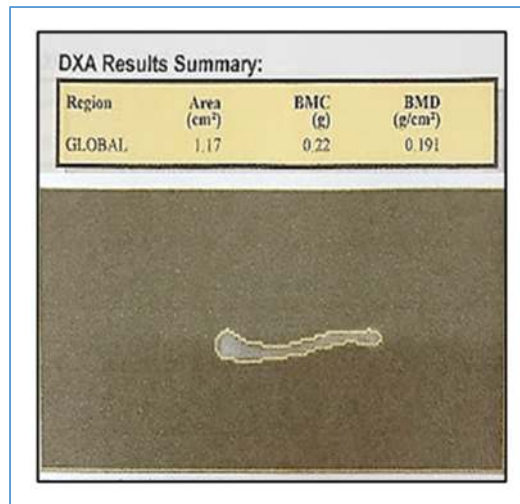


Figura 19. Ejemplo de un informe obtenido por DXA (absorciometría dual de rayos X). Se muestra la imagen del hueso en estudio obtenida con el equipo sobre la cual se delimita el área de medición (línea amarilla). En la parte superior la información brindada por el software (Área expresada en cm², BMC: contenido mineral óseo expresado en g y BMD: densidad mineral ósea expresada en g/cm²)

Histomorfometría y conectividad del tejido trabecular

Luego del análisis de DMO las tibias (G1 y G2) se utilizaron para realizar cortes histológicos. Como las tibias fueron almacenadas en formol-PBS (G1) o previamente fijadas y luego almacenadas en etanol 70% (G2) se procedió directamente al paso de descalcificación en EDTA 10% por 30 a 35 días, dependiendo del tamaño del hueso. Posteriormente se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos que se colorearon con hematoxilina-eosina (H&E). Luego se tomaron fotografías de los cortes a 40x con una escala milimétrica en microscopio para evaluar el hueso trabecular sobre imágenes digitalizadas utilizando el software Image J 1.4. El área de medición se determinó utilizando el cartílago de crecimiento como referencia. A partir de este punto, se midió una distancia de 1 mm para los cortes de la G1 y 0,5 mm para G2 y se delimitó un rectángulo con un área de 2 mm² en G1 y 0,125 mm² en G2, esta fue tomada como el área total de tejido analizado (TV) y delimitando todas las trabéculas en ese sector (Figura 20 – panel A) se determinó el área ocupada por hueso trabecular (BV) y el perímetro de dicha área (BS). Con estos valores se calculó: el porcentaje de tejido óseo BV/TV (%), el grosor trabecular (Tb.Th (μm) = $2/(BS/BV)$), el número de trabéculas (Tb.N (1/mm) = $[(BV/TV)/(Tb.Th)]$) y la

separación trabecular ($Tb.Sp (\mu m) = [(1/Tb.N)-Tb.Th]$) (74). Además, se realizó el estudio de conectividad trabecular, para ello se procedió a la “esqueletonización” de la estructura de cada una de las trabéculas óseas (Figura 20 – panel B). De esta manera se midieron los siguientes parámetros: los extremos de las trabéculas o número de terminales (Tm), número de nodos que son los puntos de conexión entre dos trabéculas (Nd), número y longitud de ramas nodo-nodo (NNd), número y longitud de ramas nodo-terminal (NNdTm), número de árboles (T) y número de ramas con 2 terminales (Ntm). Con estos parámetros se procedió al cálculo de los índices de conectividad NDX e ICI, que combinan parámetros de conectividad con parámetros histomorfométricos, a mayor NDX o ICI mejor estructura y calidad ósea (75,76). Las ecuaciones de cálculo de los parámetros de conectividad se muestran a continuación:

$$ICI = (Nd * NNd) / (T * (NNdTm + 1))$$

$$NDX = (R * NNd * BVTV * TbTh) / ((Ntm + NNdTm) * Dist * TbSp)$$

Dentro de la fórmula para el cálculo del NDX se encuentran los parámetros R y Dist, que se calculan de la siguiente manera:

$$R = Nd / Tm$$

$$Dist = (suma\ de\ la\ longitud\ de\ [NTm + NNdTm + NNd]) / (NNdTm + NNd + Ntm)$$

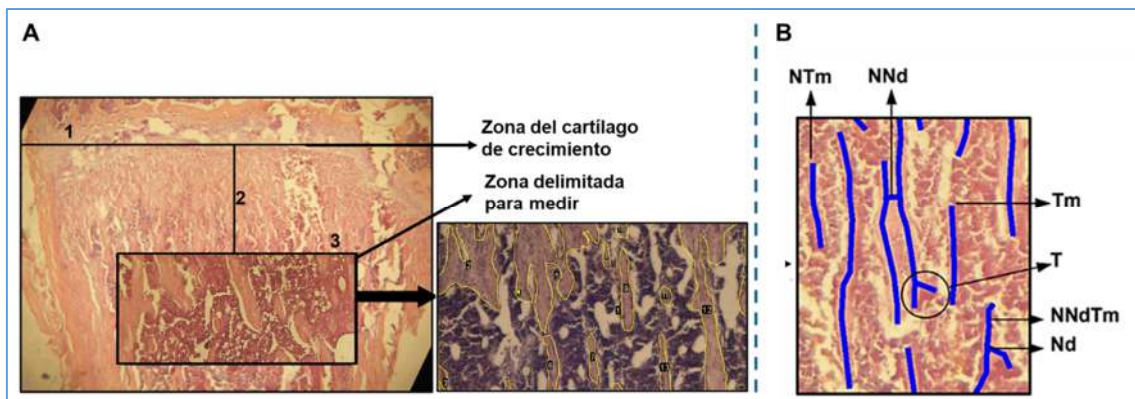


Figura 20. Fotografías de los cortes histológicos de las tibias (H&E, 40X). **Panel A:** se muestra como se hace la selección del área a medir: (1) se toma como referencia el cartílago de crecimiento, (2) luego se marca la distancia necesaria para llegar al hueso esponjoso primario y en ese punto se define el área a medir marcándola con un rectángulo de área estipulada (3). En el acercamiento de esta área se visualiza como se delimitan las trabéculas

(líneas amarillas). **Panel B:** Se muestra el resultado de la esqueletonización de las trabéculas y los parámetros de conectividad trabecular: número de ramas con 2 terminales (NTm), número y longitud de ramas nodo-nodo (NNd), extremos de una trabécula (Tm), número de árboles (T), número y longitud de ramas nodo-terminal (NNdTm) y número de nodos (Nd).

Parámetros bioquímicos

Las muestras de sangre extraídas por punción cardiaca en el momento de la eutanasia se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos para separar el plasma de las células sanguíneas. El plasma recolectado se utilizó para determinar la calcemia, la fosfatemia y la actividad de la fosfatasa alcalina. Para dichas determinaciones se utilizaron kits comerciales de Wiener lab gentilmente cedidos por la empresa y el espectrómetro UV/visible Perkin Elmer Lambda 11.

La concentración de Ca en el plasma se determinó con el kit Ca AA-color, cuyo fundamento fue explicado en la sección “Captación intestinal de Ca”.

La cantidad de fósforo inorgánico en el plasma se determinó usando el kit Fosfatemia UV AA. El método se fundamenta en la reacción del fósforo con el molibdato en medio ácido que da como resultado un complejo que absorbe luz a 340 nm. Simultáneamente se procesó una solución patrón de 4 mg/dL con la que se construyó una curva de calibración.

La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) plasmática se determinó utilizando el kit ALP 405 cinético, línea líquida. La técnica se fundamenta en la medida del cambio de absorbancia a 405 nm, generado por la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato en medio alcalino por la enzima presente en el plasma. Los resultados se obtuvieron en U/L.

Análisis estadísticos de los resultados

El procesamiento estadístico de los datos se realizó con diferentes paquetes estadísticos del software R 3.3.3 y GraphPad Prism 8. Primero se analizó la distribución de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba F de comparación de varianzas. Una vez confirmada la distribución normal y la homogeneidad de varianzas se realizaron las comparaciones entre los grupos empleando el análisis de t-Student o t-

Student con corrección de Welch en caso de no pasar la prueba de homogeneidad de varianzas. En todos los ensayos se utiliza un nivel de significación del 5%. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y a ciegas.

5. RESULTADOS

5.1 Objetivo Específico 1

Evaluar el impacto de la suplementación con Ca durante la preñez, sobre el tejido óseo materno y el metabolismo fosfocálcico en animales adaptados a una dieta baja en Ca.

Resistencia ósea de fémures y vertebras (G1)

En la Tabla 2 se muestran los resultados de los distintos parámetros biomecánicos obtenidos en los ensayos de flexión a tres puntos realizados sobre los fémures y los de compresión realizados sobre las vértebras (L2 y L4), de ambos grupos de madres (G1 Control, n=6; G1 Suplemento, n=8). Los mismos fueron comparados utilizando el análisis de t-Student (con corrección de Welch para la Fuerza de fractura del fémur) y si bien todos los parámetros del grupo G1 Suplemento tienden a ser más bajos que los del grupo G1 Control, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas sobre ninguna de las propiedades biomecánicas de las muestras óseas. Es decir, que la suplementación con Ca durante la preñez en ratas adaptadas a una dieta deficiente de este ion no modificó las propiedades biomecánicas de sus fémures y vertebras.

		GRUPOS	
		CONTROL	SUPLEMENTO
	VARIABLES		
FLEXIÓN A TRES PUNTOS (fémures G1)	Fuerza de fractura (N)	85,69 ± 2,08	82,79 ± 5,34
	Fuerza máxima (N)	92,12 ± 2,76	88,03 ± 4,32
	Rigidez (N/mm)	395,76 ± 26,25	362,35 ± 20,43
	Energía Absorbida (mJ)	48,42 ± 8,79	43,78 ± 4,68
	Módulo de Young (Mpa)	5366,14 ± 480,81	4409,95 ± 200,18
COMPRESIÓN VERTEBRAL (L2 y L4 G1)	Fuerza de fractura (N)	82,94 ± 8,04	74,86 ± 5,95
	Rigidez (N/mm)	202,36 ± 18,99	156,26 ± 10,47
	Energía Absorbida (mJ)	68,97 ± 11,14	64,25 ± 10,17

Tabla 2. Parámetros biomecánicos de fémures y vértebras de las madres (G1). Los parámetros biomecánicos se expresan como media \pm error estándar. No se observan diferencias significativas entre los grupos (t-Student, $p > 0,05$; corrección de Welch en fuerza de fractura fémur).

Análisis morfométricos de fémures (G1)

Se calculó la media y error estándar de las variables morfométricas de la sección transversal obtenida al 50% del largo de los fémures de las madres para cada grupo experimental (G1 Control, n=6; G1 Suplemento, n=7) y se compararon utilizando la prueba de t-Student. Como se muestra en la Tabla 3 no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo G1 Suplemento y el grupo G1 Control ($p > 0,05$). Por lo cual se puede resaltar que la suplementación con Ca durante la preñez no modificó las variables morfométricas óseas de los fémures de las madres.

		GRUPOS	
		CONTROL	SUPLEMENTO
MORFOMETRÍA FÉMUR (G1)	VARIABLES		
	Área total (mm ²)	8,13 \pm 0,50	8,28 \pm 0,17
	Área medular (mm ²)	3,21 \pm 0,22	3,23 \pm 0,10
	Área cortical (mm ²)	4,93 \pm 0,28	5,05 \pm 0,10
	Perímetro perióstico (mm)	51,38 \pm 1,79	49,65 \pm 0,73
	Perímetro endóstico (mm)	43,06 \pm 0,74	43,56 \pm 1,32
	Diámetro externo (mm)	3,25 \pm 0,11	3,28 \pm 0,04
	Diámetro interno (mm)	2,65 \pm 0,09	2,67 \pm 0,03
Ancho cortical (mm)	0,60 \pm 0,02	0,62 \pm 0,01	

Tabla 3. Variables Morfométricas. Se presentan la media y error estándar de las variables morfométricas medidas en los grupos experimentales G1 Control y G1 Suplemento. No se observan diferencias significativas entre los grupos (t-Student, $p > 0,05$).

Evaluación de la DMO en tibias y vertebras (G1)

Se calcularon la media y el error estándar de la DMO de las tibias analizadas por DXA (G1 Control, n = 6; G1 Suplemento, n = 8). Los resultados obtenidos fueron:

G1 Control = $0,2052 \pm 0,004$ g/cm² y G1 Suplemento = $0,2071 \pm 0,006$ g/cm². Estos se compararon mediante la prueba t-Student y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). En la Figura 21 se representan los valores obtenidos para cada grupo experimental.

Densidad mineral ósea tibias (G1)

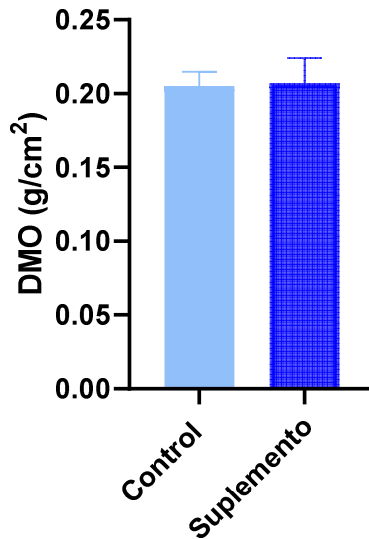


Figura 21. Densidad mineral ósea. Las barras muestran la media y error estándar de la DMO en los grupos experimentales G1 Control y G1 Suplemento. No se observan diferencias estadísticamente significativas (t-Student, $p > 0,05$).

En la Figura 22 se representan la media y el error estándar de la DMO de las vértebras analizadas por DXA en los grupos experimentales G1 Control ($0,1483 \pm 0,009$ g/cm²) y G1 Suplemento ($0,1429 \pm 0,006$ g/cm²) (G1 Control, n=6; G1 Suplemento, n=8). Estos valores se compararon mediante la prueba de t-Student y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Densidad mineral ósea vertebras (G1)

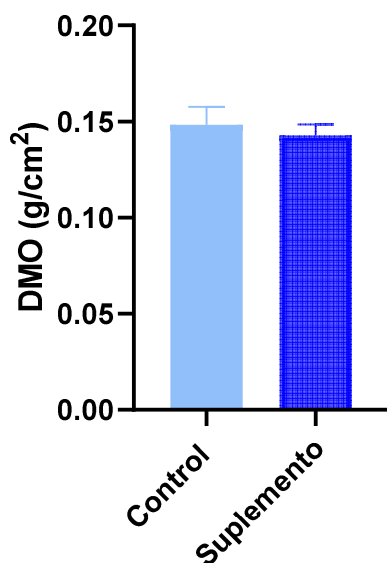


Figura 22. Densidad mineral ósea. Las barras muestran la media y error estándar de la DMO de las vértebras en los grupos experimentales G1 Control y G1 Suplemento. No se observan diferencias estadísticamente significativas (*t* Student, $p > 0,05$).

Con estos análisis podemos confirmar que la suplementación con Ca durante la preñez no modificó la DMO de las tibias ni de las vértebras de ratas Wistar Kyoto suplementadas con respecto a aquéllas que no recibieron suplementación.

Histomorfometría y conectividad del tejido trabecular en tibias (G1)

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para los parámetros calculados en el análisis histomorfométrico que se realizó en los cortes histológicos (H&E) de las tibias de las madres (G1 Control, $n=6$; G1 Suplemento, $n=8$). Los datos se expresaron como media y error estándar y fueron comparados mediante la prueba de *t*-Student (con la corrección de Welch para los parámetros ICI y NDX). Si bien se observa que los parámetros del grupo G1 Suplemento como el volumen óseo trabecular (%BV/TV) y sus parámetros asociados: número de trabéculas y espesor trabecular (TbN, TbTh) tienden a ser más bajos que en el grupo G1 Control, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos. Tampoco hubo diferencias significativas en la separación trabecular (TbSp), ni en los parámetros de conectividad trabecular (ICI y NDX) aunque estos últimos tienden a ser más altos en el grupo G1 Suplemento.

		GRUPOS	
VARIABLES		CONTROL	SUPLEMENTO
HISTOMORFOMETRÍA TIBIAS (G1)	%BV/TV	13,53 ± 2,75	8,60 ± 1,20
	TbN (mm ⁻¹)	3,57 ± 0,60	2,45 ± 0,31
	TbTh (µm)	0,040 ± 0,003	0,030 ± 0,003
	TbSp (µm)	0,28 ± 0,05	0,52 ± 0,18
	NDX (%/mm)	0,73 ± 0,33	1,17 ± 0,64
	ICI	0,41 ± 0,23	0,66 ± 0,40

Tabla 4. Parámetros histomorfométricos de las tibias (G1). Se muestran la media y error estándar de todos los parámetros analizados (t-Student, $p > 0,05$; corrección de Welch en ICI y NDX). No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Evaluación de la absorción intestinal de Ca (G1)

La tasa de absorción intestinal de calcio (mg Ca/min) se determinó por duplicado (dos sacos por animal) y se empleó la media de ambos valores para cada animal (G1 Control, n = 6; G1 Suplemento, n = 7). Para el cálculo se consideró el volumen de la solución interna (en contacto con la superficie serosa del intestino), la concentración de calcio medida y el tiempo de incubación. Los datos se informaron como media ± error estándar (mg Ca/min= G1 Control: 3,172 ± 0,005 y G1 Suplemento: 3,176 ± 0,005), se compararon con un análisis de t-Student y no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados como se muestra en Figura 23. Por lo cual se puede decir que no se ve afectada la absorción intestinal de Ca con la administración de suplementos de Ca durante la preñez.

Tasa de absorción de Ca (G1)

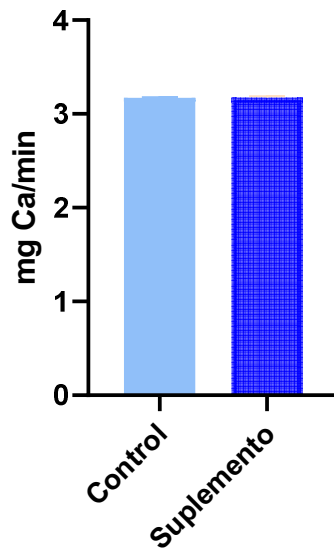


Figura 23. Tasa de absorción de Ca (G1). Las barras muestran la media y error estándar de la tasa de absorción de Ca. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (*t*-Student, $p > 0,05$).

Evaluación de parámetros relacionados al metabolismo fosfocálcico (G1)

Se realizaron las determinaciones de Ca, fosfato y ALP en los plasmas de las madres, las muestras se procesaron por duplicado para cada animal y se informan los valores de media y error estándar para cada grupo ($n=6$ para cada grupo). En la Figura 24 se observan los resultados obtenidos para la concentración plasmática de Ca (mg/dL = G1 Control: $9,902 \pm 0,414$ y G1 Suplemento: $9,588 \pm 0,659$) (panel A); la concentración de fosfato (mg/dL = G1 Control: $11,910 \pm 1,194$ y G1 Suplemento: $10,940 \pm 1,469$) (panel B) y la actividad de la enzima ALP plasmática (U/L = G1 Control: $75,130 \pm 2,739$ y G1 Suplemento: $58,820 \pm 12,510$) (panel C). Estos valores fueron comparados con un análisis de *t*-Student (con corrección de Welch para ALP) y no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) para ninguno de los parámetros medidos.

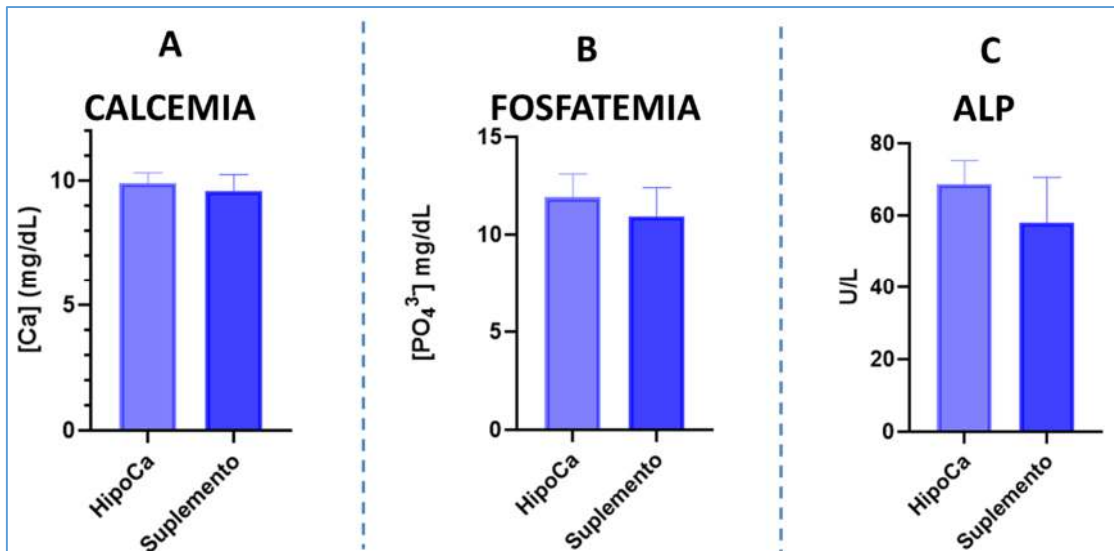


Figura 24. Resultados de los parámetros relacionados con el metabolismo fosfocálcico medidos en las madres (G1). Panel A: calcemia en mg/dL; Panel B: fosfatemia en mg/dL y panel C: actividad de fosfatasa alcalina (ALP) en U/L. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos G1 Hipo Ca (control) y G1 Suplemento en ninguno de los parámetros analizados (*t*-Student, $p > 0,05$; corrección de Welch en ALP).

5.2 Objetivo Específico 2

Identificar los cambios inducidos por la suplementación con Ca durante la preñez en la calidad y cantidad de tejido óseo en las crías de madres adaptadas a una dieta baja en Ca.

Resistencia ósea de los fémures y las hemimandíbulas (G2)

En la Tabla 5 se muestran los resultados de los distintos parámetros biomecánicos obtenidos en los ensayos de flexión a tres puntos realizados sobre los fémures y las hemimandíbulas de ambos grupos de crías (G2 Control, $n=13$; G2 Suplemento, $n=11$). Los datos fueron analizados mediante la prueba de *t*-Student. Se observó una tendencia consistente en la que los valores correspondientes al grupo G2 Suplemento fueron superiores a los del grupo G2 Control en todos los parámetros analizados, principalmente en los fémures. Sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Es decir, la suplementación con Ca durante la preñez en ratas adaptadas a una dieta deficiente en este ion no modificó las propiedades biomecánicas de los fémures ni de las hemimandíbulas de su descendencia.

	VARIABLE	GRUPOS	
		CONTROL	SUPLEMENTO
FÉMURES (G2)	Fuerza de Fractura (N)	8,37 ± 2,62	10,61 ± 4,07
	Fuerza Máxima (N)	8,74 ± 2,61	11,02 ± 4,04
	Rigidez (N/mm)	18,39 ± 10,83	24,95 ± 13,37
	Energía Absorbida (mJ)	5,04 ± 1,35	6,45 ± 1,72
	Módulo de Young (Mpa)	371 ± 205	536 ± 244
HEMIMANDÍBULAS (G2)	Fuerza de Fractura (N)	12,70 ± 0,81	13,79 ± 0,83
	Fuerza Máxima (N)	13,12 ± 0,74	14,56 ± 0,92
	Rigidez (N/mm)	30,49 ± 1,72	31,81 ± 1,88
	Energía Absorbida (mJ)	10,48 ± 0,72	12,74 ± 1,28

Tabla 5. Parámetros biomecánicos de fémures y hemimandíbulas de los grupos experimentales G2 Control y G2 Suplemento. Los parámetros biomecánicos se expresan como media ± error estándar. No se observan diferencias significativas entre los grupos (*t*-Student, $p > 0,05$).

Evaluación de la DMO en las tibias (G2)

En la Figura 25 se representan la media y el error estándar de la DMO de las tibias analizadas por DXA en los grupos experimentales G2 Control y G2 Suplemento (G2 Control, $n=8$; G2 Suplemento, $n=9$). Estos valores se compararon mediante un análisis de *t*-Student y se encontró que la DMO de las tibias del grupo G2 Suplemento ($0,0679 \pm 0,002 \text{ g/cm}^2$) es significativamente menor que la DMO de las tibias del grupo G2 Control ($0,0762 \pm 0,002 \text{ g/cm}^2$) ($p < 0,05$). Con este análisis podemos decir que la suplementación con Ca durante la preñez modifica la DMO de las tibias de la descendencia de ratas Wistar Kyoto con respecto al grupo control.

Densidad mineral ósea tibias (G2)

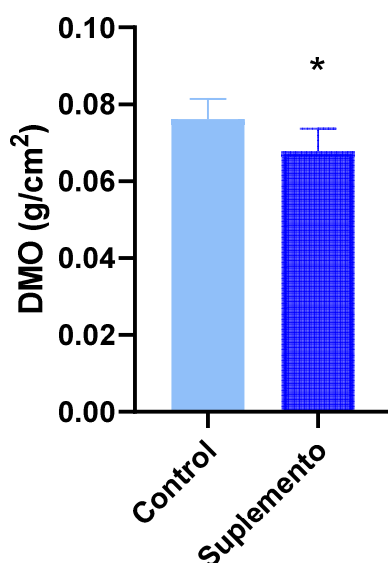


Figura 25. Densidad mineral ósea. Las barras muestran la media y error estándar de la DMO en los grupos experimentales G2 Control y G2 Suplemento (n=10 por grupo). (*) indica diferencias significativas (t Student, $p < 0,05$).

Histomorfometría y conectividad del tejido trabecular en tibias (G2)

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para los parámetros calculados en el análisis histomorfométrico que se realizó en los cortes histológicos (H&E), de las tibias de las crías (G2 Control, n=15; G2 Suplemento, n=13). Los datos se expresaron como media y error estándar y fueron comparados mediante la prueba de t-Student (con corrección de Welch para el parámetro NDX). Si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos en ninguno de los parámetros analizados, se resalta que tanto el volumen óseo trabecular (%BV/TV) asociado al número de trabéculas (TbN), como así también los parámetros de conectividad trabecular (ICI y NDX) tienden a ser menores en el grupo G2 Suplemento con respecto al grupo G2 Control.

		GRUPOS	
		CONTROL	SUPLEMENTO
HISTOMORFOMETRÍA TIBIAS (G2)	VARIABLES		
	%BV/TV	17,83 ± 1,68	14,85 ± 1,44
	TbN (mm ⁻¹)	15,56 ± 0,83	13,16 ± 0,84
	TbTh (µm)	11,30 ± 0,66	11,12 ± 0,61
	TbSp (µm)	55,36 ± 3,56	68,99 ± 5,78
	NDX (%/mm)	33,26 ± 11,26	9,34 ± 2,71
	ICI	0,20 ± 0,04	0,12 ± 0,03

Tabla 6. Parámetros histomorfométricos de las tibias de los grupos experimentales G2 Control y G2 Suplemento. Se muestran la media y error estándar de todos los parámetros analizados (t-Student, $p > 0,05$; corrección de Welch en NDX). No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

5.3 Objetivo Específico 3

Identificar los cambios inducidos por la suplementación con Ca durante la preñez en el crecimiento óseo y en el metabolismo fosfocálcico de las crías de madres adaptadas a una dieta baja en Ca.

Peso corporal de las crías (G2)

Se pesaron los animales a los 15 y a los 21 días de vida (n=15 para cada grupo). Como se ilustra en la Figura 26 se calculó la media y el error estándar para cada grupo a cada tiempo y se compararon los valores obtenidos mediante un análisis de ANOVA a dos criterios con medidas repetidas en un factor. Se observó un aumento significativo en el peso a lo largo de los días, pero no se hallaron diferencias entre los grupos en ninguno de los días analizados (peso g (15 días) = G2 Control: 19,60 ± 0,887 y G2 Suplemento: 19,96 ± 0,548; peso g (21 días) = G2 Control: 31,92 ± 1,443 y G2 Suplemento: 33,70 ± 0,906).

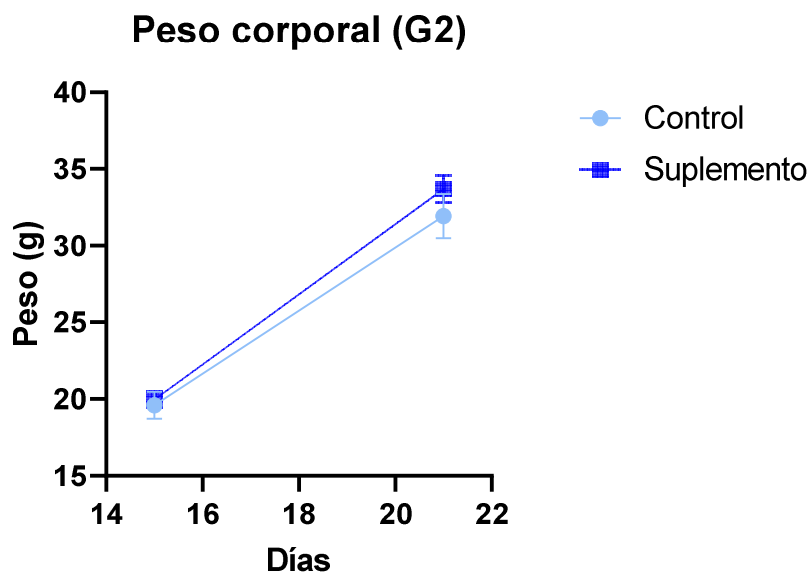


Figura 26. Peso (g) de los grupos experimentales G2 Control y G2 Suplemento a los 15 y 21 días de vida (media \pm error estándar). Se halló un aumento significativo del peso para ambos grupos a lo largo de los días, pero no hay diferencias entre los grupos (ANOVA a 2 criterios, $p < 0,05$).

Análisis morfométricos de fémures y hemimandíbulas (G2)

Se calculó la media y error estándar (Tabla 7) de las variables morfométricas de los fémures y de las hemimandíbulas de las crías de ambos grupos experimentales (G2 Control, $n=13$; G2 Suplemento, $n=11$) y se compararon utilizando la prueba de t-Student. Si bien el área cortical de los fémures tiende a ser mayor en el grupo G2 Suplemento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo G2 Suplemento y el grupo G2 Control ($p > 0,05$) en ninguno de los parámetros analizados en ambas piezas óseas. Por lo cual se puede resaltar que la suplementación con Ca durante la preñez no modificó las variables morfométricas óseas de los fémures y hemimandíbulas de las crías de madres suplementadas durante la preñez en comparación con las crías de madres que no fueron suplementadas.

MORFOMETRÍA	VARIABLES	GRUPOS	
		CONTROL	SUPLEMENTO
FEMURES (G2)	Largo (mm)	16,97 ± 0,35	16,67 ± 0,45
	Diámetro externo (mm)	2,48 ± 0,07	2,66 ± 0,09
	Diámetro interno (mm)	2,13 ± 0,07	2,31 ± 0,07
	Área cortical (mm ²)	1,09 ± 0,38	1,68 ± 0,45
	Perímetro perióstico (mm)	58,68 ± 3,48	57,68 ± 3,39
	Perímetro endóstico (mm)	37,65 ± 3,94	34,93 ± 2,57
HEMIMANDIBULAS (G2)	Longitud (mm)	19,58 ± 0,35	19,67 ± 0,30
	Área (mm ²)	59,09 ± 2,40	62,46 ± 2,07
	Base (mm)	18,38 ± 0,37	18,43 ± 0,30
	Altura (mm)	8,24 ± 0,16	8,42 ± 0,17

Tabla 7. Variables morfométricas de fémures y hemimandíbulas de los grupos experimentales G2 Control y G2 Suplemento. Se presentan la media y error estándar de las variables morfométricas medidas (t-Student, $p > 0,05$).

Evaluación de parámetros relacionados al metabolismo fosfocálcico (G2)

Se realizaron las determinaciones de Ca, fosfato y ALP en los plasmas de las crías, las muestras se procesaron por duplicado para cada animal y se informan los valores de media y error estándar para cada grupo (n=12 para cada grupo). En la Figura 27 se observan los resultados obtenidos para la concentración plasmática de Ca (mg/dL= G2 Control: $9,023 \pm 0,450$ y G2 Suplemento: $9,115 \pm 0,312$) (panel A); la concentración de fosfato (mg/dL= G2 Control: $12,710 \pm 1,183$ y G2 Suplemento: $11,810 \pm 1,592$) (panel B) y la actividad de la enzima ALP plasmática (U/L= G2 Control: $314,3 \pm 31,33$ y G2 Suplemento: $279,1 \pm 15,68$) (panel C). Estos valores fueron comparados con un análisis de t-Student (con corrección de Welch para la fosfatemia y actividad ALP) y no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) para ninguno de los parámetros medidos.

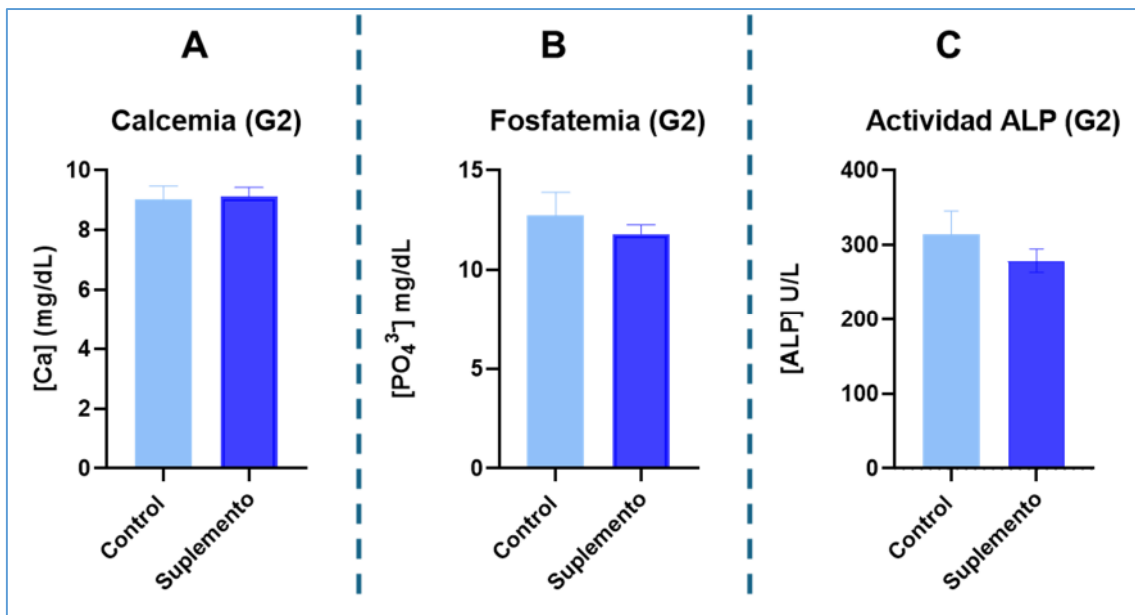


Figura 27. Resultados de los parámetros relacionados con el metabolismo fosfocálcico medidos en el grupo G2 Control vs G2 Suplemento. Panel A: calcemia en mg/dL; Panel B: fosfatemia en mg/dL y panel C: actividad de fosfatasa alcalina (ALP) en U/L. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos G2 Control y G2 Suplemento en ninguno de los parámetros analizados (*t* Student, $p > 0,05$; corrección de Welch en Fosfatemia y ALP).

6. DISCUSIÓN

Madres

El embarazo y la lactancia implican para la madre una gran demanda de Ca debido al crecimiento óseo fetal y del bebé que se satisface durante el embarazo, principalmente mediante aumentos en la absorción de Ca y durante la lactancia mediante cambios metabólicos que movilizan el mineral esquelético (25,77).

Estos cambios conducen a pérdida de masa ósea especialmente cuando las cantidades de Ca ingeridas son bajas. En Argentina la ingesta de Ca está por debajo de las recomendaciones diarias (1000 a 1300 mg/día), con un promedio de ingesta en adultos de 639 mg/día (46). Si bien la suplementación con Ca durante el embarazo es una práctica recomendada por la OMS para la prevención de la preeclampsia (50), se han encontrado resultados contradictorios en cuanto a los efectos óseos de dichos suplementos (51,52,55–59,78).

Jarjou y colaboradores estudiaron una población de mujeres en Gambia y hallaron que estas mujeres que estaban habituadas a una ingesta deficiente de Ca (≈ 350 mg Ca/día) y recibieron suplementos de este mineral durante el embarazo, presentaron mayor pérdida ósea comparadas con el grupo placebo, a nivel de la diáfisis femoral y la cadera total a las 2 semanas postparto, mientras que a las 52 semanas posparto (tras el primer año de una lactancia de dos años) estas diferencias se vieron además en otros sitios óseos y también en el análisis del cuerpo entero (51,54,59,78). En el presente estudio, realizado en ratas Wistar Kyoto, cuando se analizaron a las madres (G1) luego del destete, la calidad del tejido óseo estudiado a través del análisis histomorfológico en las metáfisis de las tibias reveló que, sin bien no hay diferencias estadísticamente significativas, comparado con el grupo G1 Control, el grupo G1 Suplemento presentó un menor porcentaje de volumen óseo trabecular a expensas de una reducción de aproximadamente un 30% en el número de trabéculas, acompañado por un menor ancho trabecular, es decir, en promedio las trabéculas del grupo G1 Suplemento fueron un 25% más angostas. Sin embargo, los parámetros de conectividad trabecular, aunque tampoco presentan diferencias significativas, tienden a ser un 35 % más altos en el grupo G1 Suplemento comparado con el

control, indicando que las trabéculas estarían mejor conectadas entre sí, lo que sugiere una mejor organización ósea trabecular.

La tendencia a poseer un menor volumen óseo trabecular en el grupo G1 Suplemento comparado con el grupo G1 Control, se corresponde con los resultados obtenidos en todos los parámetros biomecánicos analizados, donde si bien no hay diferencias significativas, se observa una tendencia a presentar menores valores de rigidez, fuerza de fractura, fuerza máxima y energía absorbida en el grupo G1 Suplemento, tanto en fémures (principalmente tejido cortical) como en las vértebras lumbares (principalmente tejido trabecular), zona de alto recambio óseo durante el embarazo y la lactancia (27). Por lo tanto, las tendencias observadas en los parámetros de conectividad trabecular, que sugieren una mejor organización del tejido óseo trabecular en el grupo G1 Suplemento, no parecen tener un impacto sobre la resistencia ósea.

En el estudio realizado en Gambia se propone como una posible explicación a esta observación que las mujeres habituadas a una ingesta baja de Ca desarrollan adaptaciones fisiológicas que le permiten compensar la deficiencia de Ca durante periodos críticos como el embarazo y la lactancia; y que la suplementación durante este período podría interrumpir este proceso de adaptación. De este modo se produciría una reducción de la capacidad para aumentar la absorción intestinal y/o la conservación renal de Ca, junto a un desbalance en la regulación del proceso de remodelado óseo durante el embarazo y la lactancia, conduciendo a largo plazo a una mayor pérdida ósea, es decir una menor DMO y una pobre recuperación de esta, resultando perjudicial para la salud ósea de las madres suplementarlas con Ca durante el embarazo (51,54,59,78).

Si bien las tendencias halladas en histomorfometría como en biomecánica concuerdan con los resultados reportados por Jarjou y colaboradores quienes observaron una disminución en la DMO de las madres suplementadas (51,54,59,78), en el análisis realizado sobre las tibias y las vértebras torácicas durante esta tesis, no se halló reducción de la DMO, además de que los valores obtenidos se asemejan a los valores de DMO medidos en fémur y columna lumbar en ratas Wistar alimentadas con una dieta que contenía 1,1% de Ca

(normo Ca), donde se observa un descenso en la DMO de las madres por haber atravesado las etapas de preñez y lactancia (79).

Asimismo, otros ensayos clínicos de suplementación con Ca en mujeres embarazadas observan un efecto positivo a nivel óseo. En uno de ellos hallaron un aumento de la DMO (medida en radio) luego del parto (80) y en otro hallaron un aumento del área de la columna lumbar a las 5 semanas post (57). Sin embargo, estas diferencias no se mantuvieron a las 20 semanas (5 meses) postparto (58,61) en concordancia con otros trabajos donde estudiaron a las mujeres a los 4 y 12 meses postparto y no vieron ningún efecto óseo de la suplementación. Cabe destacar que las mujeres de estos estudios tenían una ingesta basal previa de Ca (≈ 700 mg/día) más alta que las mujeres de Gambia (≈ 350 mg Ca/día) y que también los esquemas de suplementación fueron diferentes (52,56–58,81).

Como se mencionó anteriormente, en esta tesis el análisis se hizo al final de la lactancia y se sabe que durante este periodo se produce pérdida de masa ósea pudiendo ser mayor cuando se administran dietas con bajo contenido de Ca (26) y que una vez interrumpida la lactancia viene un período donde el remodelado óseo continúa estando elevado, pero ahora a favor de la formación ósea (25,26). Estudios que amplíen el número de animales y estudien los cambios óseos a otros tiempos podrían reforzar los resultados hallados en esta tesis.

Además, se analizaron algunos parámetros relacionados al metabolismo óseo, como la calcemia, fosfatemia, actividad de ALP y absorción intestinal de Ca y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Cuando se analizó la actividad de la ALP como marcador de formación ósea, el grupo G1 Suplemento posee aproximadamente un 20% menos de actividad que el grupo G1 Control, lo que podría explicar las tendencias observadas en histomorfometría y biomecánica. Igualmente, todos los valores medidos de calcemia, fosfatemia como los de ALP se encuentran dentro de los rangos normales para ratas (82,83). Un aspecto importante también pendiente para indagar es la evaluación de los niveles de marcadores de resorción ósea como, por ejemplo: excreción urinaria de Ca, hidroxiprolina, fosfatasa ácida tartrato-resistente, y otros marcadores de formación ósea como la osteocalcina, así como también

hormonas involucradas en la homeostasis del Ca como PTH y calcitriol. Estos podrían indicar cambios metabólicos que aún no logran reflejarse en la calidad ósea y son los que mantienen la calcemia y fosfatemia en sus niveles correspondientes.

Como la tasa de absorción de Ca (mg/min) estudiada *in vitro* en sacos evertidos tampoco se vió afectada podemos inferir que, la suplementación con Ca durante la preñez en ratas Wistar Kyoto alimentadas con una dieta deficiente en Ca no modificó la capacidad de absorción intestinal de este ion. En el proyecto de esta tesis estaba previsto realizar también un balance del Ca ingerido y excretado colocando a los animales en jaulas metabólicas. Sin embargo, por problemas técnicos con la mufla no se logró una correcta calcinación de las heces lo cual produjo una incorrecta disolución de las cenizas en HCl y con ello mediciones erróneas de Ca. Como esos resultados no se pudieron incluir en esta tesis, sería interesante en un futuro realizar un análisis del balance de Ca y complementar este estudio con otras técnicas como intestino aislado *in situ* y mediciones de expresión de proteínas transportadoras del Ca en los enterocitos.

Descendencia

En cuanto a los efectos en la descendencia de las mujeres de Gambia suplementadas con Ca durante el embarazo hallaron que dicha suplementación no tuvo un efecto significativo sobre las concentraciones de Ca en la leche materna, por lo cual no proporcionó beneficios significativos a los hijos cuando fueron analizados durante la lactancia a las 2, 13 y 52 semanas de vida (63). No obstante, en el seguimiento a largo plazo (8-12 años), hallaron que las niñas cuyas madres recibieron Ca fueron más pequeñas y tenían menos mineral óseo que las niñas del grupo placebo. En contraste, los niños de madres suplementadas con Ca tendieron a tener en general mayor masa ósea que los niños del grupo placebo, aunque estas diferencias no fueron significativas después de ajustar por tamaño corporal (64).

En esta tesis se analizaron las crías luego de finalizar la lactancia (25 días de edad) y no se realizó la división de las crías según el sexo, manteniendo en ambos grupos una relación homogénea entre machos y hembras. Aunque el sexo determina en gran medida el dimorfismo del sistema esquelético, el cual es

relevante en este tipo de estudios, las diferencias se manifiestan principalmente en la etapa pospuberal (84) y en las ratas Wistar Kyoto, la pubertad comienza aproximadamente después de los 40 días de vida (85) por lo cual las crías analizadas en esta tesis se encontraban en la etapa prepuberal. En cuanto a los resultados obtenidos en esta tesis en los grupos de la descendencia, no se hallaron diferencias en el peso de los animales. Además, al analizar macroscópicamente las piezas óseas (fémures y mandíbulas) no se observaron diferencias significativas en cuanto a su tamaño. Lo que sumado al hecho de que no se encontraron diferencias en los pesos, permite decir que no existen variaciones en el crecimiento de las crías entre ambos grupos de madres.

Estaba previsto en el proyecto de tesis realizar medidas de histomorfometría dinámica para la cual se realizaron inyecciones con tetraciclina a los 15 y 21 días de vida. Este estudio hubiera permitido completar la evaluación del crecimiento. Sin embargo, no hemos podido obtener cortes con las marcas necesarias para realizar las mediciones. La descripción de esta técnica y algunas de las fotos obtenidas se incluyen en el anexo.

Por otro lado, en esta tesis se encontró que el grupo de crías cuyas madres habían sido suplementadas durante la preñez tienen significativamente una menor DMO en las tibias que aquellas que provenían de madres no suplementadas, lo cual podría indicar un retraso en el proceso de mineralización. Si bien estos resultados no concuerdan con lo hallado a corto plazo en la descendencia de las madres de Gambia donde no había diferencias entre los grupos (63), si concuerdan con los obtenidos a largo plazo, donde se observó que las niñas de madres suplementadas tenían un menor CMO (cuerpo entero, columna lumbar y cadera) y una menor DMO en la diáfisis del radio, comparadas con el grupo placebo (64).

Además, el resultado obtenido para la DMO es acompañado por los obtenidos en los análisis histológicos también realizados en las tibias, donde se observó una tendencia a un menor porcentaje de hueso trabecular que se puede atribuir a una disminución en aproximadamente un 15% en el número de trabéculas en el grupo G2 Suplemento con respecto al control.

Por otro lado, la DMO es en general un análisis global que incluye tanto el hueso trabecular y cortical. En el procesamiento de las tibias de las crías al ser piezas tan pequeñas el software para pequeños animales no reconoció automáticamente la zona en estudio (como si sucedió cuando se analizaron las tibias y vertebras maternas) por lo cual hubo que definir las manualmente y esta técnica se puso a punto delimitando el área interna de las tibias (mayor proporción de hueso trabecular). Por lo cual, si bien esta medición no está representando al hueso completo, todas las muestras se procesaron de la misma manera garantizando su reproducibilidad lo que nos permitió seguir adelante con el análisis.

Sin embargo, en esta tesis, los resultados hallados en la DMO y las tendencias del análisis histomorfométrico no coinciden con los resultados hallados en el análisis biomecánico de las hemimandíbulas y fémures, donde no se observaron diferencias significativas entre los grupos. En el análisis de los fémures del grupo G2 Suplemento se observó una tendencia a una mayor resistencia ósea en comparación con el grupo G2 Control, probablemente debido a una tendencia a poseer un área cortical un 35% mayor que el control. Aunque al igual que sucede con el análisis histomorfométrico estas observaciones no alcanzaron significación estadística.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la resistencia ósea coinciden entonces con otros estudios que no hallaron efectos de la suplementación con Ca en las madres sobre la salud ósea de los hijos (62,67) o que incluso hallaron efectos positivos. En un estudio realizado en recién nacidos de madres suplementadas se observó un aumento de la DMO en las tibias respecto a los hijos cuyas madres recibieron placebo (80). Además, en otro estudio también realizado en recién nacidos, se encontró mayor DMO en el cubito, radio, tibia y peroné en la descendencia de madres que habían sido suplementadas con respecto al grupo placebo (86).

Las diferencias entre los distintos parámetros estudiados en esta tesis pueden deberse principalmente a que se están analizando distintas estructuras óseas. Tanto en el análisis histomorfométrico como en la DMO el estudio se centró en analizar el hueso trabecular de las tibias, mientras que el análisis biomecánico

en los fémures se centró en estudiar el hueso cortical ya que se realizó sobre la diáfisis de éste. Con respecto a las hemimandíbulas, como se mencionó en la introducción es un hueso plano que se compone de hueso trabecular rodeado de hueso cortical, por lo que presenta una combinación homogénea de ambas estructuras óseas (5), además en las hemimandíbulas de ratas se debe tener en cuenta la presencia del incisivo que ocupa una porción significativa de la región sinfisaria (anterior) y se extiende hacia la región del cuerpo mandibular (6,7), con lo cual esta pieza dentaria también influye en los resultados obtenidos en el análisis de biomecánica, donde no se observan las mismas tendencias encontradas en los fémures. Para terminar de aclarar estas variaciones sería útil realizar el ensayo de compresión en las vértebras de las crías, ya que en el cuerpo de dichas piezas óseas predomina el hueso de tipo trabecular (5).

La suplementación con Ca durante la preñez parece tener un efecto más pronunciado en el desarrollo del hueso trabecular que en el del hueso cortical, al menos en las condiciones de suplementación y tiempos estudiados en esta tesis. Estas diferencias entre los efectos en el hueso cortical y trabecular también se vieron, por ejemplo, en un estudio realizado en ratas Sprague Dawley. En ese trabajo se administraron suplementos de Ca momentos antes de la succión de la leche para mitigar la pérdida ósea materna inducida por la lactancia. Cuando se analizaron los efectos en la descendencia a las 5 semanas de edad se observó que la suplementación con Ca en las madres resultó en una mayor DMO tanto en el hueso trabecular (metafisario) como en el cortical (diafisario) de las tibias de las crías. Sin embargo, en un seguimiento a las 7 semanas de edad esta diferencia solo se observó en el hueso trabecular y no en el hueso cortical (87).

El hueso trabecular, que constituye una proporción importante del hueso en las regiones metabólicamente activas, como la epífisis y metáfisis de los huesos largos y las vértebras, tiene una alta tasa de renovación y es más sensible a cambios en los niveles de Ca. En cambio, el hueso cortical, más denso y con una función primordialmente estructural y protectora, muestra menos sensibilidad a las fluctuaciones en la disponibilidad de Ca. Esto está relacionado con la naturaleza de ambas estructuras óseas, donde el hueso cortical, al estar encargado del soporte y protección de las partes más vulnerables del cuerpo,

presenta una mayor estabilidad en su composición mineral a lo largo del tiempo, mientras que el hueso trabecular, más dinámico y relacionado con el metabolismo mineral, refleja con mayor rapidez las alteraciones en los nutrientes disponibles (1–3,88). Sin embargo, cuando se analizaron parámetros relacionados con el metabolismo mineral como los valores de calcemia, fosfatemia y de actividad de ALP (marcador de formación ósea) no se hallaron diferencias significativas entre los grupos y dichos valores se encuentran dentro de los rangos de referencia (83,89).

Por lo cual, complementar estos estudios con análisis de marcadores de remodelado óseo como el conteo de células óseas y la medición de superficies cubiertas por osteoclastos y/u osteoblastos nos permitiría ver si hay cambios en el proceso de remodelado que están afectando más al hueso trabecular. Además, sería interesante poder estudiar el contenido de algunas hormonas en la leche materna, como por ejemplo del PTHrP ya que algunos estudios sugieren una posible relación entre el contenido de PTHrP en la leche y la acumulación de Ca esquelético en los lactantes (26).

También sería importante, en un futuro poder estudiar a la descendencia en un periodo más prolongado e incluir un esquema de suplementación materna durante la lactancia, para investigar si las diferencias halladas en esta tesis se mantienen, cambian o si el efecto se disipa con la edad de las crías y/o el tipo de suplementación materna.

7. CONCLUSION

La administración de suplementos de Ca durante el embarazo en mujeres con baja ingesta de calcio es una práctica recomendada por la OMS y con un gran respaldo científico como estrategia para reducir el riesgo de preeclampsia. Dicha complicación del embarazo es una de las principales causas de muerte materno infantil a nivel global. Esta tesis mostró que la suplementación con Ca durante el embarazo, en animales habituados a una dieta hipocálcica, no produjo un mayor deterioro óseo en relación con aquéllos que no son suplementados. Esto contribuye a una mejor comprensión de la controversia observada en humanos que ha generado reticencias sobre los beneficios de esta intervención. Los resultados de esta tesis, además, aportan evidencia experimental sobre los diversos efectos de la suplementación con calcio durante la preñez en la salud ósea de la descendencia. Los mismos, sugieren un efecto diferencial sobre el hueso trabecular y el hueso cortical. Estos hallazgos pueden orientar estudios en humanos tendientes a una mejor evaluación de los efectos óseos de la suplementación con calcio durante el embarazo, tanto en las madres como en la descendencia. Asimismo, no se hallaron serios efectos deletéreos de la suplementación con calcio durante el embarazo sobre la salud ósea validando la recomendación de suplementar con calcio a mujeres embarazadas con baja ingesta de este mineral.

ANEXO

Análisis del contenido de Ca en el alimento

Se determinó el contenido de Ca de la dieta utilizando la técnica de absorción atómica Arolab MK II, para lo cual primero las muestras se calcinaron en la mufla a 550°C, luego fueron disueltas en 1mL HCl y diluidas en SrCl₂ 2% para eliminar interferentes. Se utilizó una curva de calibración con concentraciones de Ca 0-100 µg/mL y la llama utilizada se obtuvo por mezcla de acetileno:aire en proporción 1,5:1.

Según las proporciones utilizadas para la elaboración del alimento balanceado, el valor teórico de Ca fue 0,3% para la dieta HipoCa y 1,2% para la dieta NormoCa.

El valor medido se comparó con el valor teórico mediante la prueba t-Student con un nivel de significancia del 5%. Los resultados revelaron que los valores medidos son significativamente más bajos que los valores teóricos en cada dieta respectivamente ($p < 0.05$), siendo la concentración media de Ca en la dieta HipoCa de $(0,2187 \pm 0,0295)$ %, mientras que en la dieta NormoCa de $(0,7815 \pm 0,1240)$ %. La diferencia observada entre los valores medidos y los valores teóricos puede deberse a un mal funcionamiento de la mufla, debido a que se observaron indicios de una mala calcinación de la muestra, con lo cual no se logró una correcta disolución en HCl y por ello se habría subestimado el valor de Ca en las determinaciones realizadas.

Balances de consumo de alimentos y líquidos (G1)

Para realizar el control del consumo de alimentos y líquidos se colocó a los animales en jaulas metabólicas de forma individual y se controló el alimento y agua consumidos en 24 horas. Este procedimiento se realizó en dos oportunidades, el primero fue al final del periodo de adaptación antes de la preñez y el segundo fue al finalizar el periodo de lactancia, antes de la eutanasia. Para realizar dicho seguimiento se pesó el alimento al inicio y al final de las 24h, y se midió el líquido consumido utilizando bebederos graduados para cada animal. Luego se calculó la media \pm error estándar para cada grupo y se

compararon empleando la prueba de t-Student no hallándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos. La información recaudada se muestra en la siguiente tabla.

Media \pm EE sin diferencias estadísticas t-Student ($p > 0,05$)	1° balance		2° balance	
	Control	Suplemento	Control	Suplemento
Agua consumida (mL)	34,00 \pm 12,00	32,5 \pm 7,50	46,60 \pm 4,20	46,75 \pm 1,44
Alimento consumido (g)	12,80 \pm 0,87	15,83 \pm 0,91	26,34 \pm 2,25	31,60 \pm 3,99
Peso del animal (g)	167,4 \pm 9,2	158,7 \pm 3,9	232,4 \pm 13,6	255,1 \pm 9,9

Los animales se encontraron durante todo el experimento en un buen estado general y tuvieron un buen consumo de alimentos y líquidos según las normas internacionales AIN93 (70) y los requerimientos nutricionales para animales de laboratorio (90).

Histomorfometría dinámica

Esta técnica sirve para evaluar el crecimiento óseo a nivel microscópico, para lo cual las crías fueron inyectadas en dos oportunidades (dosis 25 mg/kg, volumen inyectado 1% del peso corporal de las ratas) con una solución de clorhidrato de tetraciclina (Sigma Aldrich, USA), siendo la primera dosis a los 15 días de vida y la segunda a los 21 días de vida.

La tetraciclina se utiliza como marcador de crecimiento ya que se asocia a los átomos de calcio depositados en las superficies mineralizadas del hueso en formación, generando bandas que pueden detectarse por microscopía de fluorescencia. Normalmente se mide la distancia entre las bandas para estimar la tasa de aposición mineral en intervalos específicos de tiempo (MAR del inglés Mineral Apositional Rate).

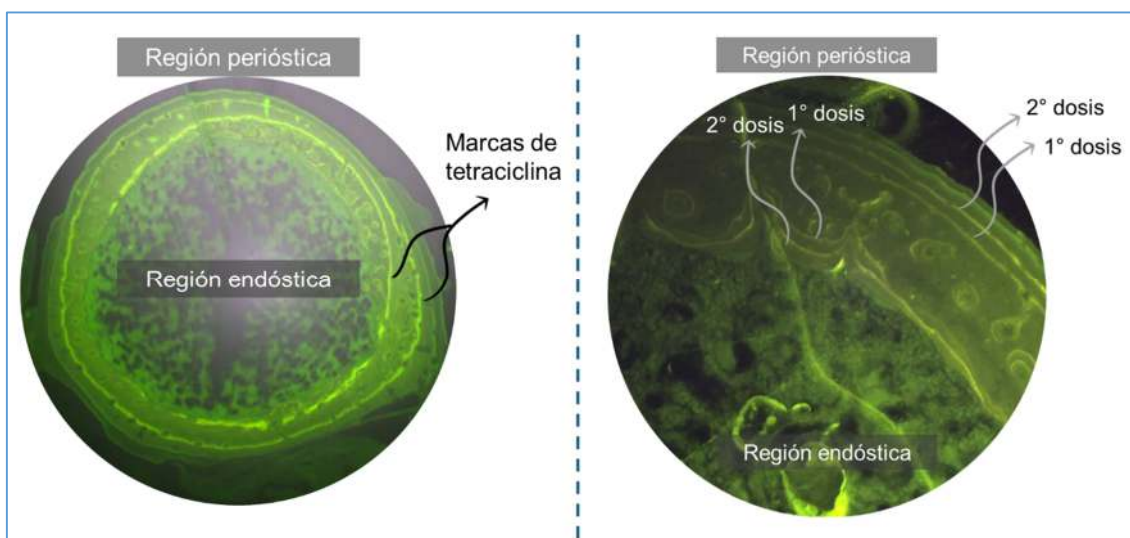
Las tibias derechas se fijaron en formol-PBS 10%, luego se deshidrataron y desgrasaron en concentraciones crecientes de etanol (70% a 98%) y finalmente en xileno puro (Biopack, Argentina). Posteriormente se realizó una infiltración con metilmetacrilato puro (MMA) por 48 h, y luego se colocaron las diferentes piezas en tubos de polipropileno con 0,5 g de peróxido de benzoílo (Sigma, USA) cada 100 mL de MMA. El peróxido de benzoílo se utilizó como catalizador de la polimerización. Se realizó vacío y se dejaron polimerizar los bloques a 37-40 °C

durante 1 semana o hasta que se completó la polimerización. Luego se realizaron cortes de 100-150 micras con una sierra circular diamantada a baja velocidad (IsoMet Buehler Ltd. Illinois, USA), de forma perpendicular al largo del hueso. Se obtuvieron discos que se pegaron sobre portaobjetos y se redujo el espesor de los cortes con papel esmeril de 600-2000 granos/pulgada, hasta obtener un espesor de 30-35 micras.

Para la obtención de las imágenes se utilizó un microscopio de fluorescencia (Mikoba serie F-320, China), una cámara Touptek (XCAM1080PHA) y el software Image J 1.40 (NIH, USA). Para poder obtener imágenes con la fluorescencia emitida por la tetraciclina se utilizó un filtro azul (λ Excitacion: 450-490nm).

Si bien se obtuvieron las fotografías para las muestras procesadas, no se pudieron visualizar correctamente las marcas de tetraciclina probablemente debido a que las crías se encontraban en un momento de alto recambio óseo por el proceso de modelado que se da durante el crecimiento.

Se esperaba visualizar cuatro marcas, dos a nivel del periostio y dos a nivel del endostio, pero en la mayoría de los cortes obtenidos se visualizaron solo dos marcas. Si bien, no se puede determinar si corresponden a la primera dosis, a la segunda o es una marca de cada dosis, lo más probable es que debido a la alta tasa de recambio óseo, las marcas de la primera dosis hayan desaparecido, y las marcas que se visualizan sean ambas de la segunda dosis. En la siguiente figura se muestran ejemplos de las imágenes obtenidas.



En el panel de la izquierda se visualiza un corte transversal completo como ejemplo de lo obtenido para la mayoría de las muestras procesadas, donde se distinguen solo dos marcas de tetraciclina que se pierden en algunos sectores. En el panel de la derecha se observa una región de un corte transversal donde pueden distinguirse las cuatro marcas esperadas, que corresponden a ambas dosis, dos en la región endóstica y dos en la región perióstica. Sin embargo, esto se visualizó solo en algunas regiones de escasos cortes por lo cual no pudieron ser analizados.

Existe una variante de esta técnica donde se utilizan dos colorantes, tetraciclina y rojo de Alizarina, al ser colorantes diferentes se utiliza uno para la primera dosis y otro para la segunda, pudiendo así distinguir con mayor precisión las marcas en función de la dosis aplicada. Sin embargo, al momento de realizar dicha técnica en el laboratorio no se contaba con el segundo colorante, por lo cual se optó por realizar la técnica utilizando solo tetraciclina.

Las dificultades halladas en esta tesis nos permitieron plantear mejoras en el protocolo de las inyecciones: 1) realizar las inyecciones luego de los 21 días de vida, 2) disminuir el tiempo entre ambas inyecciones, 3) incluir un segundo colorante fluorescente.

PRODUCCIÓN

Los experimentos realizados para la ejecución del primer objetivo de esta tesis dieron origen a la tesina de grado para optar al título de Licenciada en Biotecnología de la alumna Agustina Velázquez, titulada: “ESTUDIO DE LOS EFECTOS ÓSEOS DE LA INGESTA DE CALCIO DURANTE LA PREÑEZ” defendida y aprobada el 22 de marzo de 2024.

Además, los resultados presentados en esta tesis doctoral dieron origen a las siguientes publicaciones originales:

RESÚMENES PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS DE CONGRESOS

Villarreal, L; Velázquez, A; Tourn, N; Di Loreto, V E; Brun, L R; Belizán, J; Lombarte, M. La suplementación con calcio durante la preñez no modifica las propiedades biomecánicas óseas de la descendencia en ratas Wistar Kyoto. VII Congreso Argentino de Osteología AAOMM – SAO. Actualizaciones en Osteología 20(1):34-35 (2024).

Villarreal, L; Velázquez, A; Tourn, N; Di Loreto, V E; Brun, L R; Belizán, J; Lombarte, M. La suplementación con calcio durante la preñez no modifica la calidad del tejido óseo en Ratas Wistar kyoto. VII Congreso Argentino de Osteología AAOMM – SAO. Actualizaciones en Osteología 20(1):52-53 (2024).

Villarreal, L; Velázquez A, Diaz Baclini P, Tourn N B, Di Loreto V E, Brun L R, Belizan J, Lombarte M. Efecto de la suplementación con calcio durante la preñez sobre las propiedades biomecánicas óseas en ratas Wistar Kyoto. VI Congreso Argentino de Osteología AAOMM – SAO. Actualizaciones en Osteología 19(1):81-82 (2023).

Lombarte, M; Villarreal, L; Diaz Baclini, P; Velazquez, A; Belizan, J. Effect of maternal Ca intake during pregnancy on offspring health. Reunión conjunta SAIC SAB AAFE AACYTAL. XIXVIII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). XXV Jornadas anuales de la Sociedad Argentina de Biología (SAB). LV Reunión anual de la Asociación Argentina de Farmacología Experimental (AAFE). VIII Reunión Científica Regional de la Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AACYTAL). Medicina 83(V):47-48 (2023).

Aucar, S; Canut, I; Velazquez, A; Villarreal, L; Diaz Baclini, P; Tourn; Di Loreto, V; Brun, L; Belizan, J; Lombarte, M. Efecto de la suplementación con calcio sobre la densidad mineral ósea durante la preñez en animales de experimentación. XXV Congreso y la XLIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR). Desafíos y Aplicaciones de la Biología. Una mirada puesta hacia el desarrollo sustentable 1(1):71 (2023).

PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

Diaz Baclini, P; Villarreal, L; Velázquez, A; Tourn, N B; Aucar, S; Canut, I; Di Loreto, V E; Brun, L R; Belizán, J; Lombarte, M. Efectos Óseos de la Suplementación con Calcio Durante la Preñez en Ratas Wista Kyoto. II Jornada de Ciencia y Tecnología en el Marco del Programa de Formación y Perfeccionamiento en Investigación. FCM – UNR (2024).

Velazquez, A; Villarreal, L; Diaz Baclini, P; Aucar, S; Canut, I; Tourn, N; Di Loreto, V; Brun, L; Belizan, J; Lombarte, M. Efecto de la suplementación con calcio durante la preñez en la absorción intestinal de calcio. Jornada. XVII Jornadas de Ciencias, Tecnologías e Innovación. Universidad Nacional de Rosario (2023).

Canut, I; Aucar, S; Velazquez, A; Villarreal, L; Diaz Baclini, P; Tourn, N; Di Loreto, V; Brun, L; Belizan, J; Lombarte, M. Efecto de la suplementación con calcio sobre la densidad mineral ósea durante la preñez en ratas Wistar Kyoto. XVII Jornadas de Ciencias, Tecnologías e Innovación. Universidad Nacional de Rosario (2023).

Tourn, N; Diaz Baclini, P; Villarreal, L; Velazquez, A; Aucar, S; Canut, I; Di Loreto, V; Brun, L; Belizan, J; Lombarte, M. Efecto de la suplementación con calcio durante la preñez sobre las propiedades biomecánicas óseas en animales de experimentación. XVII Jornadas de Ciencias, Tecnologías e Innovación. Universidad Nacional de Rosario (2023).

Diaz Baclini, P; Tourn, N; Aucar, S; Canut, I; Velazquez, A; Villarreal, L; Lombarte, M. Efectos óseos de la suplementación con calcio durante la preñez en ratas Wistar Kyoto. XXXIV Congreso Científico Argentino de Estudiantes de Medicina (CoCAEM) (2023).

BIBLIOGRAFÍA

1. Burr DB. Bone Morphology and Organization. Second Edi. Basic and Applied Bone Biology. Elsevier Inc.; 2019. 3–26 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00001-4>
2. Boskey AL, Robey PG. The composition of bone. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 2018. 84–92 p.
3. Ross M, Pawlina W. Capítulo 8: Tejido óseo. Ross Histología. Texto y Atlas. 2004. 182–214 p.
4. Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone. ASBMR. 2006;3–9.
5. Latarjet M, Ruiz Liard A. Anatomía Humana. Vol. 4. 2016. 1–23 p.
6. Kim HJ, Park KM, Tak HJ, Choi JW, Kang SH, Park W, et al. Skeletal unit construction of rat mandible based on the masticatory muscle anatomy and double microcomputed tomography. Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia. 2018 Oct 1;47(5):417–27.
7. Pitaru S, Michaeli Y, Zajicek G. Vascular Turnover of a Continuously Growing Organ: The Rat Incisor.
8. Riancho J, González J. Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral. 2004. 416 p.
9. DeSesso JM, Scialli AR. Bone development in laboratory mammals used in developmental toxicity studies. Vol. 110, Birth Defects Research. John Wiley and Sons Inc.; 2018. p. 1157–87.
10. Altman AR, Tseng WJ, de Bakker CMJ, Chandra A, Lan S, Huh BK, et al. Quantification of skeletal growth, modeling, and remodeling by in vivo micro computed tomography. Bone. 2015 Dec 1;81:370–9.
11. Allen MR, Burr DB. Bone Modeling and Remodeling. In: Basic and Applied Bone Biology. Elsevier Inc.; 2013. p. 75–90.
12. Bruce MK, Bruce AS. Berne y Levy Fisiología. 7th ed. 2018.
13. Matthew N. Levy, Bruce M. Koeppen, Bruce A. Stanton. Berne y Levy Fisiología. cap 44. Regulación endocrina del metabolismo del calcio y del

- fosfato. In: Elsevier España S.A, editor. Berne y Levy Fisiología. 4ta ed. 2006. p. 631–45.
14. Matthew N. Levy, Bruce M. Koeppen, Bruce A. Stanton. Berne y Levy Fisiología. cap 39. Homeostasis del potasio, el calcio y el fosfato. In: Berne y Levy Fisiología. 4ta ed. p. 563.
 15. Khan AA, Sbayi A, Schlingmann KP, Gardella TJ, Nissenson RA, Jüppner H, et al. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, Ninth Edition. 2019.
 16. Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB. Dri Dietary Reference Intakes Calcium Vitamin D. Food and Nutrition Board. 2011;
 17. Barboza GD de, Guizzardi S, Talamoni NT de. Molecular aspects of intestinal calcium absorption. World J Gastroenterol. 2015;21(23):7142–54.
 18. Pérez A V., Picotto G, Carpentieri AR, Rivoira MA, Peralta López ME, Tolosa De Talamoni NG. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption: Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. Vol. 77, Digestion. S. Karger AG; 2008. p. 22–34.
 19. Gómez Alonso C, Rodríguez García M, Cannata JB. INTRODUCCIÓN Metabolismo del calcio, del fósforo y del magnesio.
 20. Matthew N Levy, Bruce M. Koeppen, Bruce A. Stanton. Berne y Levy Fisiología. cap 33. Motilidad del tubo digestivo. In: Berne y Levy Fisiología. 4ta ed. p. 429.
 21. Matthew N. Levy, Bruce M. Koeppen, Bruce A. Stanton. Berne y Levy Fisiología. cap 35. Digestión y absorción. In: Berne y Levy Fisiología. 4ta ed. p. 488–9.
 22. Fudge NJ, Kovacs CS. Pregnancy up-regulates intestinal calcium absorption and skeletal mineralization independently of the vitamin D receptor. Endocrinology. 2010;151(3):886–95.

23. Tojo Y, Kurabayashi T, Honda A, Yamamoto Y, Yahata T, Takakuwa K, et al. Bone structural and metabolic changes at the end of pregnancy and lactation in rats. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178(1 Pt 1):180–5.
24. Winter EM, Ireland A, Butterfield NC, Haffner-Luntzer M, Horcajada MN, Veldhuis-Vlug AG, et al. Pregnancy and lactation, a challenge for the skeleton. *Endocr Connect.* 2020;9(6):R143–57.
25. Prentice A. Micronutrients and the Bone Mineral Content of the Mother, Fetus and Newborn. *J Nutr.* 2003;1693S-1699S.
26. Kovacs CS. Maternal Mineral and Bone Metabolism During Pregnancy, Lactation, and Post-Weaning Recovery. *Physiol Rev.* 2016;96(2):449–547.
27. A Prentice, C J Bates. Adequacy of dietary mineral supply for human bone growth and mineralisation. *Eur J Clin Nutr.* 1994;48 Suppl(1):S161-76.
28. Garner SC, Peng T -C, Hirsch PF, Boass A, Toverud SU. Increase in serum parathyroid hormone concentration in the lactating rat: effects of dietary calcium and lactational intensity. *J Bone Miner Res.* 1987;2(4):347–52.
29. Garner SC, Peng T -C, Toverud SU. Modulation of serum parathyroid hormone and ionized calcium concentrations during reproduction in rats fed a low calcium diet. *J Bone Miner Res.* 1988;3(3):319–23.
30. Gonen E, Sahin I, Ozbek M, Kovalak E, Yologlu S, Ates Y. Effects of pregnancy and lactation on bone mineral density, and their relation to the serum calcium, phosphorus, calcitonin and parathyroid hormone levels in rats. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(4):322–6.
31. Ardawi M, Nasrat H, BA'Aqueel H. Calcium-regulating hormones and parathyroid hormone-related peptide in normal human pregnancy and postpartum: a longitudinal study. *Eur J Endocrinol.* 1997;137(4):402–9.
32. Fudge NJ, Kovacs CS. Pregnancy up-regulates intestinal calcium absorption and skeletal mineralization independently of the vitamin D receptor. *Endocrinology.* 2010;151(3):886–95.

33. Boass A, Toverud SU, Pike JW, Haussler MR. Calcium metabolism during lactation: enhanced intestinal calcium absorption in vitamin D-deprived, hypocalcemic rats. *Endocrinology*. 1981;109(3):900–7.
34. Boass A, Garner SC, Schultz VL, Toverud SU. Regulation of serum calcitriol by serum ionized calcium in rats during pregnancy and lactation. *J Bone Miner Res*. 1997;12(6):909–14.
35. Greer FR, Tsang RC, Searcy JE, Levin RS, Steichen JJ. Mineral homeostasis during lactation- relationship to serum 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone and calcitonin. *Am J Clin Nutr*. 1982;36(3):431–7.
36. Woodrow JP, Sharpe CJ, Fudge NJ, Hoff AO, Gagel RF, Kovacs CS. Calcitonin plays a critical role in regulating skeletal mineral metabolism during lactation. *Endocrinology*. 2006;147(9):4010–21.
37. Greer FR, Lane J, Ho M. Elevated serum parathyroid hormone, calcitonin, and 1,25-dihydroxyvitamin D in lactating women nursing twins. *Am J Clin Nutr*. 1984;40(3):562–8.
38. Dahlman T, Sjoberg HE, Bucht E. Calcium homeostasis in normal pregnancy and puerperium. A longitudinal study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1994;73(5):393–8.
39. Hillman L, Sateesha S, Haussler M, Wiest W, Slatopolsky E, Haddad J. Control of mineral homeostasis during lactation: interrelationships of 25-hydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, parathyroid hormone, calcitonin, prolactin, and estradiol. *Am J Obstet Gynecol*. 1981;139(4):471–6.
40. Laskey MA, Prentice A. Bone mineral changes during and after lactation. *Obstetrics and gynecology*. 1999;94(4):608–15.
41. Kalkwarf HJ, Specker BL, Ho M. Effects of calcium supplementation on calcium homeostasis and bone turnover in lactating women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(2):464–70.

42. Vanhouten JN, Wysolmerski JJ. Low estrogen and high parathyroid hormone-related peptide levels contribute to accelerated bone resorption and bone loss in lactating mice. *Endocrinology*. 2003;144(12):5521–9.
43. Hagaman JR, Ambrose WW, Hirsch PF. A scanning electron microscopic and photon absorptiometric study of the development, prolongation, and pattern of recovery from lactation-induced osteopenia in rats. *J Bone Miner Res*. 1990;5(2):123–32.
44. O'Brien EC, Geraghty AA, Kilbane MT, McKenna MJ, McAuliffe FM. Bone resorption and dietary calcium in pregnancy—a window to future maternal bone health. *Osteoporos Int*. 2021;32(9):1803–14.
45. Aliverti V, Bonanomi L, Giavini E, Leone VC, Marian1 L. The Extent of Fetal Ossification as an Index of Delayed Development in Teratogenic Studies on the Rat.
46. Ballesteros SM, Freidin B, Rovisora A, Zapata ME. ENNyS. Patrones de consumo alimentario en hogares urbanos de Argentina, 2017-2018.
47. De Salud M, Social D, Stanley DC, Rubinstein A, Kaler M, Espinosa D, et al. Encuesta Nacional de nutrición y Salud 2019 (ENNyS 2) 4 AUTORIDADES MINISTERIO DE SALUD Y DESARROLLO SOCIAL.
48. Belizán JM, Villar J, Repke J. The relationship between calcium intake and pregnancy-induced hypertension: up-to-date evidence. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;158(4):898–902.
49. Hofmeyr GJ, Lawrie TA, Atallah ÁN, Duley L, Torloni MR. Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014(6).
50. World Heal Organ. World Health Organization. Guideline: Calcium supplementation in pregnant women. 2013.
51. Jarjou LMA, Laskey MA, Sawo Y, Goldberg GR, Cole TJ, Prentice A. Effect of calcium supplementation in pregnancy on maternal bone outcomes in women with a low calcium intake. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(2):450–7.

52. Hacker A, KJLMVGEAMSA et al. Calcium supplementation during pregnancy improves tibial bone density at one year post-partum in racially diverse women (250.3). *The FASEB Journal* John Wiley & Sons, Ltd. 2014;250.3.
53. Ó Breasail M, Ward KA, Schoenbuchner SM, Ceesay M, Mendy M, Jarjou LM, et al. Pregnancy-Related Change in pQCT and Bone Biochemistry in a Population With a Habitually Low Calcium Intake. *J Bone Miner Res.* 2021;36(7):1269–80.
54. Jarjou LMA, Sawo Y, Goldberg GR, Ann Laskey M, Cole TJ, Prentice A. Unexpected long-term effects of calcium supplementation in pregnancy on maternal bone outcomes in women with a low calcium intake: a follow-up study. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(3):723–30.
55. Liu Z, Qiu L, Chen Y ming, Su Y xiang. Effect of milk and calcium supplementation on bone density and bone turnover in pregnant Chinese women: a randomized controlled trail. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;283(2):205–11.
56. Ettinger AS, Lamadrid-Figueroa H, Mercado-García A, Kordas K, Wood RJ, Peterson KE, et al. Effect of calcium supplementation on bone resorption in pregnancy and the early postpartum: a randomized controlled trial in Mexican women. *Nutr J.* 2014;13(1).
57. Diogenes MEL, Bezerra FF, Rezende EP, Taveira MF, Pinhal I, Donangelo CM. Effect of calcium plus vitamin D supplementation during pregnancy in Brazilian adolescent mothers: a randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(1):82–91.
58. Cullers A, King JC, Van Loan M, Gildengorin G, Fung EB. Effect of prenatal calcium supplementation on bone during pregnancy and 1 y postpartum. *Am J Clin Nutr.* 2019;109(1):197–206.
59. Goldberg GR, Jarjou LM, Cole TJ, Prentice A. Randomized, placebo-controlled, calcium supplementation trial in pregnant Gambian women accustomed to a low calcium intake: effects on maternal blood pressure and infant growth. *Am J Clin Nutr.* 2013;97:72–82.

60. Tihtonen K, Korhonen P, Isojärvi J, Ojala R, Ashorn U, Ashorn P, et al. Calcium supplementation during pregnancy and maternal and offspring bone health: a systematic review and meta-analysis. *Ann N Y Acad Sci.* 2022;1509(1):23–36.
61. Diogenes MEL, Bezerra FF, Donangelo CM. Reduction in Bone Loss from 5 to 20 Weeks Postpartum in Adolescents Supplemented with Calcium Plus Vitamin D during Pregnancy Is Not Sustained at 1 Year Postpartum: Follow-up Study of a Randomized Controlled Trial. *J Nutr.* 2021;151(3):548–55.
62. Tihtonen K, Korhonen P, Isojärvi J, Ojala R, Ashorn U, Ashorn P, et al. Calcium supplementation during pregnancy and maternal and offspring bone health: a systematic review and meta-analysis. Vol. 1509, *Annals of the New York Academy of Sciences*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 23–36.
63. Prentice A, Sawo Y, Laskey A, Bennett J, Goldberg GR, Cole TJ. Randomized, placebo-controlled, calcium supplementation study in pregnant Gambian women: effects on breast-milk calcium concentrations and infant birth weight, growth, and bone mineral accretion in the first year of life 1-3 Landing MA Jarjou. Vol. 83, *Am J Clin Nutr.* 2006.
64. Ward KA, Jarjou L, Prentice A. Long-term effects of maternal calcium supplementation on childhood growth differ between males and females in a population accustomed to a low calcium intake. *Bone.* 2017 Oct 1;103:31–8.
65. Liu X, Wang X, Tian Y, Yang Z, Lin L, Lin Q, et al. Reduced maternal calcium intake through nutrition and supplementation is associated with adverse conditions for both the women and their infants in a Chinese population. *Medicine (United States).* 2017 May 1;96(18).
66. Koo WWK, Walters JC, Esterlitz J, Levine RJ, Bush AJ, Sibai B. *Maternal Calcium Supplementation and Fetal Bone Mineralization.* 1999.
67. Diogenes MEL, Bezerra FF, Rezende EP, Donangelo CM. Calcium plus vitamin D supplementation during the third trimester of pregnancy in

- adolescents accustomed to low calcium diets does not affect infant bone mass at early lactation in a randomized controlled trial. *Journal of Nutrition*. 2015;145(7):1515–23.
68. Bergel E, Gibbons L, Rasines MG, Luetich A, Belizán JM. Maternal calcium supplementation during pregnancy and dental caries of children at 12 years of age: Follow-up of a randomized controlled trial. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2010 Nov;89(11):1396–402.
 69. Rigalli A. Experimental Surgical Models in the Laboratory rat. Euthanasia. Rigalli A, Di Loreto VE, editors. 2009. 31–2 p.
 70. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey 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(11):1939–51.
 71. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals. Vol. 1. Ottawa: ©Canadian Council on Animal Care; 1993.
 72. Russell W, Burch R. The Principles of Humane Experimental Technique by W.M.S. Russell and R.L. Burch. Russell W, Burch R, editors. London: Methuen; 1959.
 73. Brun Lucas R, Brance María Lorena , De Candia Lucas F RA. Intestinal everted sacs. In: Alfredo R, Di Loreto VE, editors. *Experimental Surgical Models in the Laboratory rat*. Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group; 2009. p. 99–102.
 74. Parfitt A. Stereologic basis of bone histomorphometry; theory of quantitative microscopy and reconstruction of the third dimension. In: Recker RR, editor. *Bone histomorphometry: techniques and interpretation*. Boca Raton, USA: CRC Press; 1983. p. 53–85.
 75. Hildebrand T, Laib A, Müller R, Dequeker J, Rüeegsegger P. Direct Three-Dimensional Morphometric Analysis of Human Cancellous Bone: Microstructural Data from Spine, Femur, Iliac Crest, and Calcaneus. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(7):1167–74.

76. Harrar K, Hamami L. An interconnectivity index for osteoporosis assessment using X-Ray images. *J Med Biol Eng.* 2012;33(6):569–75.
77. Olausson H, Laskey MA, Goldberg GR, Prentice A. Changes in bone mineral status and bone size during pregnancy and the influences of body weight and calcium intake. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(4):1032–9.
78. Jarjou LMA, Sawo Y, Goldberg GR, Ann Laskey M, Cole TJ, Prentice A. Unexpected long-term effects of calcium supplementation in pregnancy on maternal bone outcomes in women with a low calcium intake: A follow-up study. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2013;98(3):723–30.
79. Nishiwaki MI, Yasumizu T, Hoshi K, Ushijima H. Effect of Pregnancy, Lactation and Weaning on Bone Mineral Density in Rats as Determined by Dual-Energy X-ray Absorptiometry. Vol. 46, *Endocrine Journal.* 1999.
80. Wang YL, Wu H, Bin Liu Y, Leblanc J. Newborn bone mineral density and health care during pregnancy. Vol. 16, *J Bone Miner Metab.* 1998.
81. Liu Z, Qiu L, Chen Y ming, Su Y xiang. Effect of milk and calcium supplementation on bone density and bone turnover in pregnant Chinese women: a randomized controlled trail. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;283(2):205–11.
82. Wiener Lab. ALP 405.
83. Takeda T, Kimura M, Itokawa Y. Imbalance of Calcium, Magnesium, and Phosphorus in Bone and Other Tissues of Rats Induced by Low Protein and Calcium Deficiency. Vol. 39, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1993.
84. Sharma A, Michels L V., Pitsillides AA, Greeves J, Plotkin LI, Cardo V, et al. Sexing Bones: Improving Transparency of Sex Reporting to Address Bias Within Preclinical Studies. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2023 Jan 1;38(1):5–13.
85. Braw Y, Malkesman O, Dagan M, Bercovich A, Lavi-Avnon Y, Schroeder M, et al. Anxiety-like behaviors in pre-pubertal rats of the Flinders Sensitive Line (FSL) and Wistar-Kyoto (WKY) animal models of depression. *Behavioural Brain Research.* 2006 Feb 28;167(2):261–9.

86. Leela Raman M, Rajalakshmi M, Krishnamachari K. Effect of calcium supplementation to undernourished mothers during pregnancy on the bone density of the neonates. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 1978.
87. Suntornsaratoon P, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Positive long-term outcomes from presuckling calcium supplementation in lactating rats and the offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2015;308:1010–22. Available from: <http://www.ajpendo.org>
88. Seeman E, Pierre DD. Bone quality: The material and structural basis of bone strength. *J Bone Miner Metab*. 2008;26(1):1–8.
89. Kovacs CS. Calcium, phosphorus, and bone metabolism in the fetus and newborn. *Early Hum Dev*. 2015 Nov;91(11):623–8.
90. Benevenga NJ, Calvert C, Eckhert CD, Fahey GC. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. Fourth Ed. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*,. National Academies Press; 1995.