



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
NUCLEARES



ININ

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN FÍSICA MÉDICA

Efecto de la ovariectomía, diabetes Mellitus Tipo 2 y bebida
gaseosa sabor cola sobre la absorciometría de rayos-X en
fémur murino

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN FÍSICA MÉDICA

PRESENTA

Samantha Guadalupe Gutiérrez Hernández

Comité de Tutores: Dr. en C. Eugenio Torres García
Dr. en I.M. Rigoberto Oros Pantoja
Dra. en C. S. Nallely P Jiménez Mancilla



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

2021

Índice

Resumen	4
Abreviaturas	7
Índice de figuras	8
Índice de tablas	9
Índice de graficas	10
Capítulo 1	11
INTRODUCCIÓN	11
Planteamiento del problema	12
Capítulo 2	14
ESTADO DEL ARTE	14
Pregunta investigación	15
Hipótesis	15
Objetivos	15
General	15
Específicos	16
Capítulo 3	17
MARCO TEÓRICO	17
Ingredientes de las bebidas carbonatadas sabor cola	17
Sistema óseo	18
Ingesta de bebida sabor cola y Densidad Mineral Ósea	19
Diabetes Mellitus tipo 2 y Densidad Mineral Ósea	20
Cambios hormonales y Densidad Mineral Ósea	21
Producción de rayos x e interacción con la materia	22
Métodos de segmentación de imágenes	25
Cuantificación por absorciometría	26
Capítulo 4	29
METODOLOGÍA	29
Modelo animal	29
Reproducción y crianza	29
Ingesta de bebida carbonatada sabor cola	30
Ovariectomía	30

Inducción de diabetes	31
Obtención de fémures	32
Densidad volumétrica del fémur	32
Adquisición de imágenes	33
Segmentación y Absorciometría	34
RESULTADOS	36
Modelo animal	36
Reproducción y crianza	36
Ingesta de bebidas carbonatadas sabor cola	42
Ovariectomía	44
Inducción de diabetes	46
Obtención de fémures	48
Densidad volumétrica	50
Adquisición de imágenes	52
DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA	67

Resumen

En el 2017 el Instituto Mexicano del Seguro Social brindó atención a 4 mil 561 mujeres que sufrieron fracturas óseas, principalmente en la zona de la cadera y columna. Esto representa un riesgo para la población mexicana, ya que no se conocen las causas exactas que afectan al sistema óseo. Dado que la absorciometría de rayos-X está asociada a la resistencia de los huesos, para entender mejor las causas de la fragilidad del sistema óseo, el objetivo de este estudio fue cuantificar los cambios en la absorciometría de rayos x del fémur, de un grupo de ratonas de 30 semanas de edad con diabetes mellitus tipo 2, ovariectomía y sometidas a ingesta de bebidas carbonatadas sabor cola. Se emplearon grupos de murinos de la cepa CD1 con n=5 para cada grupo los cuales se nombraron como: grupo control joven (GC1), grupo ovariectomía + bebida carbonatada (GOVX-C), grupo diabetes mellitus tipo 2 + bebida carbonatada (GDMT2-C), grupo ovariectomía + diabetes mellitus tipo 2 + bebida carbonatada (GOVX-DMT2-C) y grupo control joven (GC2) los cuales fueron criados bajo la NOM-062-ZOO-1999. La bebida carbonatada fue suministrada a partir de la 4ta semana de vida y fue rebajada con agua (1:1) para su consumo. La deficiencia de estrógenos se indujo con la ovariectomía practicada a las 10 semanas de edad. A las 12 semanas de edad se utilizó monohidrato de alloxan para la inducción de diabetes mellitus tipo 2. Las imágenes de rayos X del fémur obtenidas a las 30 semanas fueron analizadas mediante segmentación de imágenes por el modelo de umbral utilizando MatLab para determinar la absorción promedio de rayos X en cada grupo y posteriormente se compararon con un grupo de ratonas hembra jóvenes de 10 semanas de edad. Con los resultados obtenidos de absorción y el protocolo SXA se determinaron los cambios en la densidad radiológica de los grupos de estudio. La absorciometría de fotones muestra un grado de osteoporosis en el fémur de los grupos murinos estudiados a las 30 semanas de edad. Se observa un efecto sinérgico en la desmineralización producido por el consumo de bebida carbonatada, DMT2 y OVX. El grupo control de 30 semanas también se encuentra dentro de los grupos con déficit de absorción de rayos-X en el fémur, por lo que la edad de las ratonas puede

ser considerada como otra afectación más, la cual incrementa la desmineralización en el sistema óseo, lo que aumenta el riesgo de fractura.

Abstract

In 2017, the Mexican Social Security Institute provided care to 4 thousand 561 women who suffered bone fractures, mainly in the hip and spine area. This represents a risk for the Mexican population, since the exact causes that affect the bone system are unknown. X-ray absorptiometry is associated with bone strength, in order to better understand the causes of bone system fragility, the objective of this study was to quantify the X-ray absorptiometry changes in femur of 30-week-old female mice with type 2 diabetes mellitus, ovariectomy and subjected to intake of cola-flavored carbonated beverages. Groups of murine CD1 strain with n=5 for each group were used and named as: young control group (GC1), ovariectomy + carbonated beverage group (GOVX-C), type 2 diabetes mellitus + carbonated beverage group (GDMT2-C), ovariectomy + type 2 diabetes mellitus + carbonated beverage group (GOVX-DMT2-C) and young control group (GC2) which were bred under NOM-062-ZOO-1999. The carbonated drink was supplied from the 4th week of life and was reduced with water (1: 1) for consumption. Estrogen deficiency was induced with ovariectomy performed at 10 weeks of age. At 12 weeks of age, alloxan monohydrate was used for induction of type 2 diabetes mellitus. X-ray images of the femur obtained at 30 weeks were analyzed by threshold model image segmentation using MatLab software to determine the average X-ray absorption in each group and then compared with a group of young female mice at 10 weeks of age. Using the obtained absorption results and the SXA protocol, a change in the radiological density of the study groups were determined. Photon absorptiometry shows a degree of osteoporosis in the femur of the murine groups studied at 30 weeks of age. A synergistic effect on demineralization produced by the consumption of carbonated beverage, DMT2 and OVX is observed. The 30-week-old control group is at the same time included in the groups with a deficit of X-ray absorption in the

femur, so that the age of the mice can be considered as another affectation, which increases the demineralization in the bone system, increasing the risk of fracture.

Abreviaturas

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

DMO: densidad mineral ósea

DMT2: diabetes mellitus tipo 2

OVX: ovariectomía

SXA: Single-energy X-ray absorptiometry

DXA: Dual-energy X-ray absorptiometry

GC1: grupo control 1

GOVX-C: grupo ovariectomía y bebida sabor cola

GDMT2-C: grupo diabetes mellitus tipo 2 y bebida sabor cola

GOVX-DMT2-C: grupo ovariectomía, diabetes mellitus tipo 2 y bebida sabor cola

GC2: grupo control 2 o grupo control joven

Índice de figuras

Ilustración 1 Partes del fémur	19
Ilustración 2 Toma de glucosa.....	44
Ilustración 3 Incisión zona abdominal.....	44
Ilustración 4 Extirpación de los ovarios	45
Ilustración 5 Aparato de rayos X	53
Ilustración 6 Imagen radiográfica digital de los fémures.....	54
Ilustración 7 Imagen radiográfica digital original.....	55
Ilustración 8 Imagen RGB	55
Ilustración 9 Imagen radiográfica en escala de grises.....	56
Ilustración 10 Segmentación parte distal.....	57
Ilustración 11 Segmentación parte cuerpo	57
Ilustración 12 Segmentación parte proximal	58
Ilustración 13 Segmentación con contraste BW de la parte del cuerpo del fémur.	59
Ilustración 14 Segmentación en escala de grises masked image de la parte del cuerpo del fémur	59
Ilustración 15 Valores promedio de la segmentación	60
Ilustración 16 Absorciometría de ambos fémures	61
Ilustración 17 Absorciometría de la parte proximal del fémur.....	61

Índice de tablas

Tabla 1 Densidad GOVX-C	50
Tabla 2 Densidad de GC1	50
Tabla 4 Densidad de GOVX-DMT2-C	50
Tabla 3 Densidad de GDMT2-C	50
Tabla 5 Densidad de GC2	51

Índice de graficas

Gráfica 1 Consumo de agua GC1	36
Gráfica 2 Consumo de comida GC1.....	37
Gráfica 3 Peso corporal GC1	37
Gráfica 4 Consumo de comida GOVX-C, GDMT2-C y GOVX-DMT2-C.....	38
Gráfica 5 Consumo de refresco/agua.....	38
Gráfica 6 Peso corporal GOVX-C.....	39
Gráfica 7 Peso corporal promedio del GDMT2-C.....	40
Gráfica 8 Peso corporal GOVX-DMT2-C.....	40
Gráfica 9 Peso corporal grupo GC2	41
Gráfica 10 Consumo de agua del grupo GC2	41
Gráfica 11 Consumo de comida del grupo GC2.....	42
Gráfica 12 Consumo promedio de refresco/agua.....	43
Gráfica 13 Peso promedio de los órganos por grupo	49
Gráfica 14 Peso promedio del fémur por grupo.....	51
Gráfica 15 Densidad promedio del fémur por grupo.....	52

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

En México en el año 2017 se brindaron 4 mil 561 atenciones a mujeres que sufrieron fracturas óseas, principalmente en la zona de la cadera y columna. Se estimó que las lesiones del sistema músculo-esquelético ocupan el segundo lugar en la demanda de atención quirúrgica en el IMSS, de las cuales las fracturas de cadera son las más destacables, dado al índice de tasa de mortalidad del 20% durante el primer año de tratamiento. Según cifras del IMSS en el 2018 se asignaron 100 mil 140 consultas para diagnóstico por primera vez e inicio de tratamientos para osteoporosis [1]. Además, se estimó que mundialmente ocurren 1.6 millones de fracturas de cadera al año. Las fracturas están asociadas con un cambio en la densidad mineral ósea [2].

De acuerdo con el Consejo Nacional de Población (CONAPO) en 2018, el 14.1% de la población en México son mujeres de 45 años o más, las cuales tienen una mayor probabilidad de padecer fracturas en su sistema óseo debido a la aparición de la menopausia y consecuentemente la deficiencia de estrógenos.

Sumado a lo anterior, la población mexicana tiene un alto consumo de bebidas carbonatadas sabor cola y se estimó que el consumo de esta bebida es a partir de la niñez con una cantidad de aproximadamente 612 ml por día. Esto desencadena en múltiples enfermedades, las principales son obesidad y diabetes mellitus [3], de igual manera los ingredientes que contienen este tipo de bebidas producen fragilidad en los huesos. Otro de los riesgos para padecer una baja densidad mineral ósea es la diabetes. En 2016 se encontró que el 10.3% de las mujeres en México padece algún tipo de diabetes, en la cultura mexicana no se tienen las medidas de prevención adecuadas para controlar dicha enfermedad [4].

Existen varios factores que se asocian con la descalcificación de los huesos y cambios en la densidad mineral ósea (DMO). Por esa razón en este proyecto, se estudiaron los efectos de la ovariectomía, la diabetes mellitus tipo 2 y la ingesta de bebidas carbonatadas sabor cola en la DMO, la desmineralización y fragilidad del sistema óseo utilizando la absorciometría de fotones de rayos X en el fémur murino.

Planteamiento del problema

La densidad mineral ósea se relaciona con la resistencia a fractura de los huesos, si ésta disminuye, aumenta el riesgo de fractura. Con base a protocolos establecidos para humanos, la DMO se determina a través de la medición de la absorciometría de rayos X (SXA y DXA) y dependiendo del valor obtenido se determina probabilidad de riesgo de fractura. La magnitud de la absorciometría se relaciona con la densidad de los huesos que puede verse afectada por distintos parámetros, entre los que se encuentran: la ingesta de bebidas carbonatadas sabor cola, la diabetes mellitus tipo 2 y la deficiencia de estrógenos en el caso de las hembras.

México es uno de los mayores consumidores de bebidas carbonatadas sabor cola en el mundo, este tipo de bebidas contienen fósforo, magnesio y cafeína, los cuales pueden provocar una inadecuada absorción de calcio en el sistema óseo y pudiera provocar fracturas. Se estima que en México el consumo de dichas bebidas empieza a partir de los 10 años de edad, además de lo anterior estos y otros factores contribuyen a desencadenar enfermedades como la diabetes mellitus. La diabetes mellitus se presenta cuando el páncreas no produce suficiente insulina y los niveles de glucosa en la sangre son demasiado elevados. En el 2016 existía un aproximado de 6.4 millones de mexicanos con este padecimiento. Se tienen reportes que demuestran que el control glucémico inadecuado y un aumento en la masa corporal puede producir fragilidad en los huesos debido a la acumulación de microgrietas. Sumado a lo anterior, las variaciones en la DMO también se producen por cambios hormonales provocados por la deficiencia de estrógenos, condición que se alcanza

de forma natural (menopausia) o de forma quirúrgica a través de la extirpación de los ovarios (ovariectomía).

Dada la relación directa entre densidad de los huesos con la absorción de rayos X, lo que se realizó en este proyecto fue analizar el cambio en la absorciometría que generaron estos tres factores en conjunto: diabetes mellitus tipo 2, ovariectomía e ingesta de bebidas carbonatadas sabor cola en un solo grupo de murinos hembra. Y a su vez se determinó si existe sinergia en la descalcificación entre los tres factores mencionados.

Capítulo 2

ESTADO DEL ARTE

En nuestro país, en 2018 se consumieron 1,994.6 millones de litros de refrescos y bebidas carbonatadas, según la Asociación Nacional de Productores de Refrescos y Aguas Carbonatadas (Anprac). Las bebidas sabor cola son las de mayor consumo, este tipo de bebidas contienen fósforo, magnesio y cafeína, lo cual provoca una obstrucción de la absorción de calcio en los huesos y contribuyen a su deterioro al crear o incrementar la fragilidad de los huesos y el riesgo a fracturas. De acuerdo a M. Ohta y colaboradores el consumo de cafeína produce una mayor pérdida de calcio por medio de las vías urinarias lo que conlleva un déficit de absorción de dicho mineral en el sistema óseo en ratones [5].

Además, un estudio realizado en la Universidad de Sao Paulo en Brasil muestra que a las ratas que se les retiró un diente a las 6 semanas de vida y posteriormente se les suministro bebidas carbonatadas sabor cola desde el destete hasta las 10 semanas de edad, mostraron que existe un retraso en la curación del hueso alveolar y de igual manera una temprana interrupción en la formación del hueso maxilar [6].

Otro de los factores que más afectan a la población mexicana es el caso de la diabetes mellitus tipo 2. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Ensalud) en el 2016 existía un aproximado de 6.4 millones de mexicanos con problemas de diabetes en etapa adulta. De ese total 3.77 millones son mujeres y 2.69 millones son hombres. Un estudio realizado por Ling Oei y colaboradores demuestran que un control glucémico inadecuado cuando se tiene DM-2 puede producir fragilidad en los huesos debido a una acumulación de microgrietas [7]. Para el caso de murinos se encontró que un estudio realizado en la Universidad de Ciencias Médicas de Suzuka Japón demostró que la masa ósea y la resistencia del fémur se reducen significativamente, esto es producido por la hiperglucemia en ratones con diabetes [8].

En México las mujeres entre 45 y 55 años de edad presentan la menopausia, la cual se representa con cambios hormonales y falta de segregación de estrógenos, que tienen como consecuencia trastornos físicos, mentales y emocionales. De acuerdo a una publicación de M. Pérez la menopausia ya sea de forma natural o quirúrgicamente (ovariectomía) se ve asociada con la pérdida de masa ósea [9]. Un estudio realizado en murinos por N. Omi e I. Ezawa demuestran que después de realizar la ovariectomía la densidad mineral ósea del hueso trabecular disminuye, este se encuentra en el interior del tejido óseo y se encarga de formar las placas que se localizan en las cavidades internas del esqueleto [10].

Pregunta investigación

¿La ingesta de bebidas carbonatadas, diabetes mellitus tipo 2 y la ovariectomía afectan la absorción de rayos X del fémur en modelos murino?

Hipótesis

La absorción de los rayos X en la zona del fémur murino se ve afectada debido al consumo de bebidas carbonatadas sabor cola, diabetes mellitus tipo 2 y ovariectomía.

Objetivos

General

Determinar los cambios en la absorción de rayos X en el fémur de ratonas CD1 con DMT2, ovariectomía y que consumieron bebidas carbonatadas sabor cola.

Específicos

- a) Reproducir y criar a los grupos de ratonas CD1.
- b) Suministrar la bebida carbonatada sabor cola a las ratonas correspondientes después del destete, lo que corresponde a 4 semanas de edad.
- c) Realizar la ovariectomía a las 10 semanas de edad a las ratonas de los grupos correspondientes y dejar recuperar por dos semanas.
- d) Inducir a los grupos de ratonas correspondientes la DM-2 a las 12 semanas de edad.
- e) Cuantificar la absorción de rayos-X en el fémur en todos los grupos.
- f) Determinar si existe un incremento de riesgo de fractura con base en la absorciometría.

Capítulo 3

MARCO TEÓRICO

Ingredientes de las bebidas carbonatadas sabor cola

De acuerdo a la página oficial de la Coca-Cola una porción de 100 ml de Coca-Cola original tiene el siguiente aporte nutricional [11]:

- Calorías: 127.5 kJ
- Grasas totales: 0 gr
- Sodio: 10 mg
- Carbohidratos totales: 7.5 gr
- Azúcares totales: 7.5 gr

Los ingredientes que contiene una porción de 100 ml son:

- Agua carbonatada
- Azúcares añadidos (azúcar)
- Color caramelo clase IV
- Ácido fosfórico
- Saborizantes sucralosa (4.4 mg/100 g)
- Cafeína

Sistema óseo

El hueso es un tejido dinámico el cual tiene un proceso de remodelación a lo largo de toda la vida, el cual contiene 99% de calcio, 85% de fosfato, 60% de magnesio y 35% de sodio.

Los huesos se pueden clasificar de acuerdo a su forma, los principales son 3:

- 1) Huesos largos: la longitud es predominante sobre el ancho y el espesor. Lo constituyen la diáfisis y dos epífisis (p. ej. Metacarpianos, fémur y tibia)
- 2) Huesos cortos: tienen semejanza entre sus tres ejes y se encuentran en el tarso y carpo (p. ej. Los huesos carpianos de la mano)
- 3) Huesos planos: la longitud y el ancho tienen mayor dominio, ya que su espesor es menor. Forman las paredes de las cavidades nasales, pelvianas, orbitarias y craneales.

La estructura del hueso está conformada por un tejido conectivo mineralizado el cual tiene dos variedades morfológicas cortical o compacto y trabecular o esponjoso. El hueso compacto se encuentra presente en la diáfisis de los huesos largos el cual forma una capa periférica y continua la cual sirve como envoltura del tejido esponjoso. El hueso esponjoso está constituido de una serie de laminillas o trabéculas irregulares ocupados por la médula ósea. De acuerdo a la orientación de las trabéculas estas permiten al hueso un mayor soporte y resistencia [12, 13].

En este proyecto se basó principalmente en la zona del fémur, el cual se localiza en la zona del muslo, es el hueso con mayor volumen además es el más largo y fuerte. En la parte superior está unido al hueso coxal, el cual forma parte de la cadera y en la parte inferior por medio de la articulación femorotibial se une con la tibia (Ilustración 1) [14].

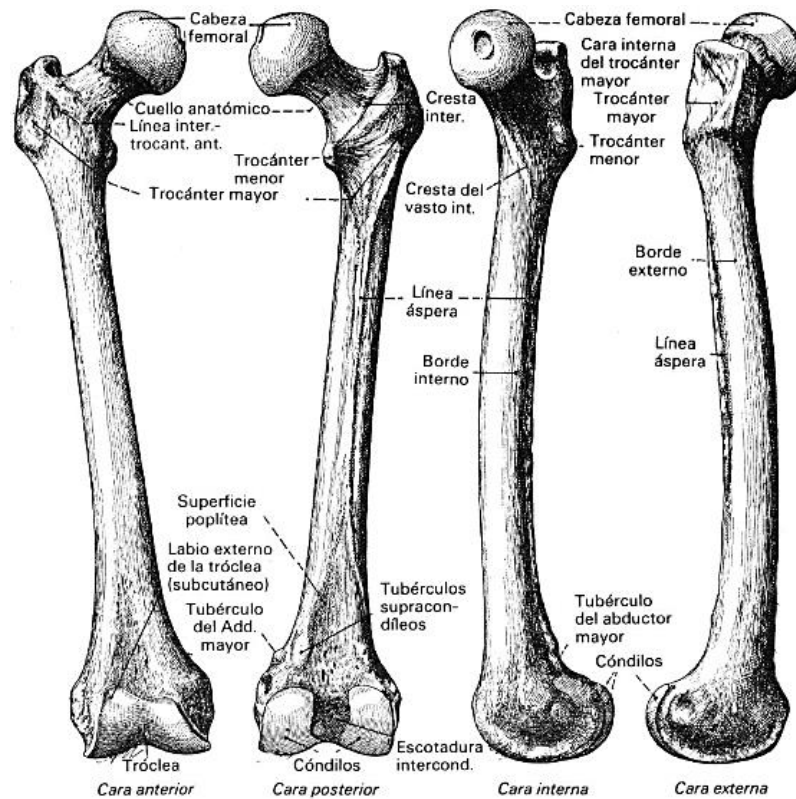


Ilustración 1 Partes del fémur [15]

La resistencia ósea se ve afectada por las propiedades materiales (minerales, colágeno y micro daños) y estructurales (geometría y microarquitectura) del hueso, las cuales si sufren un cambio pueden llegar a generar fracturas en el sistema esquelético, lo cual genera una fragilidad ósea [16].

Ingesta de bebida sabor cola y Densidad Mineral Ósea

En nuestro país, en 2018 se consumieron 1,994.6 millones de litros de refrescos y bebidas carbonatadas, según la Asociación Nacional de Productores de Refrescos y Aguas Carbonatadas (Anprac). Las bebidas sabor cola son las de mayor consumo, debido a que éstas contienen fósforo, magnesio y cafeína, obstruyen la absorción de calcio en los huesos y contribuyen a su deterioro al crear o incrementar la fragilidad de los huesos y el riesgo a fracturas. En el caso de consumo de cafeína,

estudios demuestran tener una mayor pérdida de calcio por las vías urinarias, que tiene como efecto un déficit de absorción de dicho mineral en el sistema óseo [5]. Hay estudios que mostraron que el consumo de bebidas sabor cola se asocia con la baja densidad mineral ósea (DMO), en el caso de las mujeres esta se encuentra con mayor presencia en la zona del fémur [17, 18]. Además, estudios a corto plazo de aproximadamente 10 días en humanos indicaron que, cambiando la ingesta de leche por bebidas de cola, tiene impactos negativos en la salud ósea, no se sabe si este fenómeno es transitorio o si tiene consecuencias a largo plazo [19, 20]. Estudios determinaron una significativa asociación entre el consumo de bebidas de cola y el aumento de riesgo en fracturas óseas, examinando la relación entre la ingesta de bebidas de cola y la densidad mineral ósea en ratas ovariectomizadas. Estos datos sugieren que la ingesta excesiva de bebidas sabor cola es un factor potencial para reducir la densidad mineral femoral [21]. Un estudio que se realizó a 85 mujeres en edad menopáusica (entre 49 y 67 años) que consumían en promedio 7 botellas de refresco a la semana mostraron una disminución significativa de calcio, provocando una hipocalcemia, la cual impide la absorción de calcio en los tejidos y huesos [22, 23].

Diabetes Mellitus tipo 2 y Densidad Mineral Ósea

La diabetes es una enfermedad que se presenta cuando los niveles de glucosa en la sangre son demasiado elevados. La insulina es una hormona que se produce en el páncreas, la cual ayuda a que la glucosa que se encuentra en los alimentos sea procesada y se utilice como energía. La diabetes se manifiesta cuando la producción de insulina es insuficiente o nula para procesar la glucosa [24]. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Ensalud) en el 2016 existía un aproximado de 6.4 millones de mexicanos (9.4%) con problemas de diabetes en etapa adulta. De ese total el 10.3 % son mujeres y el 8.4% son hombres. Si lo comparamos con la encuesta obtenida por el ENSALUD del 2006, cuyo resultado

fue del 7.2% de la población con un diagnóstico médico previo, observamos un gran aumento en dicho porcentaje [25].

La diabetes se puede clasificar de tres maneras, la diabetes mellitus Tipo I (DM-1) es cuando el cuerpo no produce insulina, generalmente aparece en niños y jóvenes; la diabetes mellitus Tipo II (DM-2), se presenta cuando se tiene baja producción de insulina, este tipo de diabetes suele presentarse en personas con obesidad y representa un 85 a 90% de los casos existentes de diabetes; y la diabetes mellitus gestacional (DMG), está afecta a mujeres durante el periodo de gestación, la cual, en la mayoría de los casos, desaparece al nacer el bebé. Cuando una mujer tiene DMG tiene mayor probabilidad de padecer DM-2 en un futuro [26, 27].

Estudios demostraron que un control glucémico inadecuado cuando se tiene DM-2 puede producir fragilidad en los huesos debido a una acumulación de microgrietas. De igual manera se encontró, que para este tipo de pacientes la DMO se ve afectada por el índice de masa corporal (IMC) y hay mayor riesgo a sufrir fracturas [7]. Otros estudios han reportado que la DMO en personas adultas con DM-1 es menor en comparación con la de personas con DM-2, particularmente en mujeres con sobrepeso [28]. Además, se ha comprobado que las personas que llevan mayor tiempo diagnosticadas con DM-2 tienen una probabilidad más alta de sufrir fracturas óseas, especialmente en la zona de la cadera, probabilidad que aumenta después de 10 años de con dicho padecimiento [29].

Cambios hormonales y Densidad Mineral Ósea

La menopausia es un momento en la vida de la mujer que se caracteriza por la falta de menstruación en un transcurso de 6 meses. De igual manera la producción de estrógenos se ve afectada por dicha condición. En México las mujeres entre 45 y 55 años de edad presentan este cambio hormonal, el cual trae como consecuencia trastornos físicos, mentales y emocionales. Se ha estudiado que la llegada de la

menopausia se ve asociada con la pérdida de masa ósea, dado a que ya sea natural o quirúrgicamente los ovarios dejan de segregar estrógeno [9].

La ovariectomía (OVX) se define como la extirpación quirúrgica de los ovarios, dicho procedimiento se puede llevar a cabo para prevenir ciertas enfermedades como el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino [30]. Se ha demostrado que el trabajar con ratas ovariectomizadas es un buen prototipo para analizar la osteoporosis en mujeres menopáusicas. Esta enfermedad se asocia con la pérdida ósea o la disminución de la DMO [31]. Se ha reportado que después de realizar la ovariectomía la DMO del hueso trabecular disminuye, este se encuentra en el interior del tejido óseo y se encarga de formar las placas que se localizan en las cavidades internas del esqueleto [10]. Estudios en otros animales como el caso de los perros demostraron resultados muy parecidos. Se encontró que al realizar la ovariectomía la porosidad del hueso trabecular de la costilla aumentaba un 18% en comparación con el grupo control [32].

La disminución de la DMO cuando se tiene menopausia es un proceso paulatino. Se ha demostrado que seis años después de que se diagnosticó, el diámetro periostio aumenta. El periostio es la parte fibrosa que cubre al hueso, el cual se encarga de que el hueso crezca y se obtenga nuevamente su forma después de una fractura. De igual manera se ha observado que después de ocho años el diámetro medular también sufre un aumento significativo [33]. Estudios demuestran que el tiempo en el cual se empieza a notar la disminución de DMO en ratones es después de las 12 semanas de que se practicó la ovariectomía [34], este tiempo es equivalente al de los humanos [35].

Producción de rayos x e interacción con la materia

Los fotones de rayos x se generan con una fuente de electrones. Estos son emitidos por un filamento llamado cátodo y son producidos por emisión termoiónica de dicho filamento. Los electrones son acelerados debido al potencial eléctrico y se impactan

sobre un blanco metálico que constituye el ánodo, el cual está hecho de wolframio o algún otro material de número atómico (Z) alto. Dependiendo de cómo interactúan los electrones con los átomos del blanco es como se pueden obtener los fotones de rayos x, los cuales los podemos encontrar de dos formas: como rayos x de frenado (bremsstrahlung) o los rayos x característicos.

La emisión de fotones por el proceso de frenado se genera cuando un electrón proyectil se aproxima al núcleo del átomo del material blanco y sufre una colisión inelástica, la cual modifica abruptamente su energía cinética como consecuencia de las grandes diferencias entre las cargas del núcleo y el electrón. Dicho cambio de energía cinética produce la emisión de un fotón de rayos x, esta emisión conforma el 85% de los fotones de rayos x.

La producción de fotones de rayos x por el método de rayos x característicos ocurre cuando el electrón proyectil interactúa con uno de los electrones de las capas internas del material blanco (K, L, M). La emisión de rayos x depende de la energía de ionización (o de amarre) con la que el núcleo interactúa con los distintos electrones de los orbitales. Por ejemplo, cuando el electrón de la capa K, es expulsado de su órbita, se genera una vacancia, dando lugar a que los electrones más próximos tomen su lugar. Esta transición de cambio de lugar implica una diferencia de energía entre las dos capas. Durante dicho “salto” de una capa hacia otra se emite un fotón de rayos x, cuyo nivel de energía va a depender de la capa en la que se genere la vacancia [36].

La interacción de un fotón con la materia a nivel macroscópico se aprecia por la atenuación que estos sufren a medida que colisionan con los átomos del material que están atravesando. Dicha atenuación ocurre a través de uno de los siguientes mecanismos: dispersión Rayleigh, efecto fotoeléctrico y el efecto Compton.

La ocurrencia de uno de estos procesos depende de la sección eficaz, la energía de enlace de los electrones del medio que se atraviesa y de la energía del fotón

incidente. Los fotones tienen una cierta probabilidad de atenuación por unidad de longitud cuando atraviesan la materia, la cual se denomina coeficiente de atenuación lineal (μ). Esta probabilidad es dependiente de la energía de los fotones, la densidad y el número atómico del medio que se atraviesan. Dicho coeficiente también puede variar de acuerdo con el estado físico o de agregación del medio que se atraviesa. En ocasiones, se define como coeficiente de atenuación atómico a la probabilidad de que un átomo del medio absorbente interactúe con uno de los fotones del haz incidente. El coeficiente de atenuación atómica también se le puede denominar sección eficaz macroscópica (σ). Las propiedades de atenuación de la materia varían de acuerdo con el número atómico (Z) del material absorbente y la energía de la radiación [36].

El efecto Compton ocurre cuando un fotón incidente interactúa con un electrón de las capas externas del átomo (considerado electrón libre), el cual produce un fotón dispersado con una energía menor al del incidente, y un electrón con una energía cinética igual a la diferencia de energía de ambos fotones. El electrón liberado pierde energía produciendo ionizaciones o excitaciones en el medio. La probabilidad de que ocurra el efecto Compton disminuye con el incremento de la energía del fotón y es independiente del número atómico del material absorbente. Aumenta cuando la densidad de los electrones por unidad de masa en el medio aumenta, por lo tanto, es proporcional a la densidad del medio dispersante [36].

El efecto fotoeléctrico sucede cuando el fotón incidente interactúa con un electrón de las capas internas y este desaparece, dando como resultado la producción de un fotoelectrón el cual toma la energía del fotón incidente y disipa su energía ionizando o excitando el medio en el cual se va a absorber. Además, hay producción de rayos x característicos y/o electrones Auger. La probabilidad de ocurrencia del efecto fotoeléctrico es de $\frac{Z^4}{E^3}$ donde Z es el número atómico del material absorbente y E es la energía del fotón incidente [37].

La dispersión Rayleigh tiene lugar cuando se tratan de bajas energías, entre los 15 y 30 keV. En este caso el fotón incidente se dispersa elásticamente en un rango de direcciones próximas a su dirección inicial, y excita al átomo en su conjunto. No se produce ionización, ni pérdida de energía o alteración atómica, pero si produce un efecto indeseado en la obtención de imágenes [38].

Métodos de segmentación de imágenes

La segmentación de imágenes médicas es una herramienta digital muy importante para la extracción y obtención de información, dado que estas imágenes no se pueden interpretar fácilmente. Gracias a esto se pueden clasificar características anatómicas de las imágenes, como es el caso de vértebras, tejido blando o huesos. Para analizar imágenes médicas por segmentación existen tres métodos clásicos: el método de umbral, el basado en regiones y el basado en bordes. Los mismos se detallarán a continuación [39].

El método de umbral: Cuando se tiene una imagen en escala de grises su umbral puede utilizarse para crear imágenes binarias. Esto hace que se reduzca la complejidad de los datos y permite que la clasificación y el reconocimiento de dicha imagen sean más fáciles. En este proceso, el umbral se utiliza para dividir la imagen en pequeños segmentos continuos o conjuntos de píxeles, los cuales se clasifican de acuerdo con su intensidad de color. El proceso más común para transformar una imagen que se encuentra en escala de grises es asignar un valor único de umbral. A partir de ese valor los píxeles negros se asignan como el fondo y los píxeles blancos al primer plano o viceversa, dependiendo de lo que se pretenda estudiar [40].

Método basado en regiones: El método se basa en tres principios, el crecimiento de regiones, en la división y fusión al igual que en el método de segmentación de cuencas. La idea principal del crecimiento por regiones es juntar píxeles con las mismas características utilizando un criterio de homogeneidad para construir una

región. Estos criterios de homogeneidad pueden ser la diferencia de intensidad del pixel, el contraste entre regiones o la intensidad de la región, entre otras más. Una de las ventajas de utilizar este método de segmentación por regiones es que es más rápido y preciso en regiones que tienen características similares, pero están separadas espacialmente. La desventaja de utilizar este método radica en la sensibilidad al ruido, lo que ocasiona que se produzcan segmentos no deseados o huecos. El resultado final se ve afectado por la selección de los píxeles [40, 41].

Método basado en bordes: En este caso los bordes de la imagen tienen un papel importante, especialmente en la detección y extracción de características. Estos se pueden apreciar como puntos en la imagen, gracias a que la intensidad luminosa de la imagen cambia. Si esta tiene un cambio brusco quiere decir que existe una gran probabilidad de que se trate de un borde. La desventaja de utilizar este tipo de segmentación es que es sensible al ruido y pueden encontrar bordes que no son de gran relevancia para delimitar el objeto [42].

Cuantificación por absorciometría

La American Association of Clinical Endocrinologist propuso una guía de prevención y manejo de la osteoporosis para mujeres, en la cual se propone que todas las mujeres de 65 años o mayores que presenten antecedentes de fracturas, postmenopáusicas o con algún desorden alimenticio se realicen una valoración ósea, además de repetir dicho estudio cada año [43]. Existen diferentes técnicas para valorar la DMO, pero todas se basan en el principio de atenuación de los rayos x o los fotones de rayos gamma cuando atraviesan un medio. Para poder obtener dicha atenuación se deben tener distintas consideraciones, como lo son el grosor del hueso y la densidad de los tejidos que atraviesa dicho haz. Después, estos valores son comparados con los valores estándar de una población normal y dichos resultados se expresan en desviaciones estándar en comparación a la población normal [44]. Las distintas técnicas son absorciometría fotónica simple (SPA),

absorciometría fotónica dual (DPA), absorciometría radiológica simple (SXA), absorciometría de rayos x de doble energía (DXA), tomografía cuantitativa computarizada (QCT), densitometría por ultrasonidos (BUA). En este caso hablaremos únicamente de la DXA y SXA.

La técnica de absorciometría tipo SXA se basa en la utilización de un tubo de rayos x y un detector de radiación que mide la atenuación de un haz de fotones monoenergético. La técnica requiere de una corrección para el tejido blando adyacente al área de interés en la que se mide la DMO. Dicha área de interés debe estar rodeada por un bolus de agua. En este caso, los fotones que no son absorbidos por el hueso y el tejido blando se cuentan en el detector de radiación, mientras más fotones se detecten la DMO será menor. SXA hace más fácil la cuantificación del contenido mineral óseo en zonas periféricas al esqueleto o con bajo tejido blando a su alrededor. Sin embargo, se ha dejado a un lado para utilizar el método de DXA y eliminar la necesidad de utilizar el bolus de agua [45].

Los escáneres tipo DXA analizan la DMO midiendo el paso de los rayos x a través del cuerpo a dos energías diferentes. El estudio en DXA presenta un amplio rango de energías de fotones. Los rayos x pasan a través de un área dada, la cual está compuesta por 2 tipos de materiales de referencia, que son minerales óseos y tejidos blandos, para dar lugar a estos dos picos fotoeléctricos. Los fabricantes de estos escáneres utilizan filtros para disminuir el haz a dos picos o los pulsos de la fuente de energía se alternan con los rayos x y esto genera un pico de energía dual. El uso de DXA tiene factores limitantes importantes, uno de ellos es la transmisión de rayos x. El cuerpo humano está compuesto por 3 tipos básicos de tejidos que son hueso, grasa y tejido blando, sin embargo, el DXA solo puede distinguir dos tipos ya que solo se tienen dos procesos de atenuación de rayos x, que son dispersión Compton y efecto fotoeléctrico. Si no se conoce como está compuesto el tejido blando que cubre a la región ósea de interés puede haber error en la medición de la DMO [46].

La DMO se puede medir con distintas técnicas como lo vimos anteriormente, una vez que se obtienen las muestras el software del fabricante utiliza la DMO obtenida en g/cm^2 y el valor lo convierte a T-score y el Z-score. Estos puntajes se expresan en desviaciones estándar y se comparan con una base de datos ya existente, los cuales se utilizan para el diagnóstico de la masa ósea. A partir de estos valores se evalúa si el paciente está dentro de los parámetros de tener osteopenia u osteoporosis y para ver el riesgo de fractura [47]. Ambos puntajes cuentan con una base de datos con la cual se compara la DMO del paciente con la de la media de la DMO máxima, pero se debe de tomar en cuenta el sexo del paciente y sus características físicas. La diferencia entre el T-score y el Z-score es que este último también toma en cuenta la edad del paciente dado que la edad también es un factor de riesgo para sufrir fracturas [48]. En base a la literatura se establecieron valores estándar para el análisis de la DMO y se catalogaron de la siguiente manera:

- 1) Normal: cuando se encuentra 1.0 desviación estándar por debajo de la tasa de normalidad joven ($\text{T-score} > -1.0$)
- 2) Osteopenia: una DMO entre 1.0 y 2.5 desviaciones estándar por debajo de la tasa de normalidad juvenil ($1.0 < \text{T-score} > -2.5$)
- 3) Osteoporosis: la DMO debe de estar 2.5 desviaciones estándar por debajo de la tasa de normalidad juvenil ($\text{T-score} < -2.5$)
- 4) Osteoporosis severa: 2.5 desviaciones estándar o más por debajo de la normalidad ($\text{T-score} < -2.5$) y tener en el historial una o más fracturas debido a la fragilidad [49].

Capítulo 4

METODOLOGÍA

Modelo animal

Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD1 las cuales fueron proporcionadas por del bioterio de la Facultad de Medicina de la UAEMex, dichas ratonas se separaron en 5 grupos de estudio con 5 ratones por cada grupo, los cuales son:

- Grupo control 1 (GC1)
- Grupo ovariectomía + bebida sabor cola (GOVX-C)
- Grupo diabetes mellitus tipo 2 + bebida sabor cola (GDMT2-C)
- Grupo ovariectomía + DMT2 + bebida sabor cola (GOVX-DMT2-C).

También se utilizó un grupo control 2 (GC2) o grupo control joven. Este estudio se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Durante el tiempo que duró este experimento las ratonas se mantuvieron en un ambiente de temperatura y humedad adecuadas con suministro de agua, refresco sabor cola y alimento ad libitum [50].

Reproducción y crianza

Para el proceso de reproducción se utilizaron hembras de ratón entre las 6 y 8 semanas de vida. De acuerdo a la literatura los ciclos de fecundación de las hembras son de 4 a 5 días, en este tiempo el ambiente debe de contar con un ciclo estándar de 12 horas día-luz. El celo en los ratones generalmente es durante los periodos de oscuridad. Se colocaron dos hembras y un macho en cada caja, la monta puede variar de 10 min hasta casi 1 hora. En caso de que la hembra resulte preñada la palpación de los fetos es posible a partir del 12avo o 14avo día. La gestación puede durar entre 18.5 y 19.5 días en las hembras primíparas y entre 19 y 21 días en las múltiparas, esto va a depender del estado fisiológico de las hembras

[51]. La lactancia puede durar entre 19 y 21 días. Para obtener el grupo control joven (GC2) se siguieron las mismas indicaciones de apareamiento antes mencionadas.

Ingesta de bebida carbonatada sabor cola

En el caso de la ingesta de bebidas carbonatadas sabor cola se utilizó la marca Coca-Cola y la proporción que se suministró fue de 50% de agua y 50% de bebida carbonatada sabor cola [52]. Para realizar esta mezcla se tomó en cuenta que es necesario retirar el gas que contiene la Coca-Cola, para ello se agitó la botella completamente sellada por aproximadamente 10 minutos y posteriormente se le retiró la tapa por 30 minutos, por último, se mezcló con el agua [53].

Ovariectomía

Para realizar la ovariectomía a los grupos de ratonas correspondientes fue necesario dejarlas en ayuno de 12 h para posteriormente realizarles la toma de glucosa. Se continuó con el pesaje para calcular la dosis de pentobarbital sódico que se debe de suministrar, de acuerdo a la literatura se necesita inyectar una mezcla de pentobarbital sódico diluido en solución inyectable de 50 mg/kg en forma intraperitoneal. Una vez que la anestesia hizo efecto se llevó a cabo la incisión de la ratona, la cual fue colocada en forma decúbito dorsal y se desinfecto el área abdominal, posteriormente se rasuro dicha zona para que se logre ver la línea alba de las ratonas y cortar por dicha línea. Primero se debe cortar la piel y posteriormente el tejido muscular, la incisión no debe ser mayor a 2 cm. A continuación, se empezó con la búsqueda de los ovarios, los cuales se encuentran detrás de los riñones, una vez localizados se comenzó a cortar cada ovario y a cauterizar los cuernos uterinos. Enseguida se procedió a suturar a la ratona, iniciando con el tejido muscular y posteriormente la piel. Se colocó a la ratona en forma decúbito ventral dentro de una caja con aserrín limpio y un paño absorbente,

en caso de que llegue a sangrar después de la cirugía, en espera de que la ratona despierte se estuvo monitoreando su mejora, por lo cual se le suministraron 7.5 mg de ketorolako sublingual diluido en agua, esto para calmar el dolor que se generó la cirugía [54, 55].

Inducción de diabetes

La inducción de diabetes fue mediante la administración de fármacos. Se utilizaron 150mg/kg de monohidrato de alloxan disueltos en 5% de solución salina normal a temperatura ambiente, la cual se suministró vía intraperitoneal. El monohidrato de alloxan es un compuesto hidrófilo inestable proveniente del derivado de la pirimidina, este tiene una estructura parecida a la glucosa. Debido a que el alloxan es hidrofílico impide la penetración de la bicapa lipídica de la membrana plasmática, mientras que su estructura similar a la glucosa permite la entrada del alloxan en las células beta, a través de los transportadores de proteínas GLUT2, las células beta del páncreas son las encargadas de producir insulina, lo que el alloxan genera es la destrucción selectiva de dichas células [56].

Estos daños se van dando por fases, la primera fase ocurre minutos después de la inyección, la cual dura aproximadamente 30 minutos y genera una hipoglucemia transitoria. La segunda fase se manifiesta 1 hora después, la cual produce un aumento de glucosa en la sangre además de disminución de insulina al mismo tiempo. En la tercera fase nuevamente se encuentra una hipoglucemia, la cual se puede observar de 4 a 8 horas posteriores a la inyección, esta fase se caracteriza por la pérdida de estructura en la membrana interna y externa de las mitocondrias, lo cual produce cambios irreversibles en las células pancreáticas. Por último, la cuarta fase es una hiperglucemia diabética, la cual produce una pérdida de las células beta en las siguientes 24 a 48 horas después de la inyección [57].

Estudios reportan que el suministro de monohidrato de alloxan en esta cantidad tiene un índice de mortalidad en los ratones del 25%, siendo esta la tasa más baja [58, 59].

Obtención de fémures

Cuando las ratonas cumplieron las 30 semanas de edad, se les retiró el fémur. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-199 apartado 9.4.1.3 la cual hace referencia al uso de dióxido de carbono (CO₂) como método de eutanasia seguro para los ratones dado a su rápido efecto anestésico, el CO₂ produce una muerte por hipoxia a los pocos minutos, además que es seguro de operar para el personal, no se acumula en los tejidos del ratón y no ocurre la deformación celular [50]. Se colocó a la ratona en una cámara de gas de CO₂ la cual debe de tardar aproximadamente de 3-6 min para que la ratona este completamente muerta. Una vez que la ratona falleció esta se posicionó en forma decúbito dorsal para continuar con la incisión. Se realizó la extirpación de los órganos principales, los cuales son el corazón, hígado, riñones y bazo. Después se procedió a retirarles el fémur, el cual fue limpiado cuidadosamente, quitando todo el exceso de tejido muscular y grasa que pudieran contener, para esto fue necesario cepillar el hueso con agua y jabón, después fueron limpiados con agua por aproximadamente 10 min para posteriormente secarlos y colocarlos en formol. Pasadas 24 horas es necesario cambiarlos a alcohol en 70% para prolongar su conservación [60].

Densidad volumétrica del fémur

Para el cálculo de la densidad del fémur es necesario saber que la densidad absoluta de un cuerpo es la relación entre la masa y el volumen que ocupa, se utilizó la siguiente fórmula $\rho = \frac{\text{masa (g)}}{\text{volumen (cm}^3\text{)}}$. Para conocer los datos necesarios se calculó el volumen utilizando el principio de Arquímedes, en este caso se llenó un

tubo de ensayo de plástico de 5 ml con 390 μ l de agua destilada, enseguida se sumergió el fémur y se pudo observar un desplazamiento de agua, después se cuantificó esa cantidad de agua desplazada utilizando una micropipeta Eppendorf [61]. En el caso de la masa cada uno de los fémures se obtuvo colocando cada hueso en una balanza digital.

Adquisición de imágenes

Se obtuvieron imágenes 3D en el PET/CT del Centro Oncológico Estatal del ISSEMYM marca Phillips, el cual se utilizó como adquisición de imágenes dentales por el tamaño que tienen los huesos, se utilizaron 120 kV y 80 mAs. Para la toma de imágenes se posicionaron los fémures de manera que estos no se movieran, la parte de la epífisis distal quedó orientada hacia el cabezal y se acomodaron de izquierda a derecha, los huesos fueron colocados sobre plástico film con su respectivo etiquetado. Se adquirieron 512 imágenes en corte coronal, 512 en corte sagital y 782 en corte axial.

Además, se obtuvieron las imágenes radiográficas con un aparato de rayos x dental de la marca Gnatus de pedestal con 70 kV y 8 mAs, el cabezal se colocó de forma vertical sobre los huesos, los cuales fueron colocados sobre un sensor de radiografía Xios Supreme Dentsply Sirona para ser digitalizadas dichas radiografías, los huesos se colocaron sobre plástico film para evitar su movimiento y cada uno con su respectivo etiquetado.

Para una tercera toma de las imágenes se utilizó un aparato de rayos x de uso veterinario, el tubo de rayos x de la marca EUREKA modelo EMERALD-1-2 se utilizaron 60 kVp y un amperaje de 200 mA, los fémures se acomodaron en un campo de 14x17cm, los cuales fueron colocados de izquierda a derecha orientados con la parte de la epífisis distal hacia arriba y colocados sobre plástico film para que estos no se movieran, además a cada hueso se le colocó respectivo etiquetado.

Segmentación y Absorciometría

Para la segmentación de imágenes se utilizó el método umbral en MatLab. El cual consiste en dividir la imagen en pequeños segmentos y clasificar la intensidad de las escalas de grises [62].

Para realizar la técnica de segmentación de imágenes se realizó utilizando el programa MatLab en su versión 2017b, el cual trae una aplicación para segmentar imágenes. El código consiste en que se toma la imagen radiográfica en formato JPG y esta es cambiada de forma matricial a forma vectorial, para después cambiarlo de formato RGB a escala de grises, la cual se guardará como una nueva imagen. Esta nueva imagen se deberá abrir con la aplicación “Image segmenter” la cual nos desplegará la imagen en escala de grises, la cual podemos observar más cerca en el apartado de “zoom in”, en este caso se segmentará el hueso en tres partes epífisis proximal, cuerpo y epífisis distal. Una vez que se acercó la imagen y se selecciona la parte a segmentar con el apartado “draw freehand” con el cual se debe delimitar la zona del hueso que queremos segmentar, una vez seleccionado la zona se torna en color amarillo, posteriormente debemos de exportar tanto la imagen BW como la maskedImage. Después el programa retirará los ceros de la matriz del pedazo segmentado y obtendrá los valores de escala de grises de dicha segmentación. Además, el programa deberá contar con el comando “mean” para que automáticamente arroje el resultado promedio en escala de grises de la segmentación. De acuerdo a la literatura se recomienda definir la densidad óptica en una escala de grises de 0-255 siendo el 0 como el valor de la ausencia de fotones (negro) y el valor de 255 como el de mayor absorción de fotones (blanco) [63] .

Una vez segmentados los huesos de cada ratona se realizó un promedio general de escala de grises para cada grupo, lo cual nos indicó la absorción de fotones para cada uno de estos grupos. Posteriormente se comparó con los valores de GC2, de acuerdo a los parámetros establecidos por el protocolo DXA se deben de comparar la desviación estándar de los grupos de estudio contra los valores de un grupo control joven. Por lo cual se obtuvo la primera y segunda desviación estándar de los grupos GOVX-C, GDMT2-C y GOVX-DMT2-C para confirmar la absorción de

fotones en el hueso y se determinó el riesgo de fractura ósea. Además se determinó el valor de T-score para los grupos de estudio, de acuerdo a la literatura se establece

$$T - score = \frac{DMO \text{ del grupo de estudio} - DMO \text{ promedio del grupo de referencia joven}}{Desviacion \text{ estandar del grupo de referencia joven}} [47, 64].$$

Lo cual nos indicara si se tiene un aumento en el riesgo de fractura.

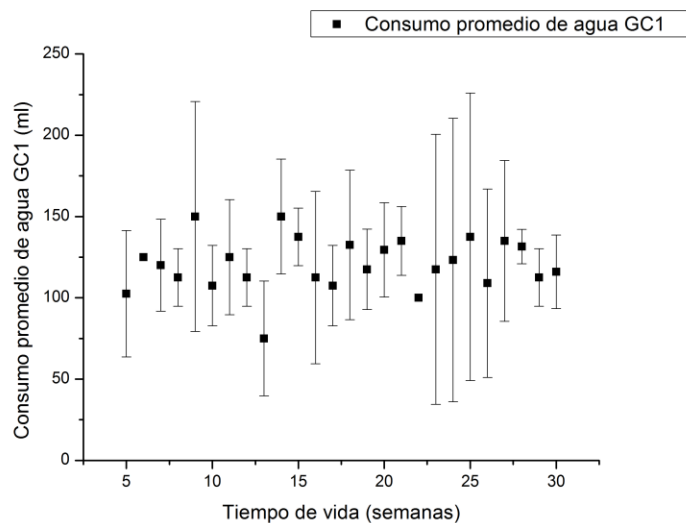
RESULTADOS

Modelo animal

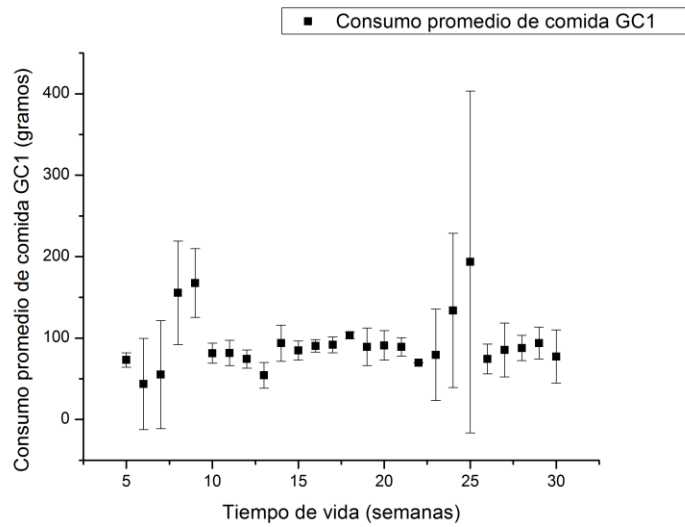
Se separaron a los grupos de estudio en dos cajas, las que consumían bebidas carbonatadas sabor cola (GOVX-C, GDMT2-C y GOVX-DMT2-C) y el grupo control GC1. Para el grupo control joven GC2, se aparearon nuevamente a las ratonas, las crías se separaron 5 hembras a las 4 semanas de vida, las cuales se les estuvo monitoreando hasta que cumplieron las 10 semanas de vida.

Reproducción y crianza

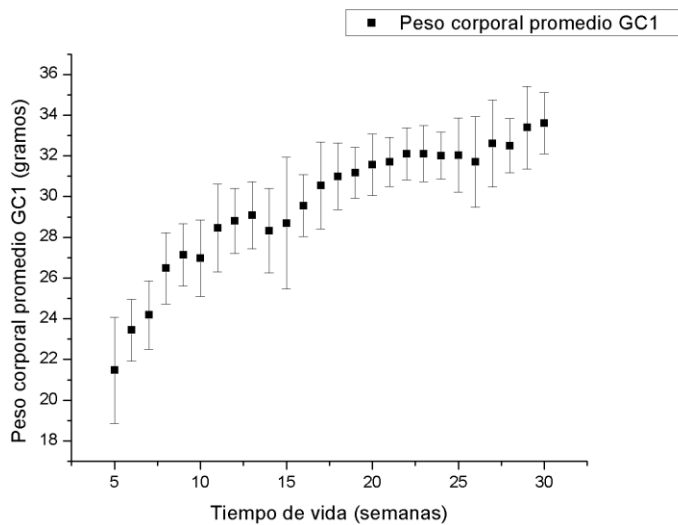
Se monitoreo semanalmente el suministro de alimento y bebida esto para poder llevar un promedio del peso de cada grupo al igual de la cantidad de alimento y agua que consume tanto el grupo control como el grupo de estudio. Al grupo control GC1 inicialmente se le suministró 100 g de alimento (Gráfica 2) y 200 ml de agua (Gráfica 1). El peso corporal del grupo control al inicio fue de 16.136 g (Gráfica 3). El promedio a las 30 semanas de vida arrojó los siguientes resultados para el grupo GC1.



Gráfica 1 Consumo de agua GC1



Gráfica 2 Consumo de comida GC1

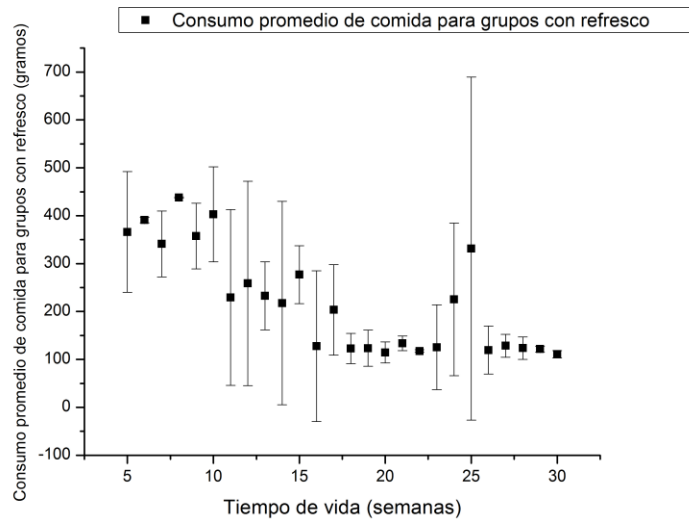


Gráfica 3 Peso corporal GC1

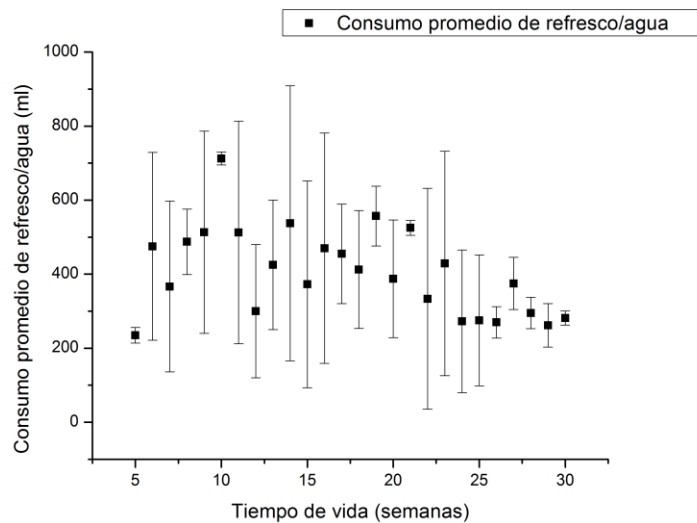
En promedio el GC1 comía 98.181 g de alimento y bebía una cantidad promedio de 123.490 ml de agua por semana. Para las 30 semanas de vida el peso corporal promedio del GC1 fue de 33.599 g.

Para los grupos GOVX-C, GDMT2-C y GOVX-DMT2-C se les suministró 521.12 g de alimento (Gráfica 4) y en dos bebederos se mezcló 200 ml de agua y 200 ml de Coca-Cola, con un total de 400 ml de bebida (Gráfica 5). El promedio del peso

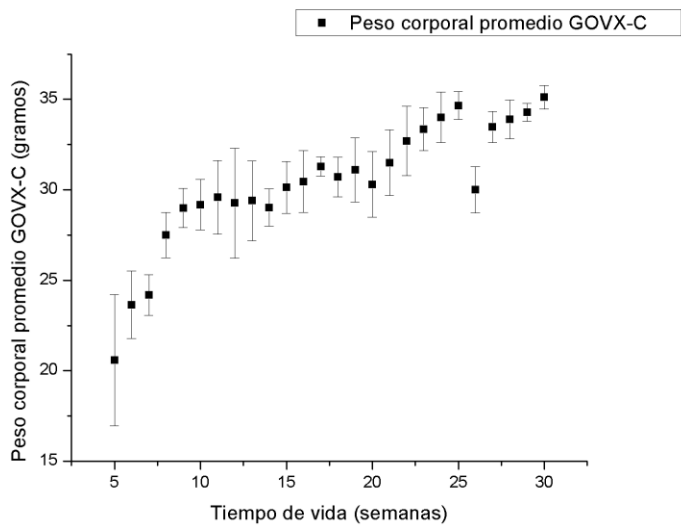
corporal inicial para dichos grupos fue de GOVX-C 15.3075 gr (Gráfica 6), para GDMT2-C de 14.6837 g y para el grupo GOVX-DMT2-C 14.6837 g. Para las 30 semanas de vida el monitoreo del consumo de comida, bebida carbonatada sabor cola y el peso corporal fue los siguientes.



Gráfica 4 Consumo de comida GOVX-C, GDMT2-C y GOVX-DMT2-C



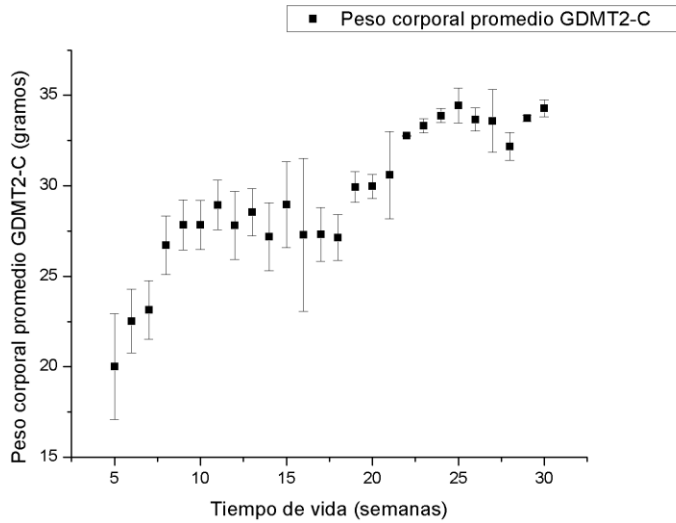
Gráfica 5 Consumo de refresco/agua



Gráfica 6 Peso corporal GOVX-C

El consumo de comida de los grupos GOVX-C, GDMT2-C y GOVX-DMT2-C fue un promedio de 212.656 g a la semana, además la ingesta promedio semanal de la mezcla de bebida carbonatada sabor cola y agua es de 390.271 ml. El peso corporal promedio a las 30 semanas de edad que obtuvo el grupo GOVX-C fue de 35.114 g, la ratona sobreviviente del grupo GDMT2-C su peso promedio fue de 34.280 g, de igual manera la única ratona sobreviviente del grupo GOVX-DMT2-C su peso promedio corporal final fue de 35.650 g.

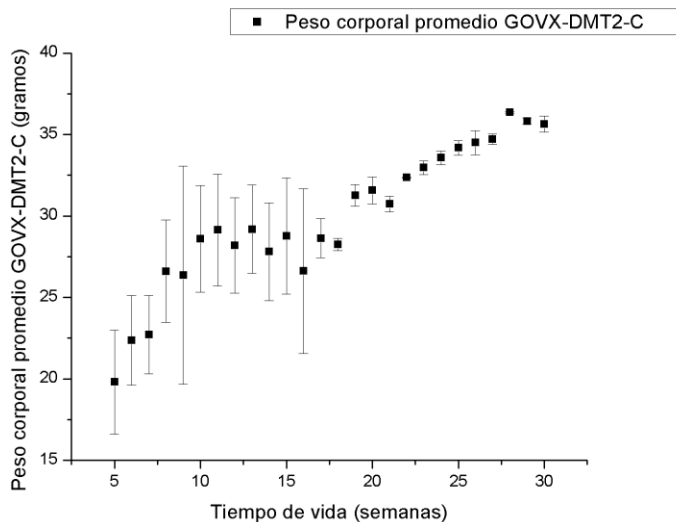
El peso corporal promedio para el grupo GDMT2-C al inicio fue de 14.683 g (Gráfica 7) y podemos observar su progreso en la siguiente gráfica.



Gráfica 7 Peso corporal promedio del GDMT2-C

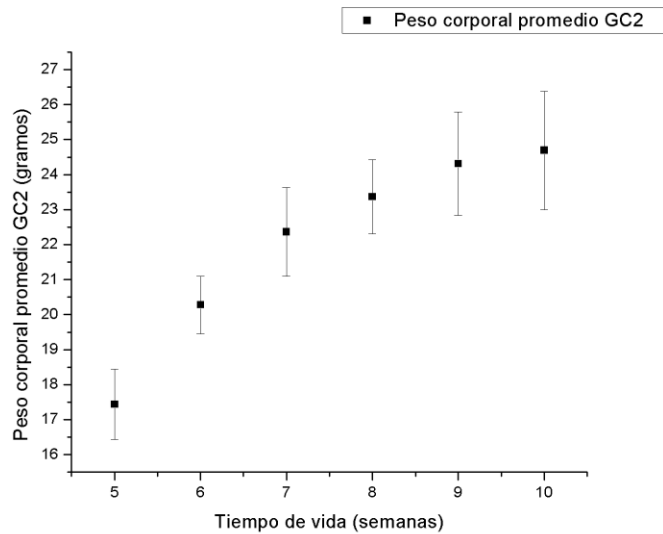
Podemos observar que después de la semana 12 de vida las ratonas empezaron a tener una baja de peso, pero se fueron recuperando pasando de la semana 15, llegando a un peso final de 34.28 g.

En el caso del grupo GOVX-DMT2-C el peso inicial fue de 14.683 g (Gráfica 8). Después de las 30 semanas de vida su peso promedio corporal fue de 35.65 g

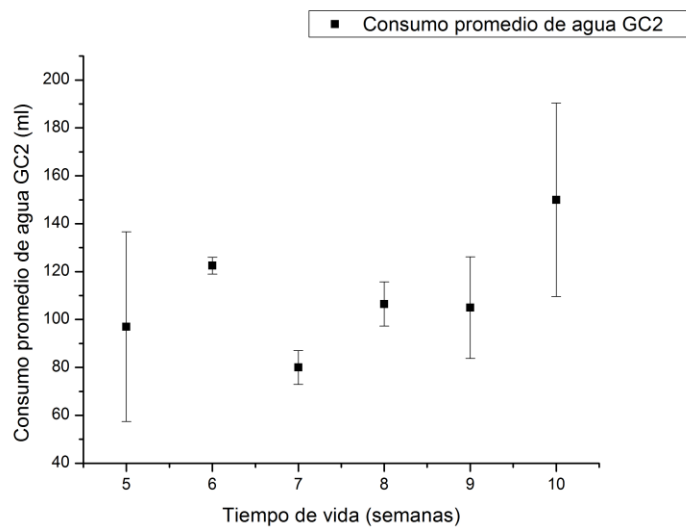


Gráfica 8 Peso corporal GOVX-DMT2-C

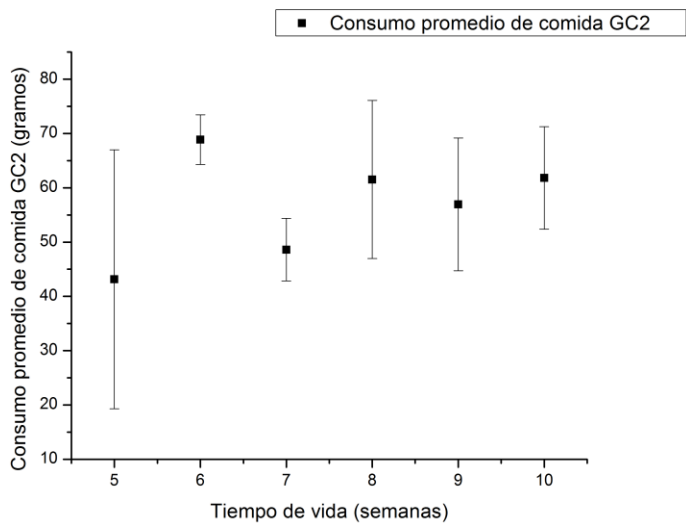
Para el grupo control joven GC2 se estuvo monitoreando su crecimiento, alimentación e ingesta de agua por 10 semanas. El peso promedio corporal para el grupo GC2 fue de 21.444 g (Gráfica 9), el consumo promedio de agua fue de 123 ml por semana (Gráfica 10) y el consumo de comida fue de 77.316 g por semana (Gráfica 11).



Gráfica 9 Peso corporal grupo GC2



Gráfica 10 Consumo de agua del grupo GC2

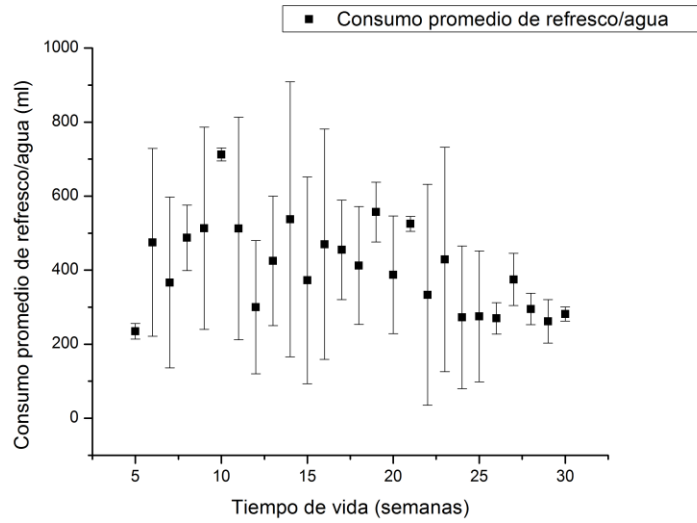


Gráfica 11 Consumo de comida del grupo GC2

Ingesta de bebidas carbonatadas sabor cola

La ingesta de Coca-Cola para los grupos de ratonas empezó a partir del destete, el cual fue a las 4 semanas de nacidos (30 días).

La primera cantidad de bebida que se les suministró fue de 200 ml de agua + 200 ml de Coca-Cola lo cual fue un total de 400 ml. Cada semana de vida se estuvo monitoreando el promedio de la cantidad de mezcla de agua con Coca-Cola que consumían (Gráfica 12).



Gráfica 12 Consumo promedio de refresco/agua

Cabe resaltar los inconvenientes que se tuvo con este procedimiento. Los componentes nutrimentales de la Coca-Cola producen corrosión en los bebederos, los cuales se tenían que estar cambiando constantemente, ya que estos empezaban a gotear. Además, se tenían que lavar constantemente porque debido a la alta concentración de glucosa los balines del bebedero se quedaban pegados.

Ovariectomía

La ovariectomía se realizó a los grupos correspondientes (GOVX-C y GOVX-DMT2-C), a los cuales se les dejó con un ayuno correspondiente de 12 horas. Después se



Ilustración 2 Toma de glucosa

les realizó la toma de glucosa los cuales arrojaron para GOVX-C un promedio de 92.5 mg/dl y para GOVX-DMT2-C un promedio de 87.5 mg/dl (Ilustración 2).

Para la anestesia de las ratonas se utilizó pentobarbital sódico, de acuerdo a la literatura la proporción que se debe de utilizar para dicho procedimiento es de 1:4; en este caso se utilizó 500 µl de pentobarbital diluido en 2,000 µl de solución inyectable, que es equivalente a 50mg/kg [64]. Se estableció que para cada ratona cuyo peso se encuentra superior a los 30gr se debe suministrar 170 µl del preparado si la ratona cuenta con un peso inferior a los 30 gr se estará aplicando 150 µl.

Para esto se estuvo pesando previamente a las ratonas, se obtuvieron los siguientes resultados, para GOVX-C su peso promedio es de 30.64gr y para GOVX-DMT2-C su promedio es de 29.04gr.

Después de pesarlas a cada una, se empezó por a operar el grupo GOVX-C, al cual se le suministro la mezcla de pentobarbital con solución inyectable y se esperó aproximadamente de 5 a 8 min para que la anestesia hiciera efecto, una vez que la ratona se duerme esta es colocada en forma decúbito dorsal y cada pata es atada



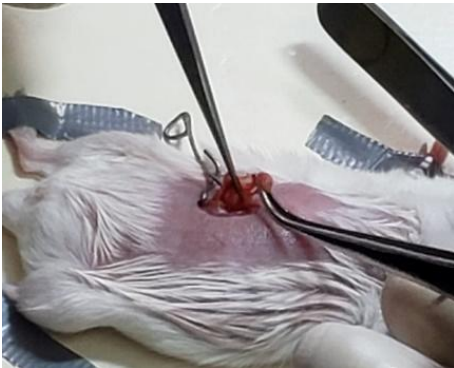
Ilustración 3 Incisión zona abdominal

con cinta adhesiva a una tabla de color blanco sobre la que se coloca al animal [54].

Una vez atada la ratona se procede a desinfectar la zona abdominal con antibenzil y una gasa. Posteriormente se rasuro con una navaja para afeitar la zona desinfectada, la cual abarca tres

milímetros debajo del esternón hasta 2 mm sobre su orificio urogenital. Una vez afeitada la zona se puede observar una línea alba en la cual se realizó una incisión con las tijeras quirúrgicas de aproximadamente 2 cm, primero cortando la piel y posteriormente el tejido muscular como observamos en la Ilustración 3.

Con ayuda de unas pinzas y un gancho pequeño se hace el tejido muscular a un



lado para poder buscar los ovarios de la ratona, los ovarios están ubicados debajo de los riñones (Ilustración 4). Los ovarios se encuentran rodeados por tejido adiposo, las cuales se deben de sostener con la pinza de disección simple, con otra pinza se jala el ovario y con una aguja caliente se procedió a cauterizar la vena ovárica y el cuerno uterino [55].

Ilustración 4 Extirpación de los ovarios

Una vez que se extirparon los ovarios, se procede a acomodar los órganos, se suturó a la ratona, utilizando una aguja para suturar, hilo y porta agujas. Se realizó sutura simple, primero se suturó el tejido muscular y posteriormente la piel. Se retiró a la ratona de la tabla blanca y se colocó en una caja con aserrín limpio y sanitas para que absorba la sangre que pudieran desprender.

Fueron colocadas en la caja en forma decúbito ventral, de igual manera se les colocó un calentador frente a la caja para que las ratonas no entren en estado de hipotermia y despierten más rápido de la anestesia [65]. Se espera alrededor de 20 min para que despierten completamente y así poder suministrarles alimento y bebida.

En este caso para la pronta recuperación de las ratonas, en la bebida se les colocó 7.5mg de ketorolaco sublingual diluido en 25 mL de suero electrolítico, 125 mL de agua y 100 mL de Coca-Cola. El alimento que se está utilizando es el Rodent Diet 5001 de la marca LabDiet y se les proporcionó 490g.

Después de los 3 días se les retiró el restante de la mezcla de ketorolaco, suero, agua y Coca-Cola, se les volvió a suministrar Coca-Cola con agua en proporción 1:1 y se estuvo monitoreando la cicatrización de la operación.

Inducción de diabetes

Para la inducción de diabetes a las 14 semanas de edad se utilizó monohidrato de alloxan se dejó previamente a las ratonas en ayuno de 24 horas. Antes de la inducción de diabetes es necesario tomarles la glucosa a los grupos correspondientes, el grupo GDMT2-C tuvo un promedio de 51.5 mg/dl y el promedio para el grupo GOVX-DMT2-C fue de 56.6 mg/dl. De igual manera se pesó a cada una de las ratonas, de las cuales se obtuvo un peso promedio por grupo, para GDMT2-C fue de 25.87 gr y para el grupo GOVX-DMT2-C de 26.26 gr.

De acuerdo a la literatura los rangos de suministro de alloxan vía intraperitoneal para ratones está entre los rangos de 150 mg/kg a 200mg/kg. Por lo tanto, como no se encontró en la literatura información sobre experimentos en los cuales a ratones que estén consumiendo bebidas carbonatadas sabor cola se les induzca la diabetes, se optó por suministrarles la cantidad más pequeña recomendada en la literatura, que fue de 150 mg/kg de alloxan diluido en solución inyectable, fue administrado vía intraperitoneal [56].

Las ratonas deben estar en supervisión, 2 horas después de la inyección se les suministró alimento y de bebida se les proporcionó la cantidad de 200 ml de Coca-Cola y 200 ml de suero diluidos en el mismo bebedero. Después de 48 horas se les retiró el alimento y se les dejó en ayuno por 16 horas para una segunda toma de glucosa.

Los resultados para el grupo DMT2-C únicamente dos ratonas obtuvieron valores arriba de los 200 mg/dl, del grupo GOVX-DMT2-C únicamente una de las ratonas obtuvo dicho valor [66]. Lo cual nos indica que las demás ratonas no obtuvieron

diabetes con dicha dosis. Se esperó dos semanas para ver si la ingesta de Coca-Cola elevaba los niveles de glucosa y realizarles nuevamente la prueba. Después de este tiempo se les volvió a tomar la glucosa y los resultados para el grupo GDMT2-C fue de 227 mg/dl para únicamente una ratona y en GOVX-DMT2-C igualmente solo una ratona tenía niveles altos de glucosa (205 mg/dl). Las cuales se separaron del resto del grupo y se decidió suministrarles una segunda dosis, ahora usando 200 mg/kg de alloxan.

Para la segunda dosis se pesó a las ratonas y se notó un aumento de peso, para el grupo GDMT2-C fue un promedio de 27.02 gr y para GOVX.DMT2-C un promedio de 28.24 gr. Se preparó la segunda dosis de 200 mg/kg de monohidrato de alloxan diluido en solución inyectable, se les inyectó vía intraperitoneal. Después de dos horas se les suministró alimento con bebida carbonatada sabor cola y suero, 200 ml de cada uno. A las 48 horas se les retiró la comida y bebida para dejarlos en ayuno y realizarles las nuevas tomas de glucosa.

Los resultados de la toma de glucosa fueron muy elevados en ambos grupos, en el glucómetro aparecía la leyenda HI (high) lo que indica valores glucémicos arriba de 500 mg/dl. Las ratonas presentaban un grado muy alto de deshidratación por lo cual se les suministró en el hocico suero sin endulzante con una pipeta, además se les inyectó suero vía intraperitoneal al igual que insulina para contrarrestar los niveles altos de glucosa. Después de esto se estuvo monitoreando el avance de las ratonas, pero a pesar de los cuidados ninguna de ellas pudo salvarse.

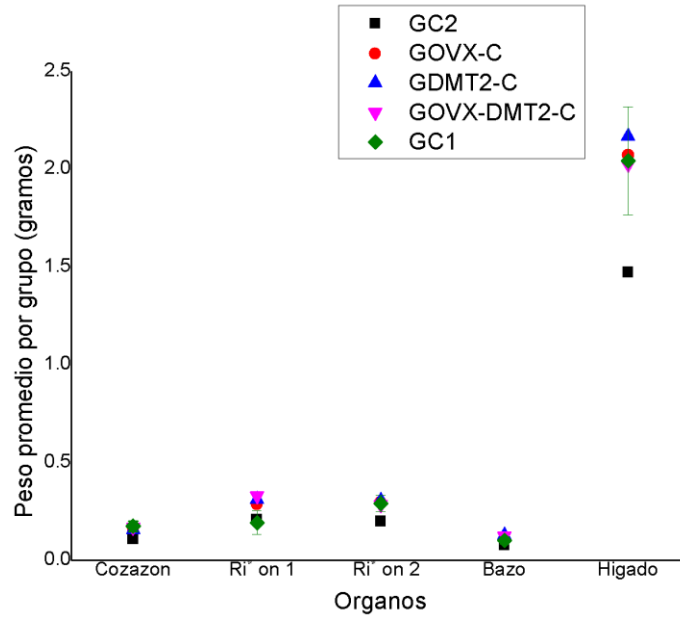
Únicamente sobrevivieron las ratonas que fueron separadas con anterioridad, al cumplir las 30 semanas los valores de glucosa que tuvieron fueron para la ratona de GDMT2-C 112 mg/dl y para el grupo GOVX-DMT2-C de 107 mg/dl.

Después de la baja de ratonas inmediatamente se pusieron a aparear nuevamente ratones de la cepa CD1. Las crías hembras que nacieron fueron los grupos nuevos de GDMT2-C y GOVX-DMT2-C y se separaron para el grupo GC2.

A los nuevos grupos se siguieron las mismas indicaciones, el destete fue a las 4 semanas, el suministro de bebida carbonatada sabor cola, la realización de la ovariectomía y todos los cuidados previos a la inducción de diabetes. Para estos nuevos grupos de ratonas se decidió utilizar la cantidad más alta de monohidrato de alloxan (200 mg/kg) para no tener que suministrar una segunda dosis. Se esperó dos horas para poder suministrarles alimento y bebida, en este caso se usó suero sin azúcar para que no presentaran deshidratación, después de 48 horas empezaron las bajas de ratonas, empezaron a presentar baja de peso por lo cual se optó por suministrarles suero vía intraperitoneal e insulina. A las 72 horas después de la inducción de diabetes se les tomó la glucosa a las ratonas las cuales arrojaban valores de HI en el glucómetro, por lo cual presentaban un grado de hiperglucemia lo que provocó una baja de peso en ellas. Después de 5 días de monitoreo fallecieron ambos grupos, debido a la hiperglucemia.

Obtención de fémures

Una vez realizado el sacrificio de las ratonas se procedió a retirar los órganos más importantes que son el corazón, hígado, riñones y bazo, para posteriormente pesarlos y obtener sus promedios por grupos (Gráfica 13).



Gráfica 13 Peso promedio de los órganos por grupo

De acuerdo a los valores presentados podemos observar el incremento en el peso del riñón en los grupos GOVX-C, GDMT2-C y GOVX-DMT2-C que fueron los que ingirieron bebidas carbonatadas sabor cola durante 28 semanas a comparación del grupo control GC1 que se mantuvo con una dieta adecuada.

Densidad volumétrica

Con la extracción del fémur se obtuvieron varios datos de él, como lo son su peso (Gráfica 14), volumen desplazado y su densidad (Gráfica 15), para lo cual se obtuvo un promedio por grupo (Tabla 1- 5).

GC1	
Peso del fémur (g)	0.072
Volumen desplazado (μl)	47.5
Densidad (g/cm^3)	1.540

Tabla 2 Densidad de GC1

GOVX-C	
Peso del fémur (g)	0.077
Volumen desplazado (μl)	50
Densidad (g/cm^3)	1.576

Tabla 1 Densidad GOVX-C

GDMT2-C	
Peso del fémur (g)	0.070
Volumen desplazado (μl)	50
Densidad (g/cm^3)	1.414

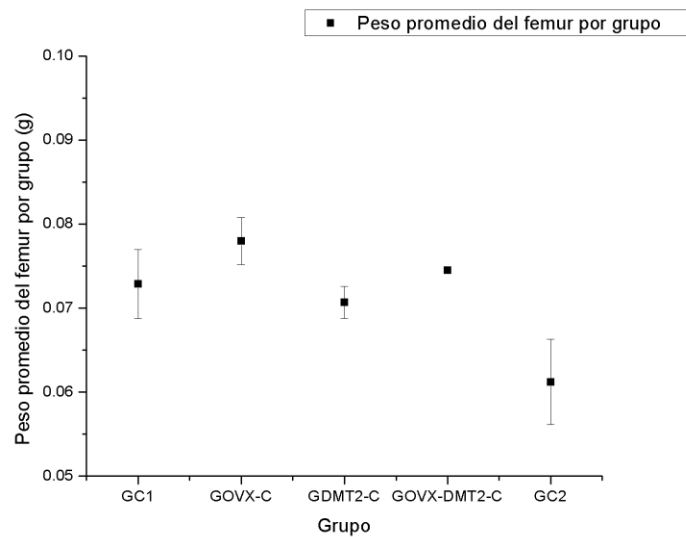
Tabla 4 Densidad de GDMT2-C

GOVX-DMT2-C	
Peso del fémur (g)	0.074
Volumen desplazado (μl)	47.5
Densidad (g/cm^3)	1.573

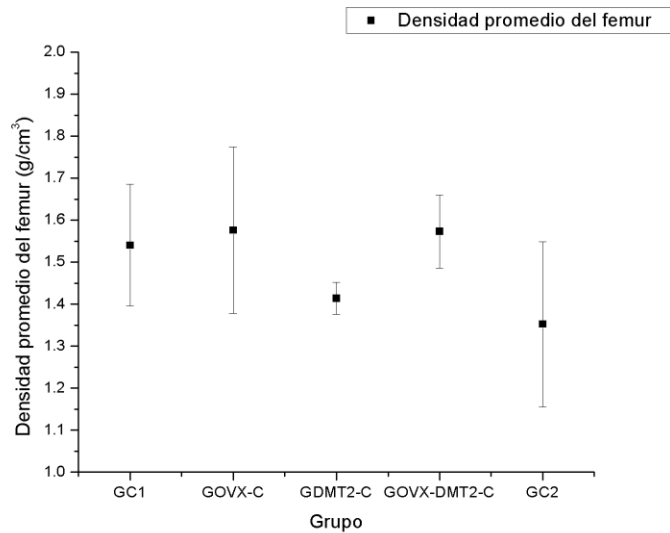
Tabla 3 Densidad de GOVX-DMT2-C

GC2	
Peso del fémur (g)	0.061
Volumen desplazado (μl)	46
Densidad (g/cm ³)	1.352

Tabla 5 Densidad de GC2



Gráfica 14 Peso promedio del fémur por grupo



Gráfica 15 Densidad promedio del fémur por grupo

La densidad volumétrica de los grupos GOVX-C y GOVX-DMT2-C tuvieron una variación no significativa a comparación del GDMT2-C, en el cual se demostró que su densidad volumétrica fue menor a la del grupo GC1.

Adquisición de imágenes

De las tres tomas diferentes de imágenes se trabajó con la radiografía digital adquirida por el aparato de rayos x marca EUREKA con un tamaño de campo de 14x17.



Ilustración 5 Aparato de rayos X

Se obtuvieron dos imágenes radiográficas digitales, de las cuales se estuvo trabajando con la de mejor calidad, la cual se muestra a continuación.



Ilustración 6 Imagen radiográfica digital de los fémures

En la imagen podemos observar que se encuentra la parte distal hacia arriba, además los huesos están ordenados por grupos de izquierda a derecha comenzamos con el grupo GC1 empezando por la ratona #1 colocando primero el fémur izquierdo y posteriormente el derecho. Se continuo con este mismo proceso el GOVX-C, GDMT2-C, GOVX-DMT2-C, GC2 y un grupo que solo consumieron bebida carbonatada sabor cola, los cuales no se tomaron en cuenta ya que no cumplen con los estándares de tiempo establecidos en el trabajo.

Segmentación y Absorciometría

La segmentación se realizó en MatLab, en el cual se desarrolló un código para dicho proceso, el cual consiste en transformar la imagen original (Ilustración 7) y convertirla en RGB (Ilustración 8) para posteriormente cambiarla a escala de grises (Ilustración 9) y proceder con la segmentación.



Ilustración 7 Imagen radiográfica digital original



Ilustración 8 Imagen RGB

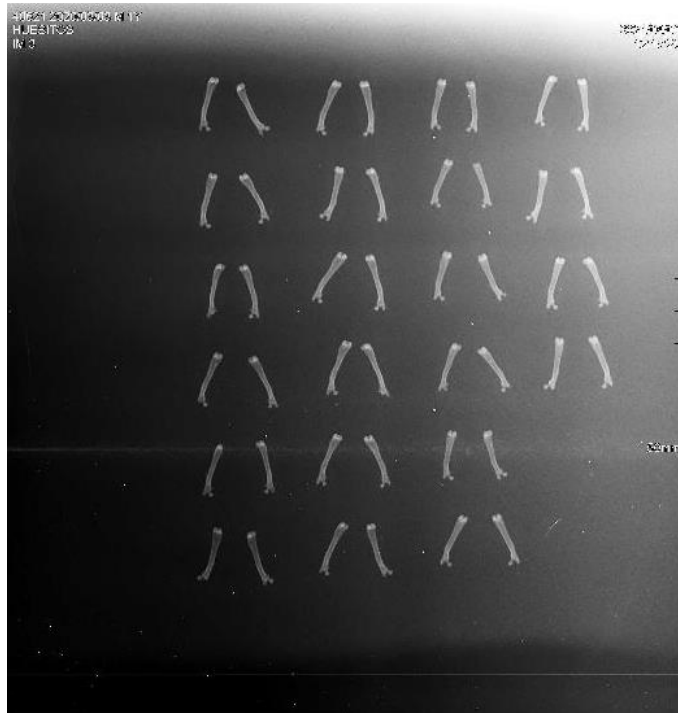


Ilustración 9 Imagen radiográfica en escala de grises

La imagen se segmentó en tres partes: epífisis distal (A) (Ilustración 10), cuerpo del fémur (B) (Ilustración 11) y epífisis proximal (C) (Ilustración 12), este proceso se realizó con la aplicación “image segmenter” que forma parte del MatLab 2017B. En este paso se utilizó la imagen ya convertida en escala de grises, la cual se aumentó de tamaño y se seleccionó con la opción “draw freehand” cada parte del hueso, la cual se torna de un color amarillo para seleccionar la parte segmentada como se muestra a continuación.

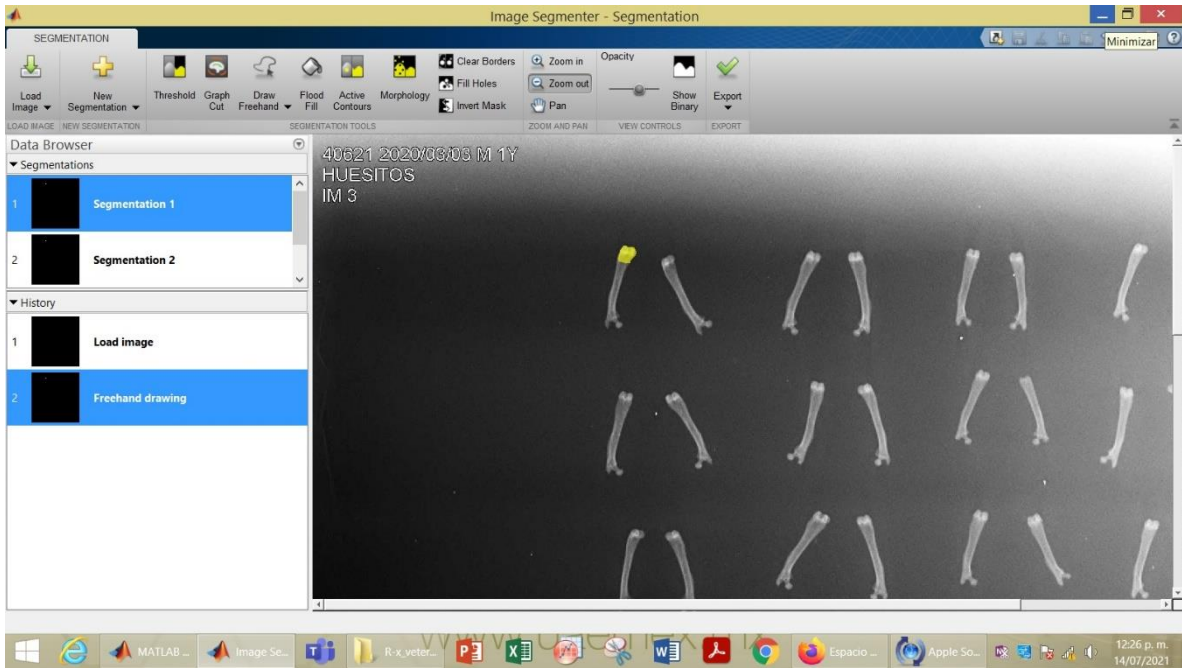


Ilustración 10 Segmentación parte distal

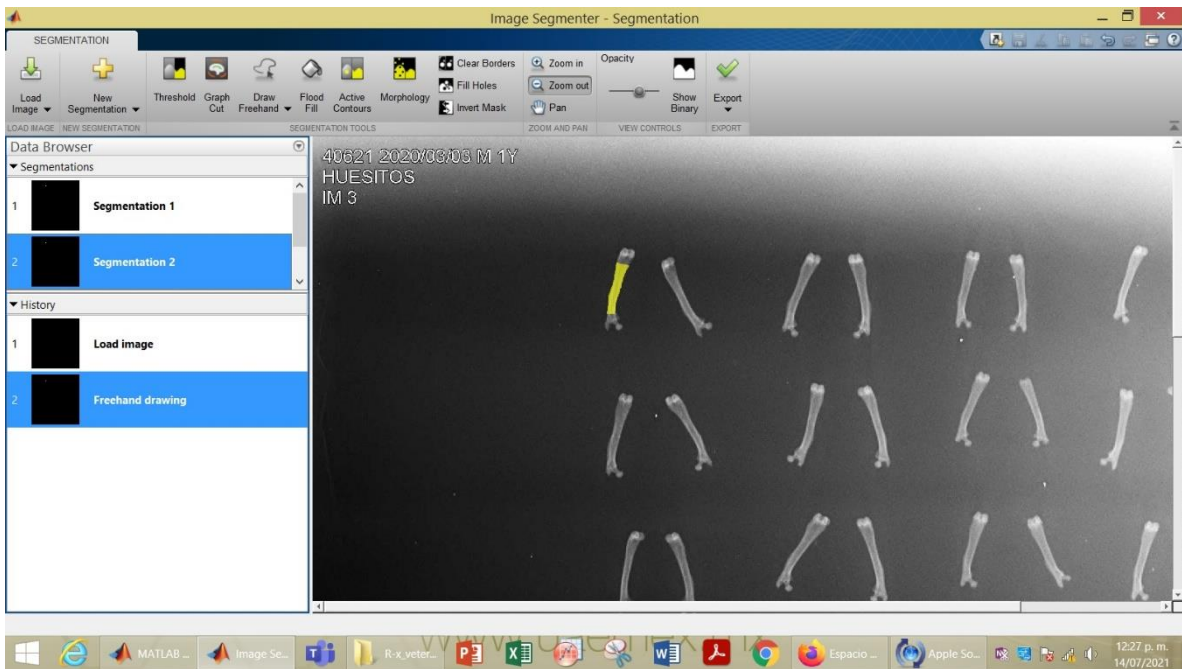


Ilustración 11 Segmentación parte cuerpo

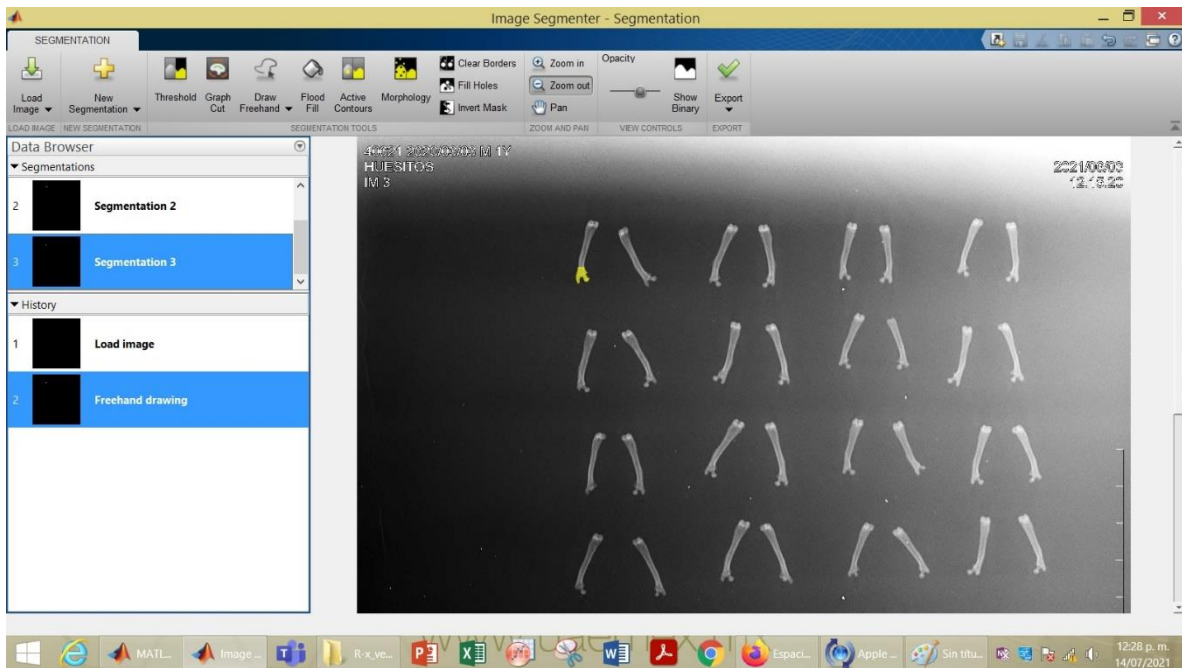


Ilustración 12 Segmentación parte proximal

Una vez seleccionado el hueso se exporta los datos de segmentación de la imagen por cada una de las secciones, los cuales se muestran de forma matricial de dos maneras, una que contiene 1 y 0 (BW) que observamos en la Ilustración 13 y otra que contiene los valores en escala de grises del 0 al 255 (masked image) que corresponde a la Ilustración 14.

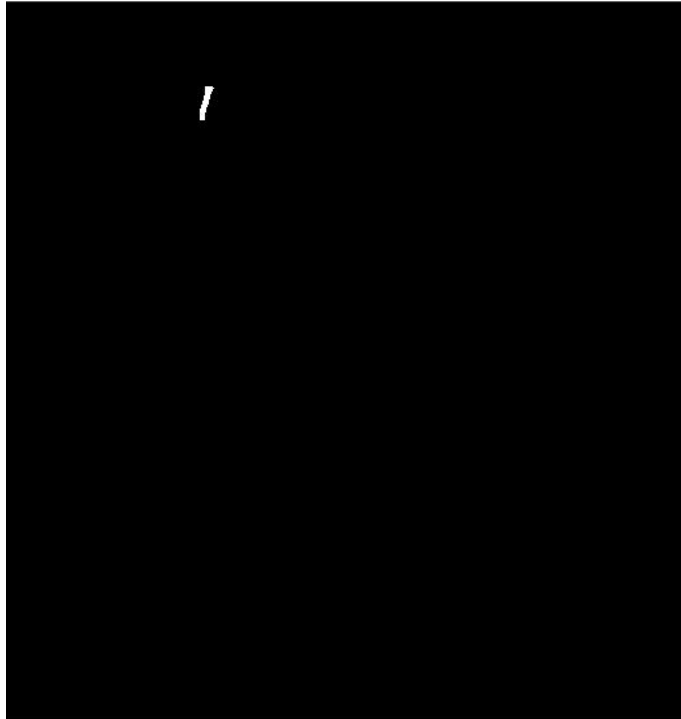


Ilustración 13 Segmentación con contraste BW de la parte del cuerpo del fémur

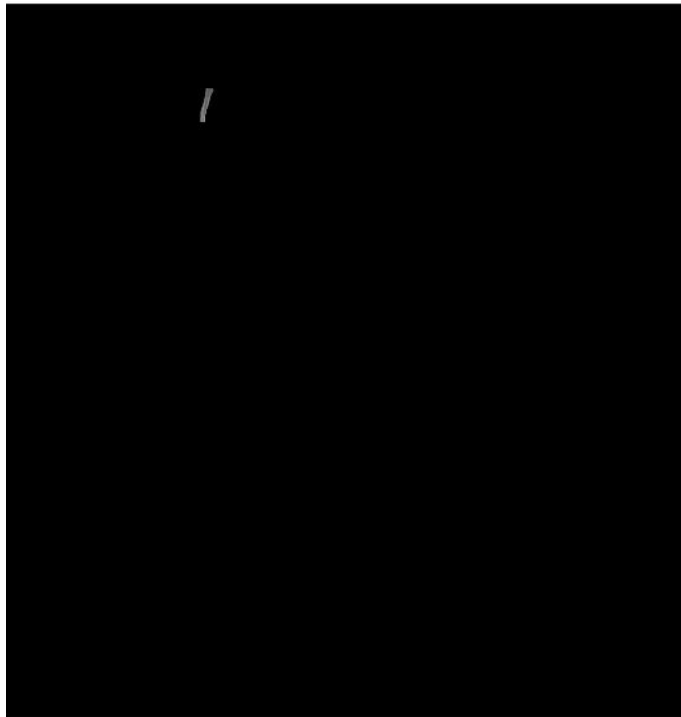
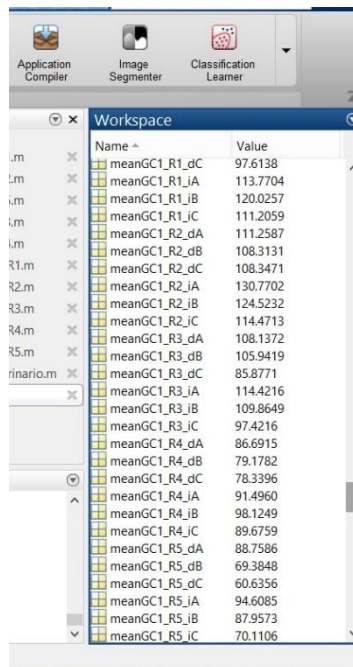


Ilustración 14 Segmentación en escala de grises masked image de la parte del cuerpo del fémur

Después de tener estos dos valores se vuelve a correr el programa para que este nos dé el valor promedio de la absorción de fotones en la parte seleccionada (Ilustración 15).



Name	Value
meanGC1_R1_dC	97.6138
meanGC1_R1_JA	113.7704
meanGC1_R1_JB	120.0257
meanGC1_R1_JC	111.2059
meanGC1_R2_dA	111.2587
meanGC1_R2_dB	108.3131
meanGC1_R2_dC	108.3471
meanGC1_R2_JA	130.7702
meanGC1_R2_JB	124.5232
meanGC1_R2_JC	114.4713
meanGC1_R3_dA	108.1372
meanGC1_R3_dB	105.9419
meanGC1_R3_dC	85.8771
meanGC1_R3_JA	114.4216
meanGC1_R3_JB	109.8649
meanGC1_R3_JC	97.4216
meanGC1_R4_dA	86.6915
meanGC1_R4_dB	79.1782
meanGC1_R4_dC	78.3396
meanGC1_R4_JA	91.4960
meanGC1_R4_JB	98.1249
meanGC1_R4_JC	89.6759
meanGC1_R5_dA	88.7586
meanGC1_R5_dB	69.3848
meanGC1_R5_dC	60.6356
meanGC1_R5_JA	94.6085
meanGC1_R5_JB	87.9573
meanGC1_R5_JC	70.1106

Ilustración 15 Valores promedio de la segmentación

Una vez obtenidos los valores de cada grupo se obtuvo su promedio por ambos fémures para todos los grupos y además se obtuvo la primera, segunda y 2.5 desviación estándar del GC2, para así compararlo con los grupos de estudio y obtener su absorciometría.

Los valores promedio de la absorción total de ambos fémures por grupo lo podemos encontrar representado en la ilustración 16. De acuerdo con los protocolos de SXA y DXA, estos valores son los que se ocupan para determinar la densitometría, como se explica en los siguientes párrafos y figuras.

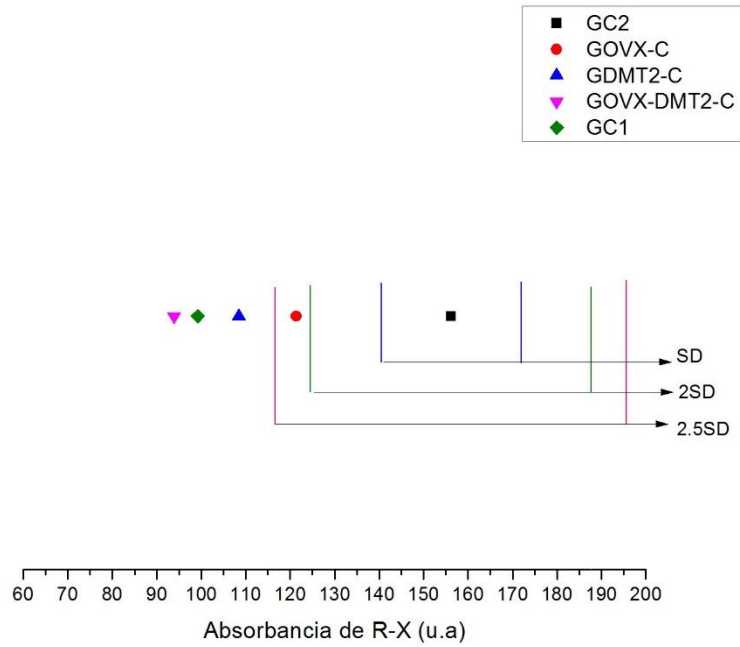


Ilustración 16 Absorciometría de ambos fémures

De igual manera se obtuvieron los valores de absorciometría de fotones para la parte proximal de cada grupo como observamos en la ilustración 17, esto debido a la cercanía que se tiene con la cadera, la cual es un factor a considerar para las lesiones del sistema musculo-esquelético.

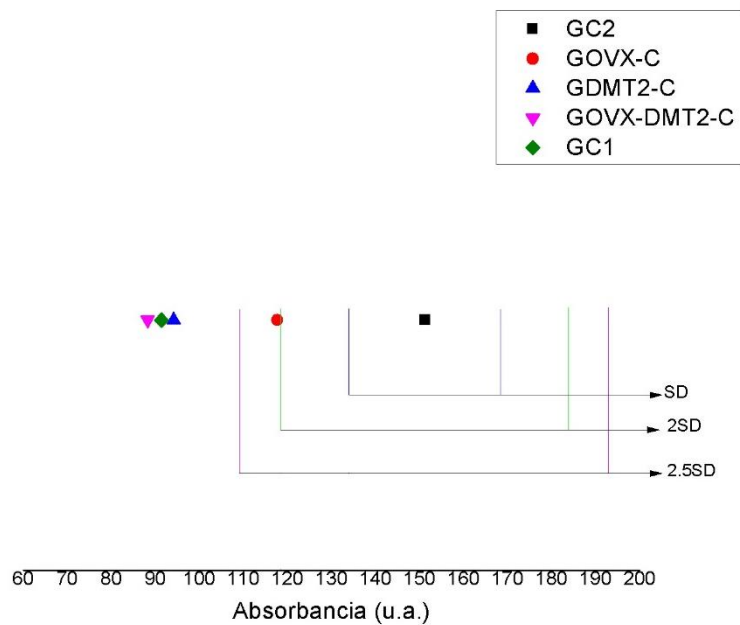


Ilustración 17 Absorciometría de la parte proximal del fémur

Con base a los parámetros establecidos por el estudio SXA para humanos, el cual nos indica de acuerdo a la desviación estándar si se encuentra dentro de los parámetros normales, osteopenia, osteoporosis u osteoporosis severa. En la gráfica de la absorciometría de ambos fémures (Ilustración 16) podemos observar que el GOVX-C se encuentra entre la 2SD y 2.5SD lo cual nos indica que está en un grado de osteoporosis. De acuerdo a los valores de T-score obtenidos para cada grupo, los cuales tienen los siguientes valores: GC1: -3.6054; GOVX-C: -2.2024; GDMT2-C: -3.0186; GOVX-DMT2-C: -3.9400, los grupos GDMT2-C, GOVX-DMT2-C y GC1 se encuentran en un grado de osteoporosis severa considerando que ninguna de las ratonas sufrió alguna fractura.

En el caso de la absorciometría para la parte proximal del fémur (ilustración 17) encontramos nuevamente que el grupo GOVX-C se encuentra en el límite de la osteopenia aun que se puede considerar como osteoporosis. Los grupos GDMT2-C, GOVX-DMT2-C y GC1 se encuentran en una zona donde se considera osteoporosis severa.

Se estima que el resultado de que los grupos GDMT2-C y GOVX-DMT2-C padezcan osteoporosis severa es debido a los altos niveles de insulina en la sangre provocados por la diabetes mellitus tipo 2 combinado con el exceso de azúcares, cafeína y el ácido fosfórico que contiene la bebida carbonatada sabor cola. Otro de los aspectos a considerar es la edad que tienen estos grupos, todos los grupos a excepción del GC2 tenían 30 semanas de edad lo cual significa que están en etapa adulta.

DISCUSIÓN

En este estudio se observó un aumento de masa corporal en los ratones de la cepa CD1 que consumieron bebidas carbonatadas sabor cola en comparación con el grupo control. En la literatura podemos observar que dicho comportamiento se ha estudiado con otras cepas de ratones, las cuales tienen un aumento de masa

corporal, a pesar de que el tiempo de ingesta sea más corto [67]. En México, la obesidad representa uno de los síntomas del Síndrome Metabólico (SM) que afecta a la mayoría de la población, esto es causado por la mala alimentación de la población mexicana [68].

En el caso de las ratonas que consumieron bebidas carbonatadas sabor cola observamos que se tuvo un aumento en el consumo de alimento y desarrollaron una dependencia al consumo de bebidas carbonatadas sabor cola a tal grado que se les proporcionaba agua y estas ratonas se oponían a consumirla, además desarrollaron un alto grado de hiperactividad ocasionado por la cafeína y azúcares que contienen este tipo de bebidas. Los resultados anteriores aplicados o trasladados a humanos indicarían que las personas que consumen bebidas carbonatadas tienden a aumentar de peso y pueden desarrollar obesidad. En comparación con la investigación de Cony et al [69] en la cual nos muestran que los ratones de estudio no presentaron un aumento de peso al consumir bebidas carbonatadas sabor cola durante 17 semanas, en dicho estudio también se reporta que los murinos muestran una baja ingesta de alimento sólido. La diferencia de este proyecto es que a los grupos de estudio se les proporciono la mezcla de bebida carbonatada sabor cola y agua durante 26 semanas y en el de Cony y colaboradores solo fueron 17 semanas. En lo que ambos estudios concuerdan es que el consumo de bebidas carbonatadas sabor cola no presenta un aumento en los niveles de glucosa se podría plantear que dicho estudio comienza a partir del día 21 de vida de las ratonas, pero podemos observar que a pesar del suministro de Coca-Cola a temprana edad las ratonas no presentan ningún tipo de hipoglucemia o hiperglucemia, siempre y cuando no padezcan de otra patología.

El peso promedio que se obtuvo de los fémures de ratonas presenta un aumento en los grupos que consumieron bebidas carbonatadas sabor cola en comparación al grupo control GC1. Estudios representan una correlación entre la DMO y el peso del fémur [70, 71]. Uno de los problemas que se encontró es que los artículos científicos no reportan el peso de los fémures de ratonas con OVX, además se

encontró que la ovariectomía se les realiza a las ratonas cuando ya están en una etapa adulta, además las semanas de vida que se utilizan son periodos cortos entre 28 días y como máximo 16 semanas de vida [10, 31]. En este trabajo se encontraron diferencias entre los pesos de los fémures, para el grupo GOVX-C se mostró un incremento del 6.94%, de igual manera el GOVX-DMT2-C incremento un 2.77% su peso y para el grupo GDMT2-C mostro una disminución del 2.77% todos fueron comparados con respecto al GC1.

En el caso de la inducción de diabetes utilizando monohidrato de alloxan se utilizaron los valores estándar que se deben inyectar a ratonas que no consumen bebidas carbonatas sabor cola, tanto el valor máximo como el mínimo. Una vez inyectado el monohidrato de alloxan las ratonas presentaban una baja de peso corporal después de 48 horas, la cual de acuerdo a la literatura es normal cuando se induce diabetes por medio de fármacos, también se ha reportado que pueden tener afectaciones en la vista y deshidratación [72]. Se estimó que la ingesta de dichas bebidas no causaría ningún problema para el suministro de dicho fármaco, pero observamos que para este grupo de estudio el índice de mortalidad fue mucho mayor en comparación con los estándares de la literatura los cuales dicen que una dosis única de 200 mg/kg de monohidrato de alloxan suministrada vía intraperitoneal tiene un 10% de mortalidad [73].

Las únicas ratonas sobrevivientes de la inducción de diabetes presentaron un cambio en los niveles de glucosa, los valores que se tomaron a los primeros días de la inducción no fueron los mismos cuando se les sacrifico. De acuerdo a su composición química el monohidrato de alloxan tiene una vida media corta, por lo que se cree que al llegar a las células beta ya no es un fármaco que pueda producir diabetes, a comparación del estreptozotocina el cual tiene un mayor tiempo de vida dentro del torrente sanguíneo [74, 75]. Para los grupos de ratonas que consumen bebidas carbonatadas sabor cola aún no se tienen registros en la literatura sobre las cantidades de monohidrato de alloxan que se debe de inyectar, por lo tanto, esperamos que esta investigación sirva como base para trabajos futuros, ya que

explícitamente encontramos que la Coca-Cola afecta de una manera que todavía no está explicada, pero hace a los sujetos más sensibles al alloxan, tanto que incrementa el índice de mortalidad hasta un 80%.

Anteriormente se ha estudiado el consumo de las bebidas carbonatadas en ratas y sus efectos secundarios, en los cuales se ha encontrado que presentan una desmineralización en el sistema óseo, especialmente en la zona trabecular del hueso. A pesar de no saber exactamente cuáles son las causas de esta desmineralización se cree que es debido a los altos niveles de cafeína, lo cual está relacionado con una mayor pérdida de calcio por medio de la orina [5]. Además la bebida carbonatada sabor cola contiene varios tipos de ácidos, como lo son el ácido fosfórico, ácido cítrico y ácido carbónico, los cuales no son tóxicos para el consumo humano pero si puede desencadenar en severas afectaciones si se consume en grandes cantidades [76]. Es de esperar y con respaldo de nuestros resultados que las ratonas que consumieron este tipo de bebidas carbonatadas sufrieran una disminución en su sistema óseo dado que el tiempo de ingesta de dicha bebida fue durante 28 semanas y el consumo de la bebida carbonatada sabor cola fue diaria sin proporcionarles otro tipo de bebida.

De igual manera se ha reportado el efecto que tiene la diabetes mellitus tipo 2 sobre murinos a los cuales se les inyectó estreptozocina a los 3 meses de edad como método para inducción de diabetes, pasadas 8 semanas se encontró que la DMO disminuyó en la parte trabecular a comparación del grupo control [77]. De acuerdo a nuestro estudio las ratonas que tuvieron diabetes mellitus tipo 2 se encuentran dentro de los valores de osteoporosis severa. La osteoporosis severa es una afectación de la pérdida de masa ósea en grandes cantidades y un riesgo mayor de sufrir fracturas, aunque uno de los parámetros es el historial clínico de fracturas del paciente. En este caso nuestras ratonas no cuentan con ninguna fractura ósea, pero de acuerdo a los parámetros SXA siguen estando en el rango de osteoporosis severa. Aunque esta clasificación se considera un valor universal está sometida a

varias limitaciones, de acuerdo al Departamento de Salud de España [78] estas limitaciones son el color de piel de las mujeres de estudio, ya que solamente se realiza a mujeres de tez blanca, además que se encuentren en etapa postmenopausica entre otros limitantes. Estos estándares cumplen con los establecidos en el proyecto.

Por primera vez se reporta un estudio científico en el cual se combinan la diabetes mellitus tipo 2, bebidas carbonatadas sabor cola y la ovariectomía como factores que afecten la absorciometría de rayos-X, se encontraron varios estudios en los cuales mencionan únicamente la diabetes mellitus tipo 2 y la ovariectomía, compararemos con uno en especial, el cual menciona que la diabetes mellitus afecta a largo plazo los índices de deformación plástica de los huesos los cuales son causados por modificaciones en la microestructura ósea, además que la ovariectomía provoca una pérdida de hueso trabecular pero este no afecta las propiedades mecánicas del fémur, esto puede ser debido a la acumulación de materiales [79]. Teniendo en cuenta que una sobremineralización del hueso también produce un aumento en la fragilidad del hueso, así como las microgrietas óseas producen un mayor riesgo de fractura, esto debido a la pérdida de flexibilidad del hueso y su deformación elástica, lo cual es una afectación para este tipo de pacientes. Por lo tanto, ya se tenía conciencia de que estos dos factores afectaban la composición ósea del fémur y si a este estudio le sumamos la ingesta de bebidas carbonatadas sabor cola podemos observar que el grupo GOVX-DMT2-C es el que más se encuentra alejado del GC2, es decir, el más afectado y con mayor riesgo de fractura.

El GC1 también se encuentra fuera de la 2.5SD, se estima que estos valores sean debido a la edad de las ratonas. Aunque la OMS declara que estas desviaciones estándar se realizaron en personas que gozan de excelente salud. En el caso de los animales no se cuenta con dichos valores para determinar las afectaciones del sistema óseo, pero podemos observar que los estándares para humanos podrían ser erróneos si únicamente se toma en cuenta los valores del grupo control joven,

ya que la edad puede ser un factor que influya en el diagnóstico, probablemente se cataloguen como una enfermedad del sistema musculo esquelético, aunque su alimentación sea balanceada y se tenga una actividad física constante.

CONCLUSIONES

Las ratonas presentaron una adicción al consumo de bebidas carbonatadas sabor cola, la dependencia dicha bebida es a tal grado que estas ratonas ya no consumen agua u otro tipo de bebida.

La inducción de diabetes por medio de monohidrato de alloxan produce una mortalidad del 92.3% en ratones que consumen bebidas carbonatadas sabor cola desde la cuarta semana de vida, en esta etapa se catalogan como adultos, aunque no sean sexualmente activos.

Los sujetos de prueba que consumieron bebidas carbonatadas sabor cola durante 26 semanas no presentan variación significativa en los niveles de glucosa en la sangre en comparación del grupo control que solamente ingirió agua durante este mismo periodo.

La absorciometría de fotones muestra un grado de osteoporosis en el fémur de los grupos murinos estudiados a las 30 semanas de edad. Se observa un efecto sinérgico en la desmineralización producido por el consumo de bebida carbonatada, DM y OVX. El grupo control de 30 semanas también se encuentra dentro de los grupos con déficit de absorción de rayos-X en el fémur, por lo que la edad de las ratonas puede ser considerada como otra afectación más, la cual incrementa la desmineralización en el sistema óseo, lo que aumenta el riesgo de fractura.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ángel M, Romo M, Miguel J, et al (2003) Osteoporosis en mexicanas mayores de 40 años. Determinación por densitometría
2. Pino Montes DJ, del Pino J (2010) Epidemiología de las fracturas

osteoporóticas: las fracturas vertebrales y no vertebrales

3. Maupomé-Carvantes G, Sánchez-Reyes V, Laguna-Ortega S, et al (1995) Salud pública de México
4. Aguirre-Arenas J, Escobar-Pérez M, Chávez-Villasana A (1998) Evaluación de los patrones alimentarios y la nutrición en cuatro comunidades rurales. *Salud Publica Mex* 40:398–407. <https://doi.org/10.1590/S0036-36341998000500003>
5. Ohta M, Cheuk G, Thomas KA, et al (1999) Effects of caffeine on the bones of aged, ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab* 43:52–59. <https://doi.org/10.1159/000012767>
6. García-Contreras F, Paniagua R, Avila-Díaz M, et al (2000) Cola beverage consumption induces bone mineralization reduction in ovariectomized rats. *Arch Med Res* 31:360–365. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(00)00090-4)
7. Oei L, Zillikens MC, Dehghan A, et al (2013) High bone mineral density and fracture risk in type 2 diabetes as skeletal complications of inadequate glucose control: The Rotterdam study. *Diabetes Care* 36:1619–1628. <https://doi.org/10.2337/dc12-1188>
8. Tanaka H, Yamashita T, Yoneda M, et al (2018) Characteristics of bone strength and metabolism in type 2 diabetic model Tsumura, Suzuki, Obese Diabetes mice. *Bone Reports* 9:74–83. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.07.004>
9. Pérez M, Farmacéutica A (2010) Huesos frágiles. 16:
10. Omi N, Ezawa I (1995) The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone* 17:163–168. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(95\)00329-C](https://doi.org/10.1016/8756-3282(95)00329-C)
11. Coca-Cola | Industria Mexicana de Coca-Cola. <https://www.coca-colamexico.com.mx/marcas/coca-cola>. Accessed 24 May 2021
12. Tresguerres JAF (2005) *Fisiología humana* (3a. ed.), 3era ed. McGraw-Hill Interamericana
13. Latarjet M, Ruiz Liard A (2004) *Anatomía humana*. Edit. Médica Panamericana
14. Stengele FH (2008) *Diseno y construccion de prototipo neumatico de*

protesis de pierna humana

15. Ricardo Horcajada González D 2 ANATOMÍA MORFOLÓGICA APLICADA A LA REPRESENTACIÓN
16. Felsenberg D, Boonen S (2005) The bone quality framework: Determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clin Ther* 27:1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2004.12.020>
17. Tucker KL, Morita K, Qiao N, et al (2006) Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham osteoporosis study. *Am J Clin Nutr* 84:936–42
18. Teófilo JM, Leonel DV, Lamano T (2010) Cola beverage consumption delays alveolar bone healing: a histometric study in rats. *Braz Oral Res* 24:177–181.
<https://doi.org/10.1590/S1806-83242010000200009>
19. Kristensen M, Jensen M, Kudsk J, et al (2005) Short-term effects on bone turnover of replacing milk with cola beverages: A 10-day interventional study in young men. *Osteoporos Int* 16:1803–8. <https://doi.org/10.1007/s00198-005-1935-z>
20. Hoppe C, Kristensen M, Boiesen M, et al (2009) Short-term effects of replacing milk with cola beverages on insulin-like growth factor-I and insulinglucose metabolism: A 10d interventional study in young men. *Br J Nutr* 102:1047–51. <https://doi.org/10.1017/S0007114509338829>
21. García-Contreras F, Paniagua R, Avila-Díaz M, et al (2000) Cola beverage consumption induces bone mineralization reduction in ovariectomized rats. *Arch Med Res* 31:360–5. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(00)00090-4)
22. Fernando GR, Martha RM, Evangelina R (1999) Consumption of soft drinks with phosphoric acid as a risk factor for the development of hypocalcemia in postmenopausal women. *J Clin Epidemiol* 52:1007–1010.
[https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(99\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(99)00097-9)
23. Rosen CJ, American Society for Bone and Mineral Research. (2009) Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. American Society for Bone and Mineral Research

24. (2014) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus DEFINITION AND DESCRIPTION OF DIABETES MELLITUS. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
25. Narro J, Secretario R, Salud DE DIRECTORIO SECRETARÍA DE SALUD
26. Herrera AA, Enrique P, Soca M, et al (2012) Actualización sobre diabetes mellitus. *Correo Científico Médico de Holguín* 16:
27. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. C, Navarro Despaigne D, Santana Pérez F, et al (1990) *Revista cubana de endocrinología*. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
28. Piepkorn B, Kann P, Forst T, et al (1997) Bone mineral density and bone metabolism in diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 29:584–591. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979106>
29. Melton LJ, Leibson CL, Achenbach SJ, et al (2008) Fracture Risk in Type 2 Diabetes: Update of a Population-Based Study. *J Bone Miner Res* 23:1334–1342. <https://doi.org/10.1359/jbmr.080323>
30. Parker WH, Feskanich D, Broder MS, et al (2013) Long-Term Mortality Associated With Oophorectomy Compared With Ovarian Conservation in the Nurses' Health Study. *Obstet Gynecol* 121:709–716. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3182864350>
31. Cho JH, Cho DC, Yu SH, et al (2012) Effect of dietary calcium on spinal bone fusion in an ovariectomized rat model. *J Korean Neurosurg Soc* 52:281–287. <https://doi.org/10.3340/jkns.2012.52.4.281>
32. Martin RB, Butcher RL, Sherwood LL, et al (1987) Effects of ovariectomy in beagle dogs. *Bone* 8:23–31. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(87\)90128-1](https://doi.org/10.1016/8756-3282(87)90128-1)
33. Ahlborg HG, Johnell O, Turner CH, et al (2003) Bone Loss and Bone Size after Menopause. *N Engl J Med* 349:327–334. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022464>
34. Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, et al (1999) Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68:197–202. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(99\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(99)00032-1)

35. Adami ANDREOLLO N, Freitas dos SANTOS E, Rachel ARAÚJO M, Roberto LOPES L (2012) RAT'S AGE VERSUS HUMAN'S AGE: WHAT IS THE RELATIONSHIP? Idade do rato versus idade humana: qual é a relação?
36. Faiz M. Khan JPG (2014) The Physics of Radiation Therapy
37. Attix FH (2004) Introduction to radiological physics and radiation dosimetry. Wiley-VCH
38. Cember H (2009) Introduction to Health Physics
39. Stolojescu-Crişan C, Holban Ş (2013) A Comparison of X-ray image segmentation techniques. *Adv Electr Comput Eng* 13:85–92.
<https://doi.org/10.4316/aece.2013.03014>
40. K. Bhargavi, S. Jyothi (2014) A Survey on Threshold Based Segmentation Technique in Image Processing. *Int J Innov Res Dev* 3:234–39
41. He BS, Zhu F, Shi YG (2013) Medical image segmentation. *Adv Mater Res* 760–762:1590–1593. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.760-762.1590>
42. Walkinshaw N (2009) Undergraduate Topics in Computer Science
43. Hodgson SF, Watts NB, Bilezikian JP, et al (2003) American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: 2001 edition, with selected updates for 2003. *Endocr Pract* 9:544–64.
<https://doi.org/10.4158/EP.9.6.544>
44. Ibáñez R (2003) Técnicas de medida de densidad de masa ósea Bone mineral density measurement techniques
45. Njeh CF, Fuerst T, Hans D, et al (1999) Radiation exposure in bone mineral density assessment. *Appl Radiat Isot* 50:215–236.
[https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(98\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(98)00026-8)
46. Blake GM, Fogelman I (2010) An Update on Dual-Energy X-Ray Absorptiometry. *Semin Nucl Med* 40:62–73.
<https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2009.08.001>
47. Carey JJ, Delaney MF (2010) T- Scores and Z -Scores. 113–121.

<https://doi.org/10.1007/s12018-009-9064-4>

48. Michael Maricic ZC (2000) Bone Densitometry
49. Dimai HP (2017) Use of dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) for diagnosis and fracture risk assessment; WHO-criteria, T- and Z-score, and reference databases. *Bone* 104:39–43.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.12.016>
50. De Aluja AS (2002) Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999)
51. Sarahi Montes García E, María Felipa Andrade Urzúa D, Alejandro Soriano Hernández D DISEÑO DE PROTOCOLO PARA EL MANEJO DE RATONES CEPA C57BL/6"
52. Suocheng W, Huining L, Haoqin L, et al Coca-cola and Pepsi-cola affect ovaries and follicles development. *Biomed Res* 27:
53. Fahim A, Ilyas MS, Jafari FH (2015) Histologic Effects of Carbonated Drinks on Rat Kidney. *J Rawalpindi Med Coll* 19:165–167
54. Bradshaw HB, Berkley KJ (2002) Estrogen replacement reverses ovariectomy-induced vaginal hyperalgesia in the rat. *Maturitas* 41:157–165.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5122\(01\)00261-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5122(01)00261-4)
55. Lasota A, Danowska-Klonowska D (2004) Experimental osteoporosis--different methods of ovariectomy in female white rats. *Rocz Akad Med w Białymstoku* 49 Suppl 1:129–131
56. Radenković M, Stojanović M, Prostran M (2016) Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J Pharmacol Toxicol Methods* 78:13–31.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>
57. Rohilla A, Ali S (2012) Alloxan Induced Diabetes : Mechanisms and Effects. *Int J Res Pharm Biomed Sci* 3:819–823
58. Misra M, Aiman U (2012) Alloxan: an unpredictable drug for diabetes induction? *Indian J Pharmacol* 44:538–9. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.99348>
59. Pari L, Uma Maheswari J (1999) Hypoglycaemic effect of *Musa sapientum* L.

in alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 68:321–325.

[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00088-4)

60. Hellbach K, Yaroshenko A, Willer K, et al (2016) Facilitated Diagnosis of Pneumothoraces in Newborn Mice Using X-ray Dark-Field Radiography. *Invest Radiol* 51:597–601. <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000285>
61. Finkel MP, Jinkins PB, Tolle J, Biskis BO (1966) Serial Radiography of Virus-Induced Osteosarcomas in Mice. *Radiology* 87:333–339. <https://doi.org/10.1148/87.2.333>
62. Dilpreet K, Yadwinder K (2014) International Journal of Computer Science and Mobile Computing Various Image Segmentation Techniques: A Review. *Int J Comput Sci Mob Comput* 3:809–814
63. Hernandez-Vaquero D, Garcia-Sandoval MA, Fernandez-Carreira JM, et al (2005) Measurement of bone mineral density is possible with standard radiographs: A study involving total knee replacement. *Acta Orthop* 76:791–795. <https://doi.org/10.1080/17453670510045381>
64. Levasseur R, Guaydier-Souquières G, Marcelli C, Sabatier JP (2003) The absorptiometry T-score: Influence of selection of the reference population and related considerations for everyday practice. *Jt Bone Spine* 70:290–293. [https://doi.org/10.1016/S1297-319X\(03\)00042-3](https://doi.org/10.1016/S1297-319X(03)00042-3)
65. L.Gimeno Forner, L.O. Gimeno Forner, D. Cejalvo Lapeña, et al (1990) Anestesia en el Animal de Laboratorio. Parte 2
66. Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, et al (2010) Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *DMM Dis Model Mech* 3:525–534. <https://doi.org/10.1242/dmm.006239>
67. Gonzalez J, Al ET, Gonzalez J, et al (2011) Manifestaciones bioquímicas , ecocardiográficas y. 40:143–151
68. Hernández-Ruiz Z, Rodríguez-Ramírez S, Hernández-Cordero S, Monterrubio-Flores E (2018) Patrones dietéticos y síndrome metabólico en mujeres con exceso de peso de 18 a 45 años de edad. *Salud Publica Mex* 60:158. <https://doi.org/10.21149/8847>

69. Cony KV, Goularte JF, De Souza CG, et al (2016) Consumo de refrigerante reduz a ingestão de alimentos em ratos Wistar. *Sci Med (Porto Alegre)* 26:21828. <https://doi.org/10.15448/1980-6108.2016.2.21828>
70. Wimalawansa SJ, Chapa MT, Yallampalli C, et al (1997) Prevention of corticosteroid-induced bone loss with nitric oxide donor nitroglycerin in male rats. *Bone* 21:275–280. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(97\)00125-7](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(97)00125-7)
71. He J, Rosen CJ, Adams DJ, Kream BE (2006) Postnatal growth and bone mass in mice with IGF-I haploinsufficiency. *Bone* 38:826–835. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2005.11.021>
72. Diab RAH, Fares M, Abedi-Valugerdi M, et al (2015) Immunotoxicological effects of streptozotocin and alloxan: In vitro and in vivo studies. *Immunol Lett* 163:193–198. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.12.006>
73. Radenković M, Stojanović M, Prostran M (2016) Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J Pharmacol Toxicol Methods* 78:13–31. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>
74. Lenzen S (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51:216–226. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>
75. Lenzen S, Munday R (1991) Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol* 42:1385–1391. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90449-F](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90449-F)
76. Ogur R, Uysal B, Ogur T, et al (2007) Evaluation of the Effect of Cola Drinks on Bone Mineral Density and Associated Factors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 100:334–338. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00053.x>
77. del Pino-Montes J, Benito GE, Fernández-Salazar MP, et al (2004) Calcitriol Improves Streptozotocin-induced Diabetes and Recovers Bone Mineral Density in Diabetic Rats. *Calcif Tissue Int* 75:526–532. <https://doi.org/10.1007/s00223-004-0118-9>
78. Navarre (Spain). Departamento de Salud. MT (2003) *Anales del sistema*

sanitario de Navarra. Gobierno de Navarra, Departamento de Salud

79. Verhaeghe J, Suiker AMH, Einhorn TA, et al (2009) Brittle bones in spontaneously diabetic female rats cannot be predicted by bone mineral measurements: Studies in diabetic and ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 9:1657–1667. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650091021>