

Diferentes fórmulas de multinutrientes mejoran el proceso de calcificación en células óseas humanas

Lei Shi, M.S., Aleksandra Niedzwiecki, Ph.D. y Matthias Rath, M.D.
Dr. Rath Research Institute, CA, USA

Introducción

El hueso es un tejido conectivo especializado y su formación implica muchos pasos y etapas. Es un tejido dinámico que responde a muchos factores internos y externos y que se adapta a condiciones funcionales cambiantes. El hueso está compuesto por varios tipos de células y por una matriz orgánica extracelular colágena, en la que predomina el colágeno de tipo I (85-95%), que se endurece por la deposición de hidroxapatita de calcio. El hueso también contiene diversas proteínas y proteoglicanos, que son específicos de los huesos y de los tejidos conectivos duros dentales. Un metabolismo óseo sano depende del correcto funcionamiento de distintos tipos de células óseas, como los osteoclastos que reabsorben (disuelven) el hueso, los osteoblastos que construyen el hueso, los osteocitos que ayudan a mantener el hueso, y las células de revestimiento, que recubren la superficie. Los osteoblastos activan el crecimiento óseo y se diferencian de los osteocitos durante la formación del hueso. Los osteocitos, por su parte, responden a la tensión mecánica y desempeñan un papel importante en la remodelación ósea.

Para estudiar el metabolismo óseo se emplean una serie de marcadores metabólicos específicos del hueso:

- La fosfatasa alcalina (ALP), uno de los marcadores clínicos más utilizados de la formación ósea. Es una enzima clave sintetizada por los osteoblastos en las primeras fases de la mineralización ósea y favorece la calcificación de la matriz ósea.
- La osteocalcina es una proteína dependiente de la vitamina K secretada por los osteoblastos. Se acumula en la matriz ósea y es importante para la fijación del calcio y para la mineralización ósea.

Correspondencia a

Dr. Aleksandra Niedzwiecki,
Dr. Rath Research Institute,
5941 Optical Court,
San Jose, CA 95138,
USA.

Email: author@jcmnh.org

- La proteína esclerostina es secretada por los osteocitos. Niveles elevados de esclerostina no sólo inhiben la proliferación de osteoblastos y su diferenciación a osteocitos, sino que también inducen la muerte de los osteoblastos, inhibiendo así la formación de hueso.

La esclerostina se ha convertido en una popular diana terapéutica para tratar la osteoporosis.

La relación y los efectos de cada marcador en la formación de hueso se reflejan en el gráfico siguiente

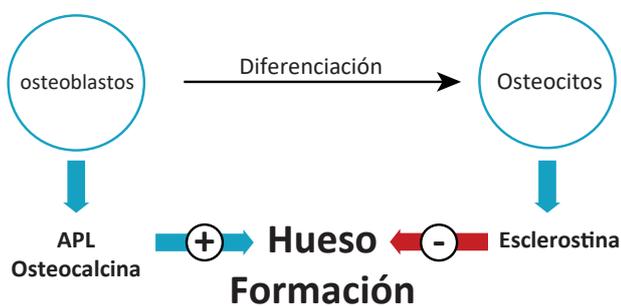


Figura 1. Importancia de los marcadores metabólicos analizados en el estudio sobre la formación ósea. (+) = fomento; (-) = inhibición.

Los micronutrientes regulan diversos procesos biológicos y afectan a la formación ósea en diferentes etapas metabólicas. La vitamina C desempeña un papel destacado tanto en la salud ósea como en la síntesis y estructura del colágeno, que constituye la base proteínica del hueso sobre la que se asientan los minerales, endureciendo toda la estructura. Además, las vitaminas D y K, minerales como el calcio y magnesio y otros nutrientes específicos regulan el proceso de mineralización ósea y el metabolismo a nivel celular.

Muchas personas preocupadas por la salud ósea toman suplementos nutricionales, como vitamina D, calcio o vitamina K. También existen suplementos multinutrientes que combinan vitaminas, minerales y otros nutrientes para los huesos. Muchas de estas fórmulas contienen combinaciones similares; sin embargo, difieren en cuanto a las formas químicas y las cantidades utilizadas en ellas, así como en las fuentes de las materias primas. En raras ocasiones, si es que existen, estas fórmulas son testadas en su conjunto para comprobar su eficacia biológica.

En nuestro estudio, investigamos los efectos de tres fórmulas multimicronutrientes desarrolladas por el Instituto de Investigación del Dr. Rath sobre procesos metabólicos específicos en células humanas. La Fórmula A es una composición multivitamínica y multinutriente que contribuye al metabolismo celular general del cuerpo; la fórmula B contiene una selección de micronutrientes importantes para la salud ósea y la fórmula C, una combinación esencial para la formación de colágeno. Los ingredientes de cada fórmula pueden dirigirse a diferentes funciones celulares. Por ello, probamos sus efectos en la formación ósea tanto de forma individual como combinados.

Material y métodos

Cultivo y tratamiento celular

Las células de osteoblastos humanos (HOb) se adquirieron a ATCC. Las células se cultivaron en Dulbecco Modified Eagle (DMEM; Gibco) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina. La incubación se realizó al 5% de CO₂ a 37°C. El medio se cambió cada 2-3 días. Las fórmulas de micronutrientes A, B y C fueron proporcionadas por Dr. Rath International Inc. (San Jose, CA). Como en todos los experimentos, las células se sembraron en placas de 96 (1 x 10⁵ células/pocillo) en FBS/DMEM al 10%. Cuando las células alcanzaron la confluencia a 37°C, se trataron con cada fórmula de ensayo a una concentración de 0,125 mpdd.

Preparación de las fórmulas de ensayo

Todos los complementos nutricionales se trataron de forma idéntica, de acuerdo con el protocolo recomendado por la United States Pharmacopeia (Farmacopea de Estados Unidos). Tres dosis diarias recomendadas de cada fórmula fueron desmenuzadas en mortero de cerámica hasta su consistencia en polvo. A continuación, el polvo se disolvió en 900 ml de ácido clorhídrico 0,1N y se incubó durante 1 hora a 37°C en una incubadora de agitación con una velocidad de rotación de 75 rpm. Las soluciones resultantes se esterilizaron por filtración utilizando filtros de 0,2 micrómetros, se tomaron alícuotas y se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su utilización. Las cantidades de muestras aplicadas en los experimentos se expresan como número de millonésimas partes de la dosis diaria recomendada del suplemento respectivo.

Ensayo de fosfatasa alcalina (ALP)

El ensayo de la fosfatasa alcalina se llevó a cabo empleando el kit de ensayo: "Alkaline Phosphatase Activity Colorimetric Assay Kit" (BioVision, Milpitas, CA).

Resumidamente, tras 48 horas de exposición a la fórmula de ensayo descrita anteriormente, las células se lisaron con el tampón de ensayo. A continuación, se añadió 5 mM de p-nitrofenilfosfato (pNPP)-un sustrato de la fosfatasa alcalina- en los pocillos experimentales durante 1 hora, seguido de una solución de parada. La absorbencia se midió a 450 nm en 5 minutos utilizando un lector de microplacas.

Ensayos de esclerostina y osteocalcina

Las células se trataron con cada fórmula de ensayo durante 2 semanas, tal y como se ha descrito anteriormente, para permitir la diferenciación de los osteoblastos en osteocitos. Tanto el medio como las fórmulas se cambiaron cada 3 días. Después de 2 semanas, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con formaldehído al 3%/0,1% de Triton en PBS durante 1 hora a 4°C. Los anticuerpos humanos SOST/Esclerostina (R&D Systems MAB1406-SP) y de osteocalcina humana/rata (R&D Systems MAB1406-SP) rata (R&D Systems MAB1419-SP) se utilizaron para los

ensayos de esclerostina y osteocalcina, respectivamente. La prueba ELISA se realizó con los anticuerpos mencionados en dilución 1:1k durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadió anti-rata HRP (Pierce) en dilución 1:1k durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con BSA/PBS al 0,1%. Se añadió solución de sustrato TMB (Rockland) para la reacción de la peroxidasa. Después de 20 minutos, se midió la absorbencia a 650 nm utilizando un lector de microplacas.

Análisis estadístico

La media y las desviaciones estándar de los datos se calcularon con Microsoft Excel. Las diferencias significativas entre el control y cada tratamiento con fórmulas se determinaron mediante el test t de Student a un nivel de significación de 0,05.

Resultados

Características de las fórmulas de micronutrientes probadas en el estudio.

En la Tabla 1 se presenta la composición nutricional de las fórmulas A, B y C.

Tabla 1. Composición nutricional de las fórmulas A, B y C Composición nutricional de las fórmulas A, B y C

Fórmula A		Fórmula B	Fórmula C
Vitamina C	Molibdeno	Vitamina C	Vitamina C
Vitamina A	Biotina	Vitamina A	L-lisina
Vitamina E	L-prolina	Vitamina E	L-prolina
Vitamina D3	L-lysina	Vitamina D3	
Vitamina B	L-carnitina	Vitamina K2	
Ácido fólico	L-arginina	Ácido fólico	
Calcio	L-cisteína	Calcio	
Magnesio	Coenzima Q10	Magnesio	
Potasio	Fósforo	Potasio	
Zinc	Picnogenol	Zinc	
Manganeso	Bioflavonoides cítricos	Manganeso	
Selenio	Carotenoides naturales	Boro	
Cobre		Yodo	
Cromo		Sílice	
Inositol		Carotenoides naturales	

La Fórmula A proporciona nutrientes básicos a las células del cuerpo para apoyar el crecimiento celular, el metabolismo energético normal, la síntesis de colágeno, la protección contra el estrés oxidativo y muchas otras funciones. Comprende más de 30 componentes naturales que actúan sinérgicamente, como vitaminas, aminoácidos, minerales y otros nutrientes esenciales.

La Fórmula B fue diseñada para apoyar el metabolismo óseo. Contiene algunos nutrientes que también están presentes en las fórmulas A y C, como la vitamina C, que es esencial para la síntesis de colágeno en las células óseas. La fórmula B también contiene vitamina K, vitamina D e importantes minerales para la construcción ósea, como calcio, magnesio y el boro. El magnesio y el boro contribuyen a la absorción y el metabolismo del calcio necesarios para la resistencia de los huesos.

La Fórmula C contiene nutrientes esenciales para la formación de colágeno: vitamina C, lisina y prolina. La vitamina C regula la síntesis de colágeno y su hidroxilación, asegurando el correcto ensamblaje de una estructura de colágeno de triple hélice. La lisina y la prolina -que componen aproximadamente 2/3 de los aminoácidos del

colágeno- forman las fibrillas de colágeno como la principal proteína de los tejidos conectivos del organismo. Dado que los seres humanos no producen vitamina C y lisina de forma innata, es probable que se produzcan deficiencias con consecuencias negativas en la síntesis de colágeno en el organismo, incluido el colágeno óseo. El ser humano produce prolina, pero de forma limitada.

Efectos metabólicos de dos fórmulas multinutrientes en la salud ósea: Fórmula A y Fórmula B

Los resultados de la Figura 2 muestran que las fórmulas A y B tienen efectos positivos en todos los marcadores de prueba relevantes para la salud ósea. Así, la exposición de las células óseas a las Fórmulas A y B dio lugar a una mayor actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en un 15% y un 43%, respectivamente, en comparación con las células de control (células no expuestas al tratamiento con micronutrientes).

(Fig. 2-I). El aumento de la actividad de la ALP se ha asociado positivamente con los procesos de mineralización de los huesos.

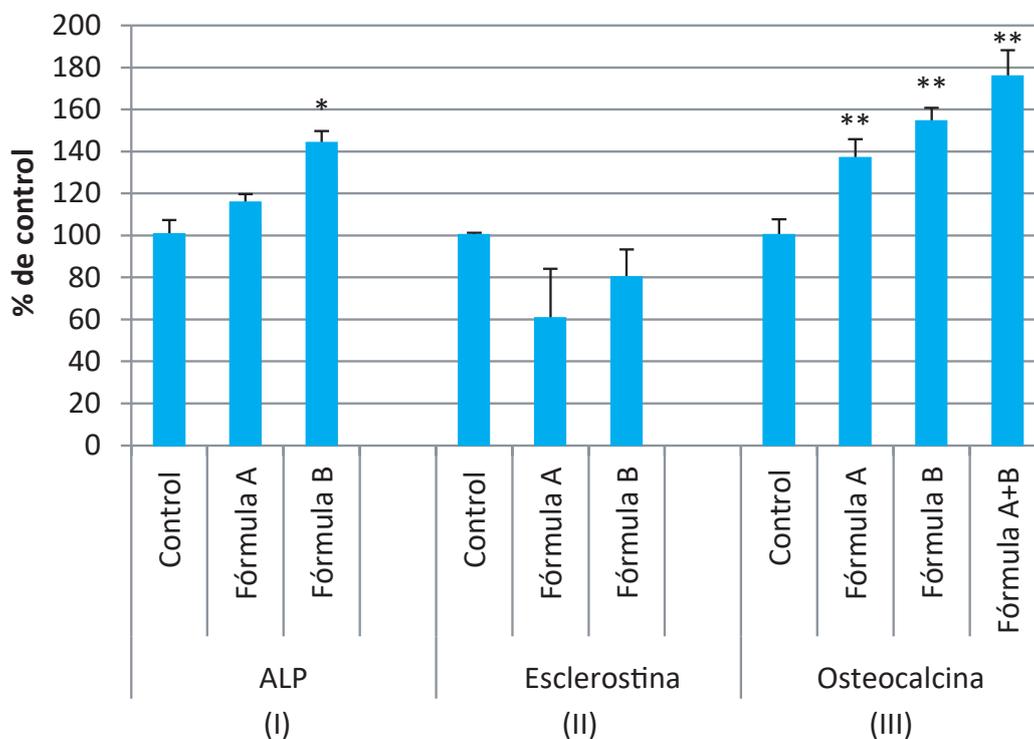


Figura 2. (I) Actividad ALP, (II) niveles de esclerostina y (III) niveles de osteocalcina en osteoblastos expuestos a Fórmula A y B en concentraciones de 0,125mpdd. Los datos se presentan como porcentaje del control. La significación estadística se indica como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

La figura 2-II muestra que las células formadoras de hueso expuestas a las fórmulas A y B han disminuido la expresión de esclerostina en un 40% y un 20% respectivamente. La disminución de los niveles de esclerostina indican una mejor salud ósea, ya que la esclerostina inhibe la formación de hueso nuevo y la remodelación ósea. Los resultados presentados en la Figura 2-III muestran que las células aplicadas individualmente con las fórmulas A y B expresan niveles de osteocalcina significativamente superiores en un 37% y 54% respectivamente. Estas dos fórmulas combinadas resultaron en un aumento aún mayor de la osteocalcina-hasta un 76%- en comparación con el control y las fórmulas individuales, lo que indica un mayor proceso de mineralización ósea en las células formadoras de hueso.

Efectos metabólicos de una fórmula multinutriente que favorece la salud ósea frente a una fórmula básica de construcción de colágeno: Fórmula B y Fórmula C

El aporte óptimo de minerales y la formación de colágeno son importantes para unos huesos sanos. Por ello, comparamos cómo la Fórmula B (que aporta

minerales importantes y otros) y la Fórmula C (que contiene colágeno) afectan a diferentes procesos metabólicos en el crecimiento óseo.

Los resultados presentados en la Figura 3 muestran que las Fórmulas B y C tienen efectos metabólicos positivos sobre los marcadores de calcificación ósea. Así, la Fórmula C -que contiene nutrientes que favorecen el colágeno- aumentó la actividad ALP en un 14% en comparación con el control. En presencia de una composición de nutrientes más completa, como en la Fórmula B, la actividad ALP en las células óseas aumentó en un 43%, lo que fue significativamente mayor en comparación con el control y la Fórmula C (Fig. 3-I). La Figura 3-II muestra que las células tratadas con Fórmula B y C produjeron un 20% y un 41% menos de esclerostina, respectivamente que el control. Una disminución en el nivel de esclerostina indica formación de hueso nuevo y proceso de remodelación ósea. Como se presenta en la Figura 3-III, tanto la Fórmula C como la Fórmula B promovieron un aumento significativo en los niveles de osteocalcina de un 49% y un 54%, respectivamente, en comparación con el control, lo que señala un proceso

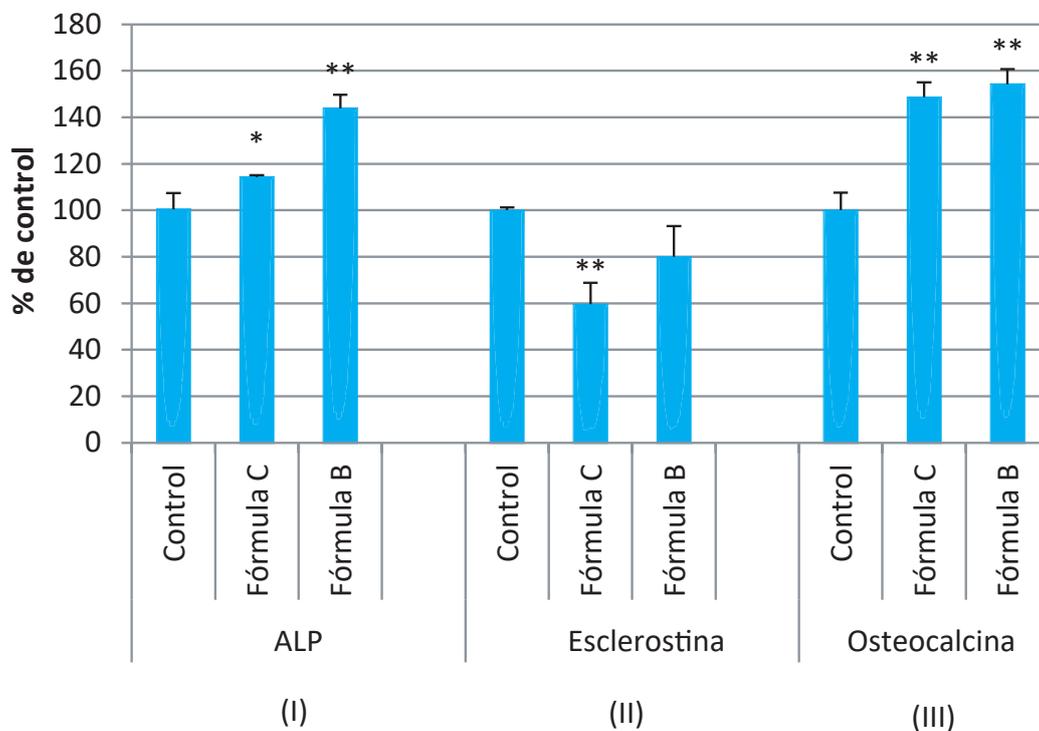


Figura 3. (I) Actividad ALP, (II) niveles de esclerostina y (III) niveles de osteocalcina en osteoblastos expuestos a las Fórmulas B y C en concentraciones de 0,125mpdd. Los datos se presentan como porcentaje del control. La significación estadística se representa como *p<0,05; **p<0,01.

de mineralización ósea y de incremento de la densidad mineral ósea.

Debate

Los resultados muestran que todas las fórmulas testadas de micronutrientes - A, B y C-tienen efectos positivos en la salud ósea al dirigirse a factores biológicos importantes en diferentes etapas de la formación ósea. Células formadoras de hueso humanas tratadas con estas fórmulas mostraron un aumento de los factores de crecimiento óseo ALP y osteocalcina, y una disminución del inhibidor del crecimiento óseo, esclerostina.

En este estudio, todas las fórmulas probadas influyeron positivamente en la actividad de la ALP.

La mayor eficacia se observó en el caso de la Fórmula B, una formulación enriquecida con minerales y compuestos específicos importantes para la salud ósea en comparación con las fórmulas A y C. La mayor actividad de la ALP suele acompañar a un crecimiento óseo activo. Por ejemplo el nivel de ALP sérica en niños en crecimiento es de 1,5 a 2,5 veces superior al de los adultos sanos¹.

Por el contrario, una disminución de la actividad de la ALP se asocia a una interrupción del crecimiento óseo. También se ha descrito que la baja actividad de la ALP está relacionada con el escorbuto, la deficiencia de vitamina B12 y vitamina D y la deficiencia multinutricional de zinc o magnesio.²⁻⁴

La osteocalcina, que actúa como puente entre la matriz ósea y los minerales en los tejidos, es un reconocido biomarcador en la formación y mineralización óseas⁵. La osteocalcina disminuye en el hueso y el suero con la edad, tanto en hombres como en mujeres, lo que se traduce en una menor densidad mineral ósea y un mayor riesgo de fractura.⁶ Nuestros resultados muestran que todas las fórmulas probadas aplicadas individualmente fueron eficaces para aumentar los niveles de osteocalcina. Sin embargo, una combinación de las fórmulas A y B fue significativamente más eficaz que cada fórmula utilizada individualmente ($p < 0,01$), lo que indicaría su aplicación como apoyo de la salud ósea y como medida preventiva contra la baja densidad mineral ósea.

Curiosamente, las fórmulas con baja o nula presencia de minerales fueron más eficaces para disminuir los niveles de esclerostina en osteoblastos que la Fórmula B, rica en minerales. Por ejemplo, observamos que la Fórmula A, que contiene una lista completa de micronutrientes, pero no un alto nivel de calcio, y la Fórmula C, que sólo contiene los nutrientes esenciales para la formación de colágeno, fueron más efectivas haciendo descender los niveles de esclerostina en un 40 y 41% respectivamente. Este porcentaje es superior al 20% conseguido con la Fórmula B, rica en minerales y dirigida específicamente a la salud ósea. Como un inhibidor de la formación de hueso, la esclerostina regula negativamente la diferenciación de los osteoblastos y el proceso de mineralización ósea e inhibe la formación del hueso. Los niveles elevados de esclerostina pueden sugerir una formación ósea deficiente, riesgo de fractura ósea y enfermedades óseas caracterizadas por la disminución de la formación ósea⁷. Estudios en roedores mostraron que la inhibición de la esclerostina mejora la masa ósea, la resistencia ósea y la curación de fracturas⁸.

Además, un estudio clínico en mujeres posmenopáusicas mostró que el descenso de esclerostina mejoraba su densidad de masa ósea, reducía los marcadores séricos de resorción ósea y aumentaban los de formación ósea.⁹ Los niveles séricos de esclerostina son más elevados en los hombres que en las mujeres y aumentan con la edad.¹⁰

Debido a su importante papel en la remodelación ósea, la esclerostina se ha convertido en un objetivo potencial para el tratamiento de la osteoporosis y la fragilidad ósea⁷.

Nuestro estudio subraya la importancia de los micronutrientes que favorecen el colágeno (Fórmula C) en varios procesos metabólicos en las células formadoras de hueso. Las hélices de colágeno reticuladas garantizan una estructura ósea fuerte por la mineralización. A su vez, la deficiencia de colágeno o su estructura puede debilitar el hueso. Nuestros resultados in vitro están respaldados por un estudio clínico en pacientes con fracturas óseas que recibieron suplementos de Fórmula C y bioflavonoides cítricos, pero no aumentaron su ingesta de calcio y vitamina D.

Los resultados mostraron un mayor bienestar y un acortamiento del tiempo de curación de las fracturas en 3 semanas en comparación con los pacientes que tomaron placebo. Los resultados subrayan la importancia del apoyo nutricional para la formación óptima de colágeno en el metabolismo óseo cuando no se suministran micronutrientes como el calcio, minerales y vitamina D.¹¹

Nuestros huesos están en constante construcción y remodelación. Las diferentes combinaciones de micronutrientes de las fórmulas A, B y C, tanto por separado como en combinación- mostraron efectos positivos en la regulación de diferentes factores biológicos implicados en etapas específicas de la formación ósea. Sus beneficios sinérgicos indican la importancia de la suplementación con micronutrientes para una salud ósea óptima.

Referencias

1. Roudsari JM, Mahjoub S. Quantification and comparison of bone-specific alkaline phosphatase with two methods in normal and paget's specimens. *Caspian J Intern Med*. 2012; 3(3): 478–483.
2. Elice F, Zangari M, Barlogie B, et al. Serum concentrations of vitamin B-12 and alkaline phosphatase in newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood*. 2005; 106(11): 5110.
3. Kim GS, Kim CH, Park JY, Lee KU, Park CS. Effects of vitamin B12 on cell proliferation and cellular alkaline phosphatase activity in human bone marrow stromal osteoprogenitor cells and UMR106 osteoblastic cells. *Metabolism*. 1996; 45(12):1443-6.
4. Cho YE, Lomeda RAR, Ryu SH, et al. Zinc deficiency negatively affects alkaline phosphatase and the concentration of Ca, Mg and P in rats. *Nutr Res Pract*. 2007; 1(2): 113–119. doi:10.4162/nrp.2007.1.2.113.
5. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, et al. Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(1): 45-49.
6. Vanderschueren D, Gevers G, Raymaekers G, Devos P, Dequeker J. Sex- and age-related changes in bone and serum osteocalcin. *Calcif Tissue Int*. 1990; 46(3): 179-182.
7. Lewiecki EM. Role of sclerostin in bone and cartilage and its potential as a therapeutic target in bone diseases. *Ther Adv Musculoskel Dis*. 2014; 6(2): 48-57. doi: 10.1177/1759720X13510479.
8. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, et al. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2009; 24(4): 578-588.
9. Miller PD, Wagman RB, Peacock M, et al. Effect of denosumab on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover: six-year results of a phase 2 clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(2): 394-402. doi: 10.1210/jc.2010-1805.
10. Ardawi MS, Al-Kadi HA, Rouzi AA, Qari MH. Determinants of serum sclerostin in healthy pre- and postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2011; 26(12): 2812-2822. doi: 10.1002/jbmr.479.
11. Jamdar J, Rao B, Netke S, et al. (2004) Reduction in tibial shaft fracture healing time with essential nutrient supplementation containing ascorbic acid, lysine, and proline. *J Altern Complement Med*. 2004; 10(6): 915-916.