ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION
Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición

Vol. 46 N° 1, 1996

Variaciones en el contenido de calcio, fosfato, magnesio y sodio en huesos de ratas ovariectomizadas

Miguel Angel de Bortoli[1], *José Miguel Ascar* [2], *Patricia Arce* [3] *y Luis Villegas*[4]

Universidad Nacional de San Luis (UNSL). San Luis, Argentina

RESUMEN. Se trabajó con dos lotes de 10 ratas hembras Wistar de tres meses de edad. En el día cero un lote fue bilateralmente ovariectomizado (OVX). El otro lote (Sham) fue sometido a operación simulada. La alimentación fue *ad libitium* para el lote Sham y restringida para el OVC. En los días 15, 30, 45 y 90 de la experiencia a las 20 ratas se les seccionó un segmento de cola. El día 180 se sacrificaron todos los animales y se extrajo el fémur izquierdo. Con los huesos de los segmentos de cola y los fémures se determinaron Ca++, Mg++, Na+ y Po_4^{-3}. A los 15 días los contenidos de Ca++, Mg++, Na+ y Po_4^{-3} no mostraron diferencias entre los dos lotes ($p<0,05$). A los 30 días encontramos una disminución significativa sólo en la concentración de Ca++ ($p<0,05$) en las ratas OVX con respecto a las ratas Sham. A los 45 días todos los iones analizados disminuyeron significativamente (<0,05) en las ratas OVX, disminución que se profundizó a los 90 días. A los 180 días -en fémur- se observaron las disminuciones máximas en las ratas OVX que fueron, con respecto a las ratas Sham: para el Ca++ 31 %, para el PO_4^{-3} 29 %, para el Mg++ 31,6 % y para el Na+ 29 %.
Nuestros resultados permiten inferir que en ratas ovariectomizadas a los tres meses de edad, el contenido de calcio, fosfato, magnesio y sodio en huesos de la cola es un buen indicador de la pérdida de masa ósea, a partir de los 45 días de la ovariectomía.

SUMMARY. Variations in the contents of calcium, phosphate, magnesium and sodium in bones of ovariectomized rats. Bilateral ovariectomies (OVX) or sham surgeries -respectively- were performed in two lots of ten female Wistar rats, 90 days old. Food was available *ad libitum* to sham rats, and it was restricted to OVX ones. At 15, 30, 45 and 90 days, a segment of their tails was sectioned. At 180 days all rats were sacrificed and the left femurs were excised. With the tail's bones and the femurs we determined Ca++, PO_4^{-3}, Mg++ y Na+ concentration.
After 15 days, no significant differences inter lots were observed ($p<0.05$) in all ions contents. After 30 days Ca++ value was significantly less ($p<0.05$) in the OVX rats than in the sham ones. Alfter 45 days all the analyzed OVX rats ions were significantly less ($p<0.05$) than the sham values. That difference inter lots was greater after 90 days. Finally, day 180^{th} gave a decrease in the OVX rat values -from the femur- as follows: for Ca++ 31 %, for PO_4^{-3} 29 %, for Mg++ 31,6 % and for Na+ 29 %.
Our results shown that in 90 days old ovariectomized rats, the concentration of calcium, phosphate, magnesium and sodium in the tail bones is a good indicator of bone mass loss, after 45 days of ovariectomy.

INTRODUCCION

La osteoporosis es una enfermedad con un significado socio-económico de una magnitud muy importante. De 15 a 20 millones de americanos la padecen y se producen por su causa alrededor de 1,3 millones de fracturas anuales en personas mayores de 45 años (1). Indudablemente la tendencia en las costumbres alimentarias a consumir menos lácteos -en las clases medias y altas-, y la menor posibilidad de compra de esos productos ricos en calcio en las clases socio-económicamente mas pobres -cada día más numerosas-, contribuyen en gran medida a una mineralización ósea deficiente y mayores posibilidades de osteopatías futuras.

Dentro de las denominadas osteoporosis involutivas, la que se produce después de la menopausia es la más frecuente (2). En la mujer posmenopáusica se produce una pérdida de masa ósea cuya causa más aceptada es el déficit de hormonas ováricas (3). Cuando ésta osteopenia alcanza una cierta magnitud se produce la osteoporosis. El modelo animal que representa más aproximadamente la pérdida de masa ósea que ocurre en la mujer posmenopáusica por el déficit de hormonas ováricas es la rata ovariectomizada (OVX) (4). En efecto, la disminución de estrógenos que ocurre en este modelo animal le produce un incremento del turnover óseo (5) con resorción excediendo a formación, gran pérdida de hueso reticular (6), con decremento en la absorción de calcio intestinal. Se observa además efecto benéfico del aumento de peso (7); buena respuesta a la terapia con estrógenos (8), con tamoxifeno (9), con clomifeno (10), con fluoruros (11), con propranolol (12), con bifosfonatos (13), con parathormona (14), con calcitonina (15), con calcitriol (16), con ejercicio físico (17), y con ingestas aumentadas de calcio.

Los numerosos trabajos realizados con ratas OVX han estudiado los cambios hormonales (23), turnover óseo (24), densitometría (25), fragilidad ósea (26), estructura mecánica (27), histomorfometría (28), resorción ósea reticular (29), balance de calcio, calcemia (30), fosfatasa alcalina y 25 (OH) vitamina D sérica (31), etc.

Encontramos pocos estudios secuenciales cuantitativos de las variaciones de los elementos minerales en el hueso de la rata después de la OVX (18,19,20). Por este motivo nuestro objetivo fue analizar la variación de las concentraciones de los iones inorgánicos más abundantes en hueso: calcio, fosfato, magnesio y sodio, después de la OVX. Por otro lado dosar esos iones en hueso de cola de rata -no

1 Profesor Adjunto en Biología General, Facultad de Ciencias Humanas, UNSL
2 Profesor Asociado en Bromatología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia (FQBF), UNSL.
3 Jefe Trabajos Prácticos en Química Analítica, FQBF, UNSL.
4 Alumno de la carrera de Farmacia, FQBF, UNSL.

utilizado hasta ahora en nuestro conocimiento- nos permitiría ver en que medida esta metodología que no implica el sacrificio de lotes enteros de animales para cada determinación, refleja la osteopenia pos OVX.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron dos lotes de 10 ratas hembras Wistar de tres meses de edad y un peso medio de 215 g (D.E.=14). En el día cero las 10 ratas del lote OVX fueron bilateralmente ovariectomizadas por abordaje dorsal usando éter para anestesia. Al otro lote (Sham) se lo sometió a operación simulada. Cualitativamente se les dio la misma alimentación a los dos lotes: dieta balanceada conteniendo proteínas 24 %, grasas 6 %, calcio 1 %, fósforo 0,5 %,cloruro de sodio 0,5 %, magnesio 0,05 %, vitamina D 300 UI/100 g, y un valor energético de 2.780 cal/g.

Cuantitativamente a las ratas Sham se les dio alimento *ad libitium* y a las OVX se les restringió el alimento a 15 g/rata/día, para evitar la diferencia de peso que se produce cuando consumen la misma cantidad de alimento (7, 32). El consumo promedio de los controles fue de 17 g/rata/día.

El agua se dio *ad libitum* a los dos lotes.

Los animales colocados en jaulas grandes, cinco en cada una, a una temperatura entre 20 y 28 °C, y con un ciclo luz/oscuridad de 13 h/11h

A los 15, 30, 45 y 90 días se pesaron las 20 ratas y se seccionó un segmento de cola a cada una. A los 180 días todas las ratas fueron pesadas y sacrificadas, y el fémur izquierdo fue extraído. La ovariectomía fue confirmada por la falta de tejido ovárico y la marcada atrofia de los cuernos uterinos después del sacrifico. Los huesos fueron totalmente descarnados, secados 12 hs. a 100 °C y pesados. A este peso fueron referidas las concentraciones.

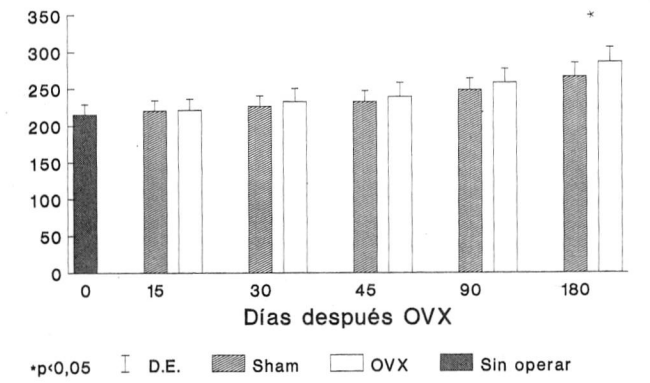
Luego todos los huesos fueron llevados a cenizas (12 hs. a 600 °C) y pesados. Las determinaciones de calcio, magnesio y sodio se hicieron en extractos del HCl por espectrometría de absorción atómica; y la de fosfato por espectrometría de absorción molecular, por formación de fosfomolibdato complejo.

El análisis estadístico se realizó con test t de Student, valores de p menores a 0,05 fueron considerados significativos.

RESULTADOS

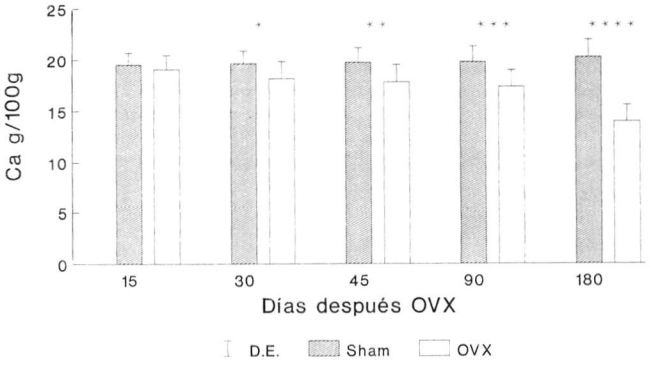
Los pesos (Figura 1) de las ratas OVX evolucionaron en forma similar a las Sham, observándose recién a los 180 días una diferencia significativa entre los dos lotes (p<0,05).

FIGURA 1
Peso de ratas ovariectomizadas



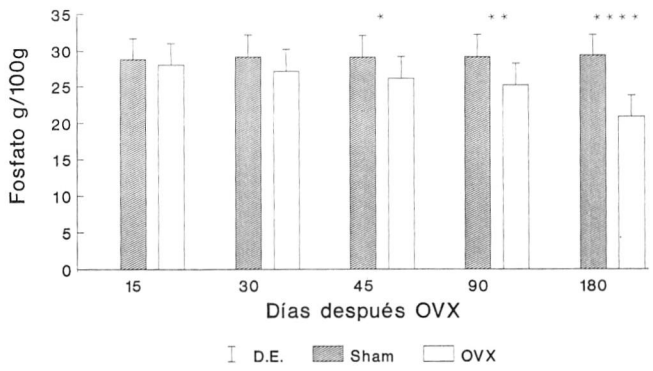
La concentración de calcio (Figura 2) en huesos de la cola disminuyó significativamente en las ratas OVX a partir del corte de los 30 días (p<0,05), aumentando la diferencia a los 45 y 90 días. A los 180 días (en fémur) el calcio de las OVX fue un 69 % del valor de las Sham.

FIGURA 2
Calcio óseo en ratas ovariectomizadas



La concentración de fosfato (Figura 3) en huesos de la cola disminuyó significativamente en las ratas OVX a partir de los 45 días (p<0,05), disminuyó algo más a los 90 días, llegando a ser a los 180 días (en fémur) un 71% del valor de las Sham.

FIGURA 3
Fosfato óseo en ratas ovariectomizadas



La concentración de magnesio (Figura 4) en huesos de la cola disminuyó significativamente en las ratas OVX a partir de los 45 días (p<0,05), disminuyó más a los 90 días, llegando a ser a los 180 días (en fémur) un 68,2 % del valor de las Sham.

La concentración de sodio (Figura 5) en huesos de la cola disminuyó significativamente en las ratas OVX a partir de los 45 días (p<0,05), bajó algo más a los 90 días, llegando a ser a los 180 días (en fémur) un 71 % del valor de las Sham.

El peso de las cenizas (expresión de la parte mineral) (Figura 6) en porcentaje del peso de hueso seco sufrió una disminución significativa en las ratas OVX a partir de los 30 días (p<0,05), disminuyendo más a los 45 y 90 días, llegando a los 180 días a ser un 73 % de los valores de las Sham.

FIGURA 4
Magnesio óseo en ratas ovariectomizadas

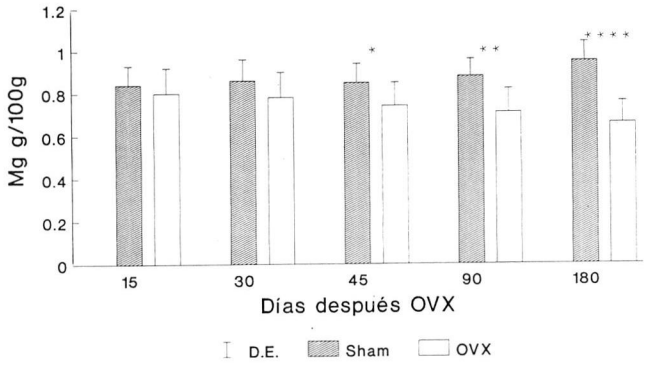


FIGURA 5
Sodio óseo en ratas ovariectomizadas

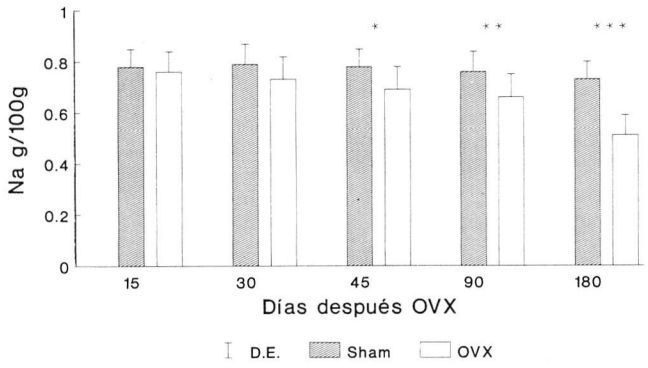
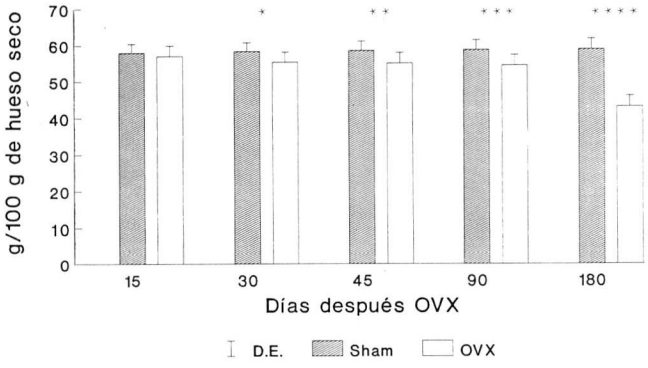


FIGURA 6
Cenizas de huesos de ratas



El peso y volumen del fémur no mostró diferencias significativas entre los dos lotes a los 180 días (datos no mostrados).

DISCUSION

Los valores de calcio, fosfato y cenizas en fémur encontrados coinciden con los de M. Kaye (19), y con los de M. Yasui y col (18), difiriendo en cambio con los informados por Swissa-Sivan y col (20). En el modelo «rata madura» de tres meses de edad elegido, se ha descrito (21, 22) una pérdida de hueso reticular (en tibia proximal) significativa a los 15 días de los OVX y marcada a los 30 días, con los efectos más agudos del aumento de resorción ósea a los 100 días de la OVX.

Las variaciones que encontramos en la concentración de los iones estudiados -principalmente calcio y fosfato-, y en el porcentaje de cenizas en huesos de la cola de rata, no fueron tan marcadas como las de los parámetros mencionados arriba (21, 22) en tiempos iguales. En nuestros resultados probablemente ha influido el ligero aumento de peso de las ratas OVX, recién significativo ($p<0,05$) a los 180 días de la experiencia.

Frente a la opinión de algunos autores, nuestra experiencia previa coincide con Wronski y col (7) en el hecho que dar la misma cantidad de alimento a los dos lotes induce a resultados erróneos. En efecto, si se alimenta *ad libitum* los dos lotes, las OVX aumentan mucho de peso. Por otro lado, si se restringe a 15 g/rata/día de alimento a los dos lotes, los controles no aumentan normalmente de peso y se desfasan significativamente a las OVX. Por este motivo seguimos el criterio de Wronski y col., es decir restringir a 15/g/rata/día a las OVX, y alimentar *ad libitum* a las Sham. De esta forma el lote Sham consumió un promedio de 17 g/rata/día, mayor que el consumo de las OVX, compensando las diferencias metabólicas (32) que motivan la tendencia al sobrepeso de las OVX.

A pesar de esto, a los 180 días hubo diferencia significativa de peso ($p<0,05$), pero esto de ninguna manera desvirtúa los resultados: a) por que en los tiempos de todas las determinaciones efectuadas en huesos de la cola de rata los pesos de los dos lotes no tuvieron diferencia significativa; b) por que a los 180 días el sobrepeso de las OVX les protege en alguna medida de la osteopenia (7), por lo que la diferencia encontrada en la concentración de los iones analizados en ese tiempo sería mayor de haberse logrado igualdad de peso entre los dos lotes.

Otro detalle que puede haber influido fue la concentración de calcio (1 g/100 g) en el alimento de las ratas. Algunos autores (4, 19) sugieren entre 0,40 y 0,87 g de calcio en 100 g de alimento como suficiente para la rata, otros autores (18) usan para ratas de 5 semanas como ingesta estándar 1,25 g de calcio en 100 g de alimento, por lo que decidimos dar 1 g de calcio/100 g atendiendo a que las ratas OVX tenían restricción alimentaria a 15 g/día, y no quisimos correr riesgos de dar menos calcio que el necesario y que esto pudiera falsear los resultados. De todas maneras, creemos que nuestra dieta tiene un pequeño exceso de calcio, pero esto solo puede haber disminuido las diferencias encontradas, nunca aumentado.

En cuanto al fósforo de la dieta, es válido el mismo razonamiento efectuado en el párrafo anterior para el calcio.

Otro factor que influyó fue el utilizar huesos de la cola en las primeras determinaciones. Los huesos largos como el fémur tienen un un recambio óseo mayor por el peso que soportan, esto hace que los cambios minerales sean más notorios. No obstante, nuestro objetivo de utilizar los huesos de la cola de rata como indicador de la pérdida de masa ósea se basó en la ventaja de que se pueden realizar varias determinaciones -en nuestro caso cuatro- en el mismo animal siguiendo las variaciones individuales, no siendo necesario sacrificar un lote de ratas en cada tiempo analizado.

Concluyendo, nuestros resultados permiten afirmar que el contenido mineral de los huesos de la cola de rata es un buen indicador de la pérdida de masa ósea por ovariectomía.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Biología de la Reproducción de la UNSL por todo el apoyo brindado.

A la Profesora Ana María Tello por su ayuda en el texto en inglés.

REFERENCIAS

1. Osteoporosis: Concensus Conference, J. Am. Med. Assoc. 252:799-802, 1984.
2. Albright F., Smith PH, Richardson AM. Postmenopausal osteoporosis: its clinical features. J. Am. Med. Assoc. 116:2465-2474, 1941
3. Gallager JC. The pathogenesis of osteoporosis. Bone Miner 9:215-227, 1990.
4. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner 15:175-192, 1991.
5. Wronski TJ, Citrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int 43:179-183, 1988.
6. Turner RT, Evans GL, Wakley GK. Mechanism of action of estrogen on cancellous bone balance in tibiae of ovariectomized growing rats: Inhibition of indices of formation and resorption. J. Bone Miner Research 8:359-366, 1993.
7. Wronski TJ, Schenck PA, Cintrón M, Walsh CC. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int 40:155-159, 1987.
8. Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy and estrogen substitution. Calcif Tissue Int 52:26-33, 1993.
9. Kalu DN., Salerno E., Liu CC., Echon R., Ray M., Garza-Zapata M., Hollis BW. A comparative study of the actions of tamoxifen, estrogen and progesterone in the ovariectomized rat. Bone Miner 15:109-114, 1991.
10. Chakraborty PK, Brown JL., Ruff CB, Nelson MF., Mitchell AS. Effects of long-term treatment with estradiol or clomiphene citrate on bone maintenance, and pituitary and uterine weights in ovariectomized rats. J. Steroid Biochem Molec Biol. 40:725-729, 1991.
11. Rigalli A., Ballina JC., Puche RC. Bone mass increase and glucose tolerance in rats chronically treated with sodium fluoride. Bone Miner 16:101-108, 1992.
12. Minkowitz B., Boskey AL., Lane JM., Pearlman HS., Vigorita VC. Effects of propranolol on bone metabolism in the rat. J. Orthopaedic Research 9:869-875, 1991.
13. Wronski TJ, Yen CF, Scott KS. Estrogen and diphosphonate treatment provide long-term protection against osteopenia in ovariectomized rats. J Bone Miner Res 6:387-394, 1991.
14. Liu CC, Kaly DN. Human parathyroid hormone prevents bone loss and augments bone formation in sexually mature ovariectomized rats. J Bone Miner Res 5:963-982, 1990.
15. Hayashi T., Yamamuro T., Okumarah, Kasay R., Toda K. Effect of eel calcitonin on the prevention of osteoporosis induced by combination of immobilization and ovariectomy in the rat. Bone 10:25-28, 1989.
16. Faugere MC, Okomoto S, DeLuca HF., Malluche HH. Calcitriol corrects bone loss induced by oophorectomy in rats. Am. J. Physiol (Endocr Metab 13): E35-E38, 1986.
17. Barengolts EI, Curry DJ, Bapna MS, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone mass and mechanical properties in intact and ovariectomized rats. J. Bone Miner Res 8:937-942, 1993.
18. Yasui M., Yase Y., Ota K. Distribution of calcium in central nervous system tissues and bones of rats maintained on calcium-deficient diets. J. Neurolog Sci. 105:206-210, 1991.
19. Kaye M. The effects in the rat of varying intakes of dietary calcium, phosphorus and hydrogen ion on hyperparathyroidism due to chronic renal failure. J. Clin. Inv. 53:256-269, 1974.
20. Swissa-Sivan A., Satter M, Brooks GA, Azevedo J., Viguir C, Azoury R., Greenfield C., Oman S., Leichter I., Zinker B., Menczel J. Effect of swimming on prednisolone-induced osteoporosis in elderly rats. J. Bone Miner Res 7:161-169, 1992.
21. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. Calcif Tiss Int 45:360-366, 1989.
22. Kalu DN., Liu CC., Hardin RR., Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. Endocrinology 124:7-16, 1989.
23. Ismail F., Epstein S., Fallon MD., Reinhardt TA. Serum bone gla protein and the vitamin D endocrine system in the ophorectomized rat. Endrocrinology 122:624-630, 1988.
24. Wronski TJ., Cintron M., Doherty AL., Dann LM. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. Endocrinology 123:681-686, 1988.
25. Ostlere S.,, Gold R. Osteoporosis and bone density measurement methods. Clin Orthop Rel Res 271:149-161, 1991.
26. Kalu DN, Hardin RR., Cockerham R. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. Endocrinology 115:507-512, 1984.
27. Simkin A., Ayalon J., Leichten I. Increased trabecular bone density due to bone-loading exercises in postmenopausal osteoporotic women. Calcif Tiss Int 40:59-63, 1987.
28. Bain S., Mason C., Celino D., Lantry M., Edwards M. High-dose estrogen inhibits bone resorption and stimulates bone formation in the ovariectomized mouse. J. Bone Miner Res. 4:435-442, 1993.
29. Delvin H., Ferguson MW., Carter DH. Cancellous bone resorption in the proximal ilium of the ovariectomized rats. Calcif Tiss Int 46:395-400, 1990.
30. Kalu DN., Echon RM., Hollis BW. Modulation of ovariectomy-related bone loss by parathyroid hormone in rats. Mech Aging Devt 56:49-62, 1990.
31. Turner RT., Vandersteenhoven JJ, Bell NB. The effects of ovariectomy and 17ß-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. J. Bone Miner Res 2:115-122, 1987.
32. Tarttelin MF., Gorsky RA. The effects of ovarian steroids on food and water intake and body weight in the female rat. Acta Endocr (Kbh) 72:551-568, 1973.

Recibido: 31-03-1995
Aceptado: 05-10-1995