

## Variaciones en el contenido de calcio, fosfato, magnesio y sodio en huesos de ratas macho castradas

Miguel A. De Bortoli, Luis N. Villegas, Marisa H. Garraza, Mónica Gauch

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

**RESUMEN.** Un grupo de ratas macho Holtzman de tres meses de edad fue bilateralmente castrado (TX). Otro grupo igual (control) fue sometido a operación simulada. La alimentación fue ad libitum para el grupo control y restringida para el TX. A los 30, 60, 90, 120 y 150 días de la castración se seccionó un segmento de cola a todas las ratas. A los 150 días se realizó densitometría mineral ósea (BMD) a todos los animales, se sacrificaron y se extrajeron los fémures izquierdos. En los huesos de la cola (HC) y en los fémures se determinaron las cenizas y las concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Na}^+$ . En los HC, a los 30 días disminuyeron las cenizas y la concentración de  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ , ( $p < 0,05$ ) en las ratas TX. A los 60 días las cenizas y todos los iones analizados habían disminuido ( $p < 0,05$  y  $p < 0,025$ ) en las ratas TX, descenso que se profundizó más adelante. Las disminuciones más significativas en los HC se observaron para el  $\text{Ca}^{++}$  a los 90 días ( $p < 0,005$ ); para las cenizas a los 120 días ( $p < 0,005$ ); para el fosfato, el  $\text{Mg}^{++}$  y el  $\text{Na}^+$  a los 150 días ( $p < 0,005$ ).

A los 150 días las cenizas y las concentraciones de los iones analizados no mostraron diferencias estadísticamente entre los HC y los fémures. La BMD a los 150 días disminuyó en el grupo TX ( $p < 0,05$ ). No hubo diferencias estadísticas entre los pesos corporales de los dos grupos de ratas durante toda la experiencia.

Los resultados sugieren que en ratas macho castradas a los tres meses de edad, los contenidos de calcio, fosfato, magnesio y sodio y las cenizas en HC son buenos indicadores de la pérdida de masa ósea, a partir de los 30 y 60 días de la castración. Además, a los 150 días la desmineralización ósea se refleja cuantitativamente igual en fémur que en HC, y el descenso en la concentración de los iones óseos sería mejor indicador de pérdida de masa ósea que la disminución de BMD.

**Palabras clave:** Ratas macho, castración, huesos, calcio, fosfato, magnesio, sodio, cenizas.

**SUMMARY.** Variations in the contents of calcium, phosphate, magnesium and sodium in bones of castrated male rats. Bilateral castration (TX) or sham surgery -respectively- was performed in two groups of twelve male Holtzman rats, 90 days old. Food was available ad libitum to sham-operated rats, and it was restricted to TX ones. After castration, at 30, 60, 90, 120 and 150 days, a segment of the tails was sectioned. At 150 days all rats were subjected to bone mineral densitometry (BMD), sacrificed and the left femurs excised. With the tail's bones (TB) and the femur we determined ash and the concentration of  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  and  $\text{Na}^+$ . In the TB, at 30 days the ash and the concentrations of  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{PO}_4^{-3}$ , decreased ( $p < 0,05$ ) in the TX rats. At 60 days the ash and all analysed ions were reduced ( $p < 0,05$  and  $p < 0,025$ ) in the TX rats. The decreases were major forward. The more significative decreases in the TB were: in  $\text{Ca}^{++}$  at 90 days ( $p < 0,005$ ); in the ash at 120 days ( $p < 0,005$ ); in  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  and  $\text{Na}^+$  at 150 days ( $p < 0,005$ ).

All ions' concentrations and the ash were statistically equal between the TB and the femurs after 150 days of castration. At the same time, the BMD was significantly less ( $p < 0,05$ ) in the TX rats. The body weigh of the two group was statistically equal during the 150 days. Our results suggest that in 90 days old castrated male rats, the ash and the concentration of calcium, phosphate, magnesium and sodium in the TB are good indicators of bone mass loss, after 30 and 60 days of castration. Besides, 150 days post castration, the ash and the analysed ions are equal in the femur and in the TB. Moreover, the ions' concentrations were better indicators of the bone mass loss than the BMD.

**Key word:** Male rat, castration, bone, calcium, phosphate, magnesium, sodium, ash.

### 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 (1,2).

La mayor cantidad de investigaciones sobre esta enfermedad se ha realizado en mujeres o en el modelo animal, la rata ovariectomizada (3-5).

En ambos sexos, a partir de los 30 ó 40 años la masa ósea comienza disminuir, continuando el resto de la vida (6). La abrupta baja de esteroides sexuales en la mujer menopáusica -principal causa de la pérdida de masa ósea-, no se produce en el hombre. En éste los andrógenos disminuyen lentamente con la edad y el pico máximo de densidad mineral ósea alcanzado en la juventud es mayor que en la mujer (7). Un nivel máximo de masa ósea disminuido en el hombre aumenta el riesgo de osteoporosis en la madurez, contribuyendo con la edad la baja de testosterona, de andrógenos corticales, de la hormona de

crecimiento, del factor 1 de crecimiento similar a insulina, así como también las enfermedades debilitantes (8). La masa ósea en el hombre disminuye en forma acentuada después de los 50 años de edad, pero a partir de los 30 ó 40 años comienza la caída de los marcadores óseos séricos en relación directa con la caída del índice de andrógenos libres (testosterona sérica/globulina unida a hormonas sexuales) (9). La osteoporosis secundaria -la mayor parte de los casos de osteoporosis masculina-, es causada principalmente por: déficit androgénico, hipogonadismo, terapia con corticoides, alcoholismo crónico, escasa actividad física, baja ingesta de calcio, baja ingesta de vitamina D o escasa exposición al sol, y en menor cantidad de casos por hipertiroidismo severo, osteomalacia, uso de anticólvulsivantes y exceso de nicotina (2,10,11).

La osteoporosis primaria suele asociarse a hiper calciuria, bajos niveles séricos de 25-hidroxivitamina D, elevación parathormona y bajo umbral renal para la excreción de fosfato (2).

Ongphiphadhanakul y col (12), encuentran una relación entre la disminución de la densidad mineral ósea (BMD), la baja de testosterona libre en sangre (no de testosterona total) y el aumento de LH y FSH séricas. Asimismo, muestran una disminución de testosterona sérica total en correlación con el aumento de grasa en los hombres -seguramente por mayor aromatización a estrógenos-, sugiriendo que el aumento de peso protege contra la pérdida de masa ósea. Morishima (13), estudiando deficiencias genéticas de aromatasa, confirma la presencia de esta enzima en hueso y sugiere que los estrógenos son los mayores responsables del balance positivo del calcio óseo aun en hombres.

Naves Días y col (14) en un estudio en 14.237 sujetos de ambos sexos mayores de 50 años (no alcohólicos), encuentran que no existe una relación detectable entre la frecuencia de ingestión de alcohol y las deformidades vertebrales. Según este estudio, en los hombres de mayor edad un consumo moderado de alcohol 5 días por semana reduciría el riesgo de fracturas de vértebras. En cuanto a los tratamientos de la osteoporosis, con diferentes resultados se utilizan bifosfonatos, agentes anabólicos como nandrolona, fluoruro (15,16), testosterona (17), calcitonina, 1,25-dihidroxivitamina D inyectable (18) y factor 1 de crecimiento similar a insulina (19).

En cuanto a la prevención de la osteoporosis lo recomendado es incrementar la actividad física, normalizar la ingesta de calcio y vitamina D, la exposición regular al sol, suspender antiácidos alcalinos, no fumar y evitar el alcoholismo (6).

La importancia de algunos de los factores mencionados la demuestran Spindler y col (20) quienes encontraron que en personas con baja ingesta de calcio, pero con mucha actividad física y exposición al sol, la BMD fue mayor en fémur e igual en la columna lumbar que en sujetos con ingesta normal de calcio y vitamina D, pero con menor actividad física y menor exposición al sol. A diferencia del modelo de rata ovariectomizada para el estudio de la pérdida de masa ósea

posmenopáusica femenina, no existe un modelo consolidado similar para la osteoporosis masculina. Most y col (21) demostraron en ratones machos, que la orquidectomía aumenta la osteoclastogénesis asociada a una resorción ósea aumentada. Wink y col (22) observaron, a los 4 meses de la castración, disminución de la densidad ósea femoral, de cenizas y de hueso seco en ratas macho castradas a la edad de un año, pero no en las castradas a los 23 días de edad. Gürkan y col (23) castraron ratas macho de seis meses de edad, y entre las 6 y 12 semanas posteriores no encontraron diferencias en el peso ni en el contenido de calcio e hidroxiprolina en los huesos, pero sí un incremento en la calcitonina sérica a las 10 semanas.

Danielsen y col (24) castraron ratas macho a los 9 meses, y a los 180 días de la castración observaron una disminución de la masa ósea, sugiriendo que la castración reduce la formación de hueso y aumenta la resorción del mismo, afectando la composición y la calidad del hueso cortical. Grynpas y col (25), castraron ratas macho a los 8 y 24 meses de edad, encontrando 4 meses después que el contenido mineral óseo es afectado en los animales castrados a los 8 meses de edad pero no en los castrados a los 24. Esto nos indica que una vez sobrepasada cierta edad del animal, la disminución fisiológica de andrógenos que ocurre hace que la castración no produzca suficiente diferencia de testosterona con respecto a las ratas intactas. Schot y Schuurs (26) analizan la etiología de la pérdida de masa ósea provocada por la deficiencia de hormonas sexuales en la rata, sugiriendo que los esteroides sexuales inhiben la parathormona (PTH) y la castración produce una sensibilidad alterada del hueso a la PTH. Además encuentran cambios en la concentración sanguínea de PTH y de calcitonina después de la castración. Kapitola y col (27), trabajando con ratas macho, encontraron una disminución de la densidad ósea y de las cenizas óseas después de la castración. Además al inyectar testosterona encontraron que, aunque inconstantemente, se revierten esas alteraciones.

Del análisis de la abundante bibliografía sobre el tema -en algunos casos contradictoria- y en base a nuestra propia experiencia (28), el objetivo de este trabajo fue el estudio de la variación de las cenizas y las concentraciones de los iones inorgánicos más abundantes en hueso: calcio, fosfato, magnesio y sodio después de la castración en ratas macho. Además, analizamos las cenizas y los iones mencionados en huesos de cortes sucesivos de la cola de las mismas ratas comparándolos a resultados en el fémur y a la densitometría mineral ósea. Todo esto con la intención de estudiar el efecto de la falta de andrógenos testiculares sobre la masa mineral ósea y de postular un modelo animal para el estudio de la osteoporosis masculina.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron dos grupos de 12 ratas macho Holtzman de tres meses de edad y un peso medio de 273 g (D.E.=25). En el día cero las 12 ratas del grupo TX fueron bilateralmente

castradas usando éter para anestesia. Al grupo control se lo sometió a operación simulada.

Cualitativamente se les dio la misma alimentación a los dos grupos: alimento balanceado *Cargill* conteniendo proteínas mínimo 24%, grasas en extracto etéreo mínimo 6%, fibra cruda máximo 7%, calcio 1%, fósforo 0,5%, cloruro de sodio 0,5%, magnesio 0,05%, humedad máxima 13%, vitamina D 300 UI/100 g con un valor energético de 2.780 cal/g.

Cuantitativamente a las ratas controles se les dio alimento ad libitum y a las TX se les restringió el alimento a 15,5 g/rata/día, para evitar la diferencia de peso que se produce cuando consumen la misma cantidad de alimento. El consumo promedio de los controles fue de 17 g/rata/día. El agua se dio ad libitum a los dos grupos. Los animales fueron colocados en jaulas grandes, tres en cada una, con condiciones de temperatura controladas ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y con un ciclo luz/oscuridad de 12 h/12 h (luz desde 0700 a 1900 h).

Cada 15 días se pesaron las 24 ratas. A los 30, 60, 90, 120 y 150 días se seccionó un segmento de cola a cada una, bajo anestesia de éter etílico. A los 150 días se realizó densitometría mineral ósea a todos los animales, luego fueron sacrificados y el fémur izquierdo de cada uno fue extraído. La castración fue confirmada por la falta de tejido testicular después del sacrificio. Los huesos de la cola y los fémures fueron totalmente descarnados, secados 12 hs. a  $100^\circ\text{C}$  y pesados. Este se denominó peso de hueso seco.

Luego todos los huesos fueron llevados a cenizas (12 hs. a  $600^\circ\text{C}$ ) y pesados (peso cenizas, expresión de la parte mineral). A este peso fueron referidas las concentraciones de los iones. Las determinaciones de calcio, magnesio y sodio se hicieron en extractos de HCl por espectrometría de absorción atómica (29); y la de fosfato por espectrometría de absorción molecular, por formación de un complejo fosfomolibdato (30). Es necesario destacar que la determinación de los iones y de las cenizas en los fémures se realizó sólo a los 150 días poscastración, momento del sacrificio de todos los animales.

La BMD de todo el esqueleto de las ratas fue medida por absorciometría de energía dual de rayos X (31). El densitómetro utilizado fue un Lunar DP3 Dual Photon-Densitometer, modelo GD1, versión 2.2.

En las figuras se grafican las medias con las D.E. El análisis estadístico se realizó utilizando el test t de Student y valores de p menores a 0,05 fueron considerados significativos. Los valores de los parámetros estudiados en las ratas TX se comparan con el grupo control.

#### Lista de abreviaturas (en orden de aparición)

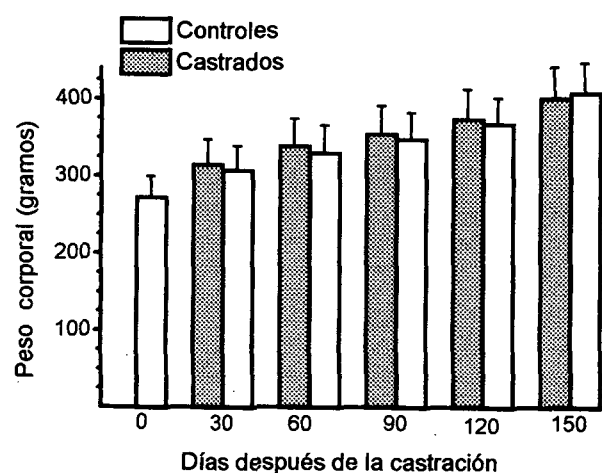
- TX: grupo de ratas macho bilateralmente castrado.
- Controles: grupo de ratas macho con operación simulada.
- BMD: densitometría mineral ósea.
- HC: huesos de la cola.
- TB: tail's bones.

## RESULTADOS

Los pesos corporales (Figura 1) de las ratas TX evolucionaron en forma similar a las controles, no observándose durante los 150 días de la experiencia una diferencia significativa entre los dos grupos.

FIGURA 1

Pesos corporales de ratas macho castradas



La concentración de calcio (Figura 2) en los huesos de la cola disminuyó significativamente en las ratas TX a partir de la muestra de los 30 días ( $p < 0,05$ ), aumentando la diferencia a los 60 y 90 días ( $p < 0,005$ ). Esa diferencia fue algo menor a los 120 y 150 días ( $p < 0,01$ ).

La concentración de fosfato (Figura 3) en los huesos de la cola disminuyó significativamente en las ratas TX a partir de los 30 días ( $p < 0,05$ ). La disminución aumentó con el tiempo poscastración, llegando a ser la máxima ( $p < 0,005$ ) a los 150 días.

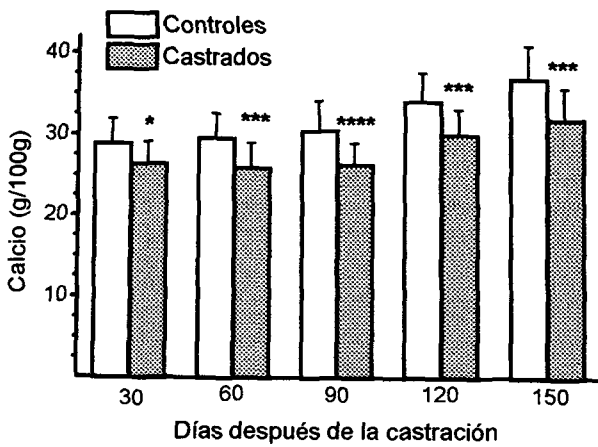
La concentración de magnesio (Figura 4) en los huesos de la cola disminuyó significativamente en las ratas TX a partir de los 60 días ( $p < 0,025$ ). La diferencia fue aumentando con el tiempo poscastración hasta llegar a ser la máxima ( $p < 0,005$ ) a los 150 días.

La concentración de sodio (Figura 5) en los huesos de la cola disminuyó significativamente en las ratas TX a partir de los 60 días ( $p < 0,05$ ). La disminución aumentó con el tiempo poscastración, llegando a ser la máxima ( $p < 0,005$ ) a los 150 días.

El peso de las cenizas (Figura 6) en porcentaje del peso de hueso seco -en huesos de la cola- sufrió una disminución

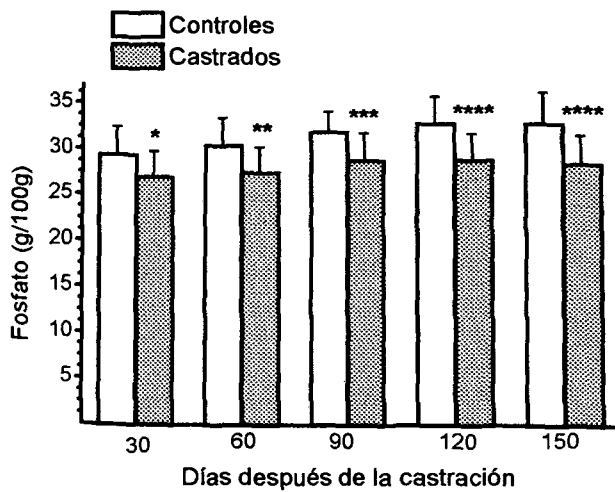
significativa en las ratas TX a partir de los 30 días ( $p < 0,05$ ), disminuyendo más a medida que aumentó el tiempo de poscastración, llegando a ser máxima a los 120 días ( $p < 0,005$ ).

FIGURA 2  
Calcio óseo en ratas macho castradas



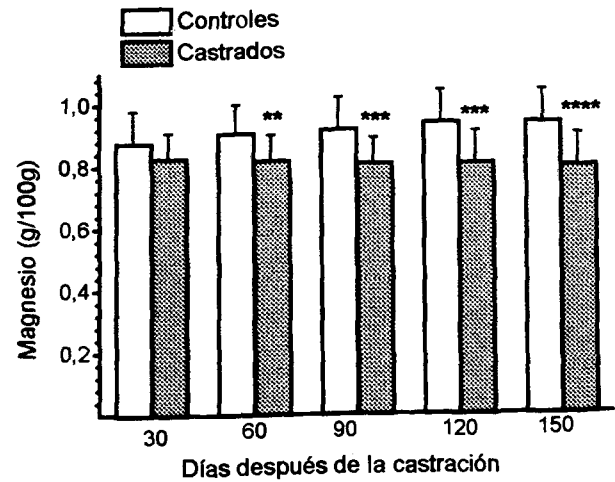
\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,005$

FIGURA 3  
Fosfato óseo en ratas macho castradas



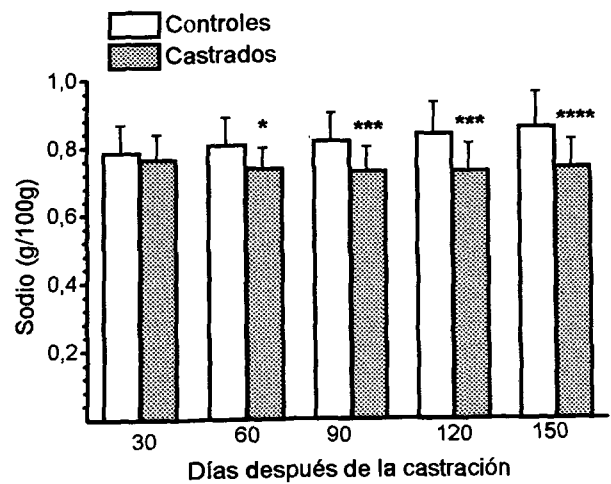
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,025$ ; \*\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,005$

FIGURA 4  
Magnesio óseo en ratas macho castradas



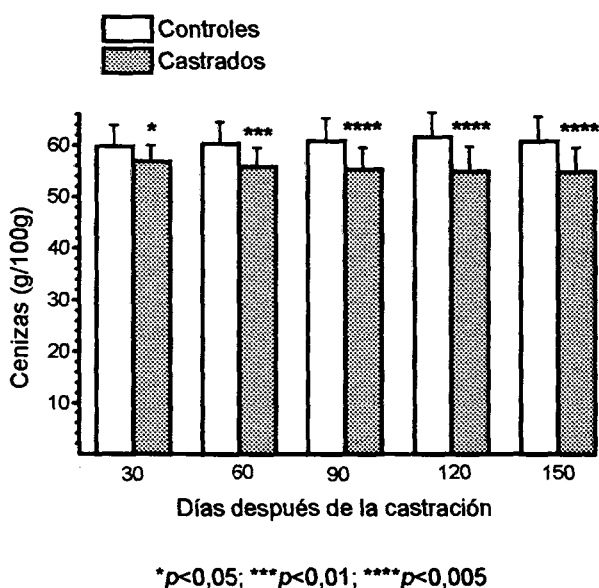
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,025$ ; \*\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,005$

FIGURA 5  
Sodio óseo en ratas macho castradas



\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,005$

FIGURA 6  
Cenizas de huesos de ratas macho castradas



A los 150 días de la castración el grupo de ratas TX tuvo una densidad mineral ósea (BMD) un 9,8% inferior a la BMD del grupo control, diferencia que fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Los valores de la concentración de los iones analizados y de las cenizas en los fémures a los 150 días postcastración fueron estadísticamente iguales a los encontrados en los huesos de la cola en ese tiempo. Por ello la diferencia entre las ratas TX y las controles en ese momento fueron iguales.

## DISCUSION

Realizamos las castraciones de las ratas macho a los tres meses de edad, por un paralelismo al modelo más aceptado en ratas hembras (32,33) y por considerar que a esa edad los animales están en su pico máximo de masa ósea. Consideramos que el momento elegido para la castración fue óptimo para evaluar la descalcificación por deficiencia de hormonas sexuales, en similitud a lo que se produce en hombres por la disminución paulatina de andrógenos a partir de los 30 ó 40 años (6,9). Además, se tuvieron en cuenta investigaciones anteriores que indican que en edades muy tempranas o muy tardías la castración en ratas macho no produce cambios óseos detectables (22,24,25). Por otro lado, el estudio se prolongó hasta 150 días después de la castración, de manera que terminó cuando las ratas tenían 8 meses de edad. Esto nos permitió presumir que en las ratas controles sin castrar, no habría hasta el final de la experiencia un déficit fisiológico significativo de andrógenos debido a su edad.

Con la restricción del alimento a las ratas castradas,

logramos neutralizar el aumento de peso que usualmente se produce con alimentos ad libitum en estos animales. De esta manera, durante todo el tiempo de la experiencia, se logró que los pesos de las ratas castradas y las controles no tuvieran diferencia significativa. Esto hace que los resultados obtenidos no estén modificados por la influencia protectora que el aumento de peso tiene sobre la desmineralización ósea (12).

La concentración de calcio en el alimento de las ratas fue 1g/100 g. En base a nuestras experiencias previas (28) consideramos que con esta concentración se cubren los requerimientos de calcio de estos animales y el pequeño exceso nos asegura que los resultados no estén influenciados por una eventual falta de ingesta de calcio en las ratas con alimento restringido.

Los valores de fosfato y cenizas en fémur encontrados son similares a los obtenidos por Yasui y col. (34) y por Kaye (35).

La concentración de calcio y fosfato y el porcentaje de cenizas en huesos de la cola evidenció una pequeña desmineralización a los 30 días de la castración. Esto es coincidente con otros estudios (23) que muestran que entre las 6 y 12 semanas de la castración los cambios óseos son poco significativos.

A los 60 días todos los iones analizados en huesos de la cola acusaron la desmineralización, que -salvo para el caso del calcio- tuvo su máximo a los 150 días después de la castración. En efecto, el comportamiento de las variaciones del calcio en los huesos de la cola fue diferente al de los otros iones analizados. Es posible que el hecho que a los 120 y 150 días postcastración la diferencia entre el calcio de las ratas TX y las controles haya sido algo menor que a los 90 días, sea debido a una baja fisiología de los andrógenos debida a la edad en las ratas controles. Otro factor que puede haber influido selectivamente en el calcio es el pequeño exceso de este catión en el alimento de los animales. De todas maneras, determinaciones de andrógenos y su eventual efecto diferencial sobre los iones óseos analizados serán motivo de futuros estudios.

En cuanto al comportamiento de las variaciones de los iones analizados en los huesos de la cola, se observa que sus concentraciones en las ratas TX no siempre disminuyen sino que se mantienen relativamente estables o incluso aumentan durante los 150 días. No obstante, esos mismos iones en los animales controles fueron aumentando de manera que la diferencia entre estos y los TX fue en general profundizándose con el tiempo postcastración, lo que en definitiva sugiere el efecto desmineralizante óseo de la castración.

A los 150 días las determinaciones de calcio, fosfato, magnesio, sodio y cenizas se realizaron en huesos de la cola y en fémur. Los resultados sugieren que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de los iones y el porcentaje de cenizas entre esas dos muestras óseas analizadas. Como consecuencia, la diferencia estadística del contenido de los iones estudiados y las cenizas entre los animales castrados y los controles fue la misma en huesos de la cola y en fémures. Esto indicaría que el contenido mineral en los huesos de la cola

es reflejo de la concentración mineral en los fémures en la rata, y que las variaciones provocadas a los 150 días de la castración son las mismas.

La densitometría mineral ósea realizada a los 150 días de la castración acusó una diferencia significativa entre las ratas castradas y sus controles. Esa diferencia fue estadísticamente menor que la encontrada en la concentración de los iones y cenizas óseas al mismo tiempo. Esto sugiere que la BMD es menos posible para detectar la desmineralización ósea que la determinación química del calcio, fosfato, magnesio, sodio y cenizas en los huesos de la cola o en el fémur.

Concluyendo, nuestros resultados permiten reafirmar que el contenido mineral de los huesos de la cola de rata es un buen indicador de la pérdida de masa ósea producida por la castración. Además, estos resultados sugieren a la rata macho castrada a los 3 meses de edad como un buen modelo para estudiar la osteoporosis producida por el déficit de andrógenos en el hombre. Destacamos que el uso de sucesivos cortes de la cola de las mismas ratas evita el sacrificio de grupos enteros de animales para cada determinación, además de permitir el estudio de la evolución de los parámetros en las mismas ratas, distinguiendo las variaciones individuales de las que se observan entre los individuos.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Universidad Nacional de San Luis por todo el apoyo brindado.

Al Centro de Reproducción Humana (CERHU) de la ciudad de San Luis y al Sr. Oscar Blázquez por la realización de la densitometría ósea.

#### REFERENCIAS

- Osteoporosis: Concensus Conference. *J Am Med Assoc.* 1984; 252:799-802.
- Peris P, Guañabens N, Monegal A, Suris X, Alvarez L, Martínez de Osaba MJ, Hernández MV, Muñoz-Gómez J. Aetiology and presenting symptoms in male osteoporosis. *Br J Rheumatol.* 1995; 34:936-41.
- Gallager JC. The pathogenesis of osteoporosis. *Bone Miner.* 1990; 9:215-227.
- Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991; 15:175-192.
- 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.* 1993; 52:26-33.
- Anónimo. Bone density measurement, a systematic review. A report from SBU, the Swedish Council on Technology Assessment in Health Care. *J Intern Med Suppl.* 1997; 739:1-60.
- Feik SA, Thomas CD, Clement JG. Age trends in remodeling of the femoral midshaft differ between the sexes. *J Orthop Res.* 1996; 14:4, 590-7.
- Seeman E. The dilemma of osteoporosis in men. *Am J Med.* 1995; 98:76S-88S.
- Wishart JM, Need AG, Horowitz M, Morris HA, Nordin BE. Effect of age on bone density and bone turnover in men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 42:141-6.
- Kelepouris N, Harper KD, Gannon F, Kaplan FS, Haddad JG. Severe osteoporosis in men. *Ann Intern Med.* 1995; 123:6, 452-60.
- Glynn NW, Meilahn EN, Charron M, Anderson SJ, Kuller LH, Cauley JA. Determinants of bone mineral density in older men. *J Bone Miner Res.* 1995; 10:11, 1769-77.
- Ongphiphadhanakul B, Rajatanavin R, Chailurkit L, Piaseu N, Teerarungsikul K, Sirisriro R, Komindr S, Puavilai G. Serum testosterone and its relation to bone mineral density and body composition in normal males. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43:6, 727-33.
- Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:12, 3689-98.
- Naves Diaz M, O'Neill TW, Silman AJ. The influence of alcohol consumption on the risk of vertebral deformity. *Osteoporos Int* 1997; 7:1, 65-71.
- Seeman E. Do men suffer with osteoporosis?. *Aust Fam Physician* 1997; 26:2, 135-43.
- Marcelli C. Secondary osteoporosis. *Rev Prat* 1995; 45:9, 1125-32.
- Reid IR, Wattie DJ, Evans MC, Stapleton JP. Testosterone therapy in glucocorticoid-treated men. *Arch Intern Med* 1996; 156:11, 1173-7.
- Seeman E, Tsalamandris C, Bass S, Pearce. Present and future of osteoporosis therapy. *Bone* 1995; 17:2 Suppl, 23S-29S.
- Johansson AG, Lindh E, Blum WF, Kollerup G, Sørensen OH, Ljunghall S. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I in men with idiopathic osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1, 44-8.
- Spindler A, Lucero E, Berman A, Paz S, Vega E, Mautalen. Bone mineral density in a native population of Argentina with low calcium intake. *J Rheumatol* 1995; 22:11, 2148-51.
- Most W, van der Wee-Pals L, Ederveen A, Papapoulos S, Löwik C. Ovariectomy and orchidectomy induce a transient increase in the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in the mouse. *Bone* 1997; 20:1, 27-30.
- Wink CS, Felts WJ. Effects of castration on the bone structure of male rats: a model of osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 1980; 32:1, 77-82.
- Gürkan L, Ekeland A, Gautvik KM, Langeland N, Rinningen H, Solheim LF. Bone changes after castration in rats. A model for osteoporosis. *Acta Orthop Scand.* 1986; 57:1, 67-70.
- Danielsen CC, Mosekilde L, Andreassen TT. Long-term effect of orchidectomy on cortical bone from rat femur: bone mass and mechanical properties. *Calcif Tissue Int.* 1992; 50:2, 169-74.
- Grynpas MD, Simmons ED, Carnes D, Gundberg C, Pritzker KP. Bone mineral in the castrated rat model of osteopenia. *J Orthop Res* 1987; 5:4, 586-91.
- Schot LP, Schuurs AH. Pathophysiology of bone loss in castrated animals. *Steroid Biochem Mol Biol* 1990; 37:3, 461-5.

27. Kapitola J, Kubícková J, Andrlé J. Blood flow and mineral content of the tibia of female and male rats: changes following castration and/or administration of estradiol or testosterone. *Bone* 1995; 16:1, 69-72.
28. De Bortoli M, Ascar J, Arce P, Villegas L. Variaciones en el contenido de calcio, fosfato, magnesio y sodio en huesos de ratas ovariectomizadas. *Arch Latinoamer Nutr* 1996; 46, 1:38-41.
29. Marczenko Z. Spectrophotometric determination of elements. New York. Ellis Howood Limited. Haloted Press, 1976; p. 421.
30. Colorimetric determination of non metals. New York. Boltz DF, Howell JA, Willeg J (eds). 1978; p. 346.
31. Jones G, Nguyen T, Sambrook PN, Lord SR, Kelly PJ, Eisman JA. Osteoarthritis, bone density, postural stability, and osteoporotic fractures: a population based study. *J Rheumatol* 1995; 22:5, 921-5.
32. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tiss Int* 1989; 45:360-366.
33. Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 1989; 124:7-16.
34. 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* 1991; 105:206-210.
35. 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* 1974; 53:256-269.

Recibido: 27-08-1997

Aceptado: 13-04-1998