

# Remodelamiento óseo: cambios en los marcadores de formación y resorción ósea en función de la edad y asociados a la caída en los niveles de estrógenos en ratas hembras

## Bone remodelling: age-related changes in markers of bone formation and resorption associated with falling oestrogen levels in female rats

ZENI CORONEL, EM<sup>1,2</sup>; BRYK, G<sup>1</sup>; BONANNO, MS<sup>1,3</sup>; SEIJO, M<sup>1,4</sup>; ZENI, SN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Hospital de Clínicas José de San Martín Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM). Laboratorio de Osteopatías Metabólicas. Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Argentina. <sup>2</sup>Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Bioestadística, Facultad de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Argentina. <sup>3</sup>Universidad de Buenos Aires. Facultad de Odontología. Cátedra de Histología y Embriología. Buenos Aires, Argentina. <sup>4</sup>Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Médicas. Segunda Cátedra de Microbiología. Buenos Aires, Argentina.

### RESUMEN

Los marcadores bioquímicos identifican el nivel del remodelamiento óseo. El objetivo fue determinar el porcentaje de cambio (%) de CTX, OCN y de la relación OCN/CTX en función de la edad y evaluar los cambios por deficiencia de E2 por ovariectomía (OVX) en ratas Wistar. Se determinó el porcentaje de cambio (%) respecto del nivel de recién nacidos de OCN, CTX y la relación OCN/CTX en animales de 21, 45, 60, 90, 105 y 150 días de vida (n=8/grupo). Ratas OVX y SHAM fueron alimentadas con dieta Comercial o con AIN-93M. La OVX se realizó a los 45 días de vida y se evaluó el cambio de la DMOTp (por DEXA) en ratas alimentadas con AIN-93M. Se compararon los niveles de OCN y CTX y relación OCN/CTX entre ambos grupos a los 90 y 105 días de vida. OCN aumentó y CTX mostró disminuciones progresivas con la edad, estabilizándose a los 90 días. La relación OCN/CTX alcanzó su máximo a los 90 días y disminuyó posteriormente. La OVX aumentó OCN en ratas alimentadas con AIN-93M y no varió con dieta comercial; CTX aumentó con ambas dietas. La OVX disminuyó la DMOTp respecto de los SHAM. Conclusiones: Los marcadores variaron con la edad y el aumento por OVX depende de la dieta, destacando la importancia del calcio, fósforo y su relación para la salud ósea. Los valores absolutos de OCN y CTX permitirían establecer niveles de referencia en ratas hembras alimentadas con dieta comercial.

**Palabras clave:** (marcadores óseos), (hipoestrogenismo), (ovariectomía), (absorción mineral)

Recibido: 14-03-2024

Aceptado: 30-12-2024

Correspondencia: Estefanía Magali Zeni Coronel ezenicoronel@fvet.uba.ar

<https://doi.org/10.62168/invet.v27i1.47>

## ABSTRACT

Biochemical markers identify the level of bone remodelling. The aim was to determine the levels of CTX, OCN and the OCN/CTX ratio as a function of age and to assess changes due to ovariectomy-induced oestrogen deficiency (OVX) in female Wistar rats. OCN and CTX were assessed and the OCN/CTX ratio was calculated in newborn, 21, 45, 60, 90, 105 and 150-day-old animals (n=8/group). The percentage change (%) from the newborn level was determined. OVX and SHAM rats were fed either Commercial diet or AIN-93M. OVX was performed at 45 days of age and proximal tibial BMD change (by DEXA) was assessed at 90 days in rats fed AIN-93M. OCN and CTX levels and OCN/CTX ratio were compared between the two groups at 90 and 105 days of age. OCN increased and CTX showed progressive decreases with age, stabilising at 90 days. The OCN/CTX ratio peaked at 90 days and decreased thereafter. OVX increased OCN in rats fed AIN-93M and did not vary with commercial diet; CTX increased with both diets. OVX decreased proximal tibia BMD relative to SHAM. Conclusions: Markers varied with age and the increase by OVX was diet-dependent, highlighting the importance of calcium, phosphorus and their relationship for bone health. Absolute values of OCN and CTX would allow establishing reference levels in female rats fed with commercial diet.

**Keywords:** (bone markers), (hypoestrogenism), (ovariectomy), (mineral absorption)

## INTRODUCCIÓN

El hueso es un órgano dinámico que se renueva constantemente mediante la resorción del tejido óseo envejecido (degradación) y la formación de nuevo tejido. Durante el crecimiento el proceso de resorción-formación no se encuentra acoplado; es decir, la formación de nuevo tejido puede producirse donde previamente no existió resorción ósea (modelamiento óseo), con lo cual el hueso crece en largo y ancho. Sin embargo, durante la etapa adulta, el proceso se encuentra acoplado (remodelamiento óseo), por lo cual la cantidad de tejido óseo resorbida iguala a la formada, asegurando el mantenimiento de la masa ósea.

Tanto el modelamiento como el remodelamiento óseo son llevados a cabo por la actividad de las células óseas reunidas en grupos celulares denominados unidades de remodelamiento óseo (UROs). Los osteoclastos degradan el hueso y los osteoblastos forman el nuevo tejido. La actividad de las células óseas de todas las UROs pueden evaluarse bioquímicamente mediante los marcadores de remodelamiento óseo. Estos se diferencian en los de resorción, como el telopéptido C-terminal del colágeno de tipo I (CTX-I) y la deoxipiridinolina (DPyr) y los de formación como la osteocalcina (OCN), la fosfatasa alcalina ósea (FAO) y el propéptido del colágeno tipo I amino-terminal (P1NP)<sup>7,24</sup>. Los marcadores

bioquímicos de remodelamiento óseo permiten evidenciar cambios tempranos en el metabolismo óseo (en el humano de 1-3 meses), a diferencia de la medición de la densidad mineral ósea (DMO) que requiere tiempos más prolongados (en el humano 1-2 años).

El proceso de resorción es mucho más rápido que el de formación (12 días frente a 30 días); por consiguiente, todo factor que afecte el remodelamiento óseo dará lugar a una pérdida paulatina de masa ósea. La deficiencia estrogénica que se produce en la menopausia es la causa principal de pérdida de hueso y, en el tiempo, puede dar lugar a osteopenia/osteoporosis<sup>7</sup>. Si bien el diagnóstico de osteopenia/osteoporosis se evalúa mediante densitometría, los marcadores bioquímicos permiten identificar un elevado remodelamiento, posibilitando el inicio de intervenciones terapéuticas destinadas a evitar una mayor pérdida del hueso<sup>4</sup>. Para determinar que el remodelamiento óseo se encuentra elevado es indispensable contar con valores de referencia.

Es conocido que el nivel de remodelamiento óseo sigue una distribución paralela a los cambios observados en la velocidad de crecimiento, y por lo tanto los niveles de los marcadores óseos se ven modificados en las distintas etapas de la vida.

En base a ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar longitudinalmente los cambios en el remodelamiento por efecto de la edad (nacimiento hasta adultez tardía) así como los inducidos por deficiencia estrogénica. Para ello se determinaron los marcadores de remodelamiento OCN, CTX y la relación OCN/CTX en ratas hembras. Asimismo, evaluamos las variaciones en dichos marcadores y la relación OCN/CTX ante la deficiencia de estrógenos inducida por ovariectomía (OVX), a dos tiempos post-OVX diferentes tratando de emular una postmenopausia temprana y tardía.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Dietas utilizadas

1. *Dieta comercial o stock*. La dieta comercial fue utilizada en forma de pellets (Cooperación SA, Argentina) y según las especificaciones del fabricante aporta niveles variables de proteínas, de Ca (1,0-1,4%) y fosfato (Pi) (0,5-0,8%).

2. *Dieta experimental semisintética*. La dieta semisintética fue formulada de acuerdo a las recomendaciones del American Institute of Nutrition (AIN) del año 1993<sup>17, 21</sup> de mantenimiento (AIN-93M) que establece los estándares nutricionales para roedores adultos. Su composición se detalla en Tabla 1.

**Tabla 1:** Composición de las dietas control utilizadas según AIN'93-M que es la dieta recomendada para animales adultos.

DIETA	AIN'93-M
Energía (Kcal)	~380
Proteína (g) (Nx 6,25)	12,5
Lípidos (g)	4,0
Mezcla de minerales* (g)	3,5
Vitaminas** (g)	1,0
Colina (g)	0,1
L-Cistina (g)	0,37
Celulosa (g)	5,0
Dextrina ***	hasta completar 100g

\* Mezcla de minerales según recomendación AIN'93, \*\*Vitaminas hidro y liposolubles (componentes individuales de Sigma, Missouri, USA), \*\*\* Dextrina de maíz, agregada como fuente de carbohidrato para alcanzar 100g de dieta.

### Animales y condiciones de alojamiento

El estudio fue realizado en ratas (*Rattus norvegicus*) hembras de la cepa Wistar, provenientes del Laboratorio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA). En todos los diseños experimentales, el alojamiento se realizó utilizando jaulas abiertas con piso de malla de acero inoxidable. Los animales fueron mantenidos bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h c/u, con una temperatura ambiente de 21±1 °C y una humedad relativa del 50-60 %. Se permitió el libre acceso a la comida y al agua<sup>6, 16</sup>. Finalizados los tiempos experimentales, los animales fueron eutanasiados siguiendo las directrices AVMA

edición 2020<sup>13</sup>. Al final de cada uno de los tiempos experimentales, se procedió a la eutanasia bajo anestesia profunda con la combinación de 100 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Holliday-Scott SA, Argentina) más 15-20 mg/kg de clorhidrato de xilacina (Xilacina, Lab Richmond Div. Veterinaria SA, Argentina). Ambos fármacos se administraron vía intraperitoneal (IP). Al constatar la anestesia profunda (ausencia de reflejos podal y ocular), se realizó la punción cardíaca para obtención de sangre por exanguinación. Posteriormente (sin sacar la aguja) se administró Euthanyle intra cardíaco (Brouwer S.A., Argentina) (pentobarbital 0,08 g/difenilhidantoína 0,01 g).

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Río Negro (Certificado CICUAL UNRN N° 002/2023) y de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (Res. CS. 4081/04; 0074160/2017).

### Diseños experimentales

*Efecto de la edad.* El protocolo fue realizado utilizando animales normales de diferentes edades (n=8/grupo): recién nacidos (RN), al destete (R21), al inicio de la madurez sexual (R45), adultas jóvenes de 60 días de vida (R60), adultas en diferentes periodos de adultez: 90 días (R90); 105 días (R105) y 150 días de vida (R150). Los animales fueron alimentados con dieta comercial y a las edades mencionadas se les extrajo sangre por punción cardíaca bajo anestesia total.

*Efecto de la deficiencia estrogénica inducida por ovariectomía.* Un grupo de 16 animales de 45 días de vida fueron sometidos a una ovariectomía (OVX) bilateral, bajo anestesia general [0.1mL/100g PC de clorhidrato de ketamina (Holliday-Scott SA, Argentina) más 0.025ml/100g PC de clorhidrato de xilacina (Xilacina, Lab Richmond Div. Veterinaria SA, Argentina)]<sup>8, 12</sup>. Los animales fueron sacrificados a los 45 y 60 días post OVX correspondientes a los 90 y 105 días de vida del animal (n=8/ grupo), dando lugar a los grupos R90 OVX y R105 OVX, respectivamente. Otro grupo de 16 animales fueron sometidos a una operación simulada (SHAM), exponiendo los ovarios sin realizar la extirpación de los mismos. Estos animales fueron sacrificados a los mismos tiempos que los animales OVX, dando lugar a los grupos R90 SHAM y R105 SHAM. Los 32 animales fueron alimentados desde la OVX hasta la eutanasia con AIN93M.

Otro grupo de 32 animales fueron sometidos al mismo procedimiento de OVX y operación simulada SHAM, pero en este caso todos los animales fueron alimentados con la dieta comercial durante todo el periodo experimental. Este estudio fue realizado con el objeto de comparar el efecto de la OVX y la alimentación.

A los 90 y 105 días de vida se extrajo sangre por punción cardíaca. Con el objeto de validar el modelo de la pérdida de masa ósea por efecto de la OVX, el grupo alimentado con la dieta confeccionada de acuerdo a AIN'93M fue sometido a una densitometría ósea, bajo anestesia total. A partir de la imagen del animal en la pantalla se

evaluó la DMO de tibia proximal (región donde predomina el hueso trabecular de alto recambio) y se calculó el cambio en su valor entre el sacrificio y el momento de la OVX.

### Determinaciones bioquímicas séricas

El suero fue separado por centrifugación a 3500 RPM durante 10 min y se guardó a -18 °C hasta su análisis. OCN y CTX fueron determinados mediante la metodología de ELISA utilizando kits comerciales de MyBioSource (USA)<sup>1, 24</sup>. Este ensayo se basa en la técnica de inmunoensayo enzimático tipo sandwich. En el caso de la osteocalcina (OCN), el principio del ensayo implica el uso de una placa de microtitulación pre-revestida con un anticuerpo específico para la osteocalcina. Los estándares o muestras se añaden a los pocillos correspondientes, seguidos por la adición de un anticuerpo biotinilado específico para la osteocalcina. Posteriormente, se añade Avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés, Horseradish Peroxidase) a cada pocillo y se incubaba. La reacción enzimática se visualiza mediante la adición del sustrato TMB, lo que genera un cambio de color en aquellos pocillos que contienen osteocalcina, anticuerpo biotinilado y Avidina conjugada con la enzima. La reacción se detiene con la adición de ácido sulfúrico, y el cambio de color se mide espectrofotométricamente a 450 nm ± 10 nm. La concentración de osteocalcina en las muestras se determina comparando la densidad óptica (OD) de las muestras con la curva estándar. Sensibilidad 6.3 pg/mL. CV% intra ensayo ≤ 8% e inter ensayo ≤ 10%. En el caso del CTX, el ensayo también emplea la técnica de ELISA tipo sándwich, utilizando un anticuerpo monoclonal pre-revestido anti-ratón específico para CTX como anticuerpo de captura, mientras que el anticuerpo de detección es un anticuerpo policlonal biotinilado. Las muestras y los anticuerpos biotinilados se añaden a los pocillos y, tras un lavado con PBS o TBS, se añade un conjugado de Avidina-peroxidasa. El sustrato TMB se utiliza para la detección del color, el cual se forma a partir de la actividad peroxidasa, generando un producto azul que, tras la adición de stop solution, se vuelve amarillo. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad del analito presente en la muestra. Sensibilidad 0.05 ng/ml. Coeficiente de precisión intraensayo ≤ 8 % e interensayo ≤ 12 %. La relación OCN/CTX fue calculada.

### Determinaciones densitométricas

Con el objeto de evaluar la efectividad del modelo experimental de pérdida de masa ósea por OVX se realizó una densitometría ósea con un equipo de absorciometría dual de rayos X (DXA) equipado con un software específicamente diseñado para pequeños animales (DPX Alpha, Lunar Corp, Madison, WI)<sup>2, 9, 25</sup>. A partir de la imagen sobre la pantalla se determinó la DMO de la tibia proximal (TP) al momento de OVX y al final de la experiencia delimitando la región de interés (ROI). Todas las ratas fueron escaneadas con un procedimiento idéntico. La precisión del ensayo se obtuvo mediante cinco mediciones repetidas en un mismo día y en diferentes jornadas. El coeficiente de variación de la DMO de la tibia proximal fue del 3,5 %<sup>11</sup>.

### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desvío estándar (DE). La normalidad de las variables fue evaluada mediante el test de Shapiro-Wilks y la homogeneidad de varianzas mediante el Test de Levene. Los datos normales fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y aquellos que no presentaron distribución normal mediante el test de Kruskal-Wallis. Cuando se constató la diferencia entre los distintos grupos se aplicó el test de Bonferroni "a posteriori" para determinar entre cuáles de aquellos se encontraban diferencias significativas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Software Infostat (versión libre). Un  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

### RESULTADOS

En el presente estudio se estimó la variación biológica de OCN y CTX como marcadores de formación y resorción respectivamente, así como

la variación en la relación OCN/CTX como un índice que refleja el balance existente entre el marcador de formación y de resorción y, en definitiva, el balance entre ambos procesos del remodelamiento óseo.

### Efecto de la edad

La Tabla 2 muestra los cambios porcentuales respecto del valor al nacimiento de los marcadores de remodelación ósea OCN y CTX. Los porcentajes de cambio de OCN mostraron un aumento estadísticamente significativo al destete y los 45 días de vida ( $p < 0,05$ ); asimismo dicho aumento porcentual mostró diferencias significativas entre estos dos grupos ( $p < 0,05$ ). El cambio porcentual continuó aumentado significativamente a los 60 y 90 días de vida ( $p < 0,05$ ), pero estos dos grupos no mostraron diferencias significativas entre ellos. A partir de los 105 días se observó una significativa disminución en el cambio porcentual de los niveles de OCN ( $p < 0,05$ ) que se acentuó aún más a los 150 días de vida ( $p < 0,05$ ).

El porcentaje de cambios del marcador de resorción (CTX) a partir del destete fue negativo y continuó disminuyendo significativamente a los 45, 60 y 90 días de vida ( $p < 0,05$ ), mostrando cambios significativos en cada una de estas edades respecto de la anterior ( $p < 0,05$ ). Los grupos de 105 y 150 días de edad mostraron el mismo cambio porcentual que el observado a los 90 días, delimitando un nivel máximo de disminución porcentual a esta edad.

Los cambios en función de la edad observadas en los niveles del marcador de formación OCN y de resorción CTX modificaron la relación OCN/CTX. En este sentido, la relación aumentó significativamente con la edad hasta alcanzar su nivel máximo a los 90 días, para disminuir significativamente a los 105 días y mantener dicho valor hasta los 150 días de vida.

**Tabla 2.** Cambios porcentuales en los niveles de marcadores de remodelamiento: respecto del grupo RN (recién nacido).

GRUPO	21 días	45 días	60 días	90 días	105 días	150 días
% de cambio OCN (ng/mL)	22,79 $\pm$ 0,103A	36,14 $\pm$ 0,008C	61,04 $\pm$ 0,152B	54,62 $\pm$ 0,013B	33,33 $\pm$ 0,002C	22,99 $\pm$ 0,01A
% de cambio CTX (pg/mL)	-15,97 $\pm$ 6,03A	-37,43 $\pm$ 1,73B	-43,74 $\pm$ 0,77B	-63,776 $\pm$ 0,93C	-63,298 $\pm$ 4,07C	-64,48 $\pm$ 0,03C
Rel OCN/CTX	0,043 $\pm$ 0,012A	0,065 $\pm$ 0,018B	0,085 $\pm$ 0,013B	0,127 $\pm$ 0,009C	0,108 $\pm$ 0,019D	0,103 $\pm$ 0,00D

Resultados expresados como (media  $\pm$  DE), Rel OCN/CTX: cociente entre valor promedio sérico de OCN y valor promedio sérico de CTX para cada grupo. Letras diferentes indican un  $p < 0,05$ .

### Efecto de la deficiencia estrogénica inducida por OVX

La Tabla 3 muestra los niveles de CTX y OCN a los 45 días de OVX (90 días de vida) y a los 60 días post-OVX (105 días de vida) y la tabla 4 el porcentaje relativo de cambio entre animales OVX y SHAM a los dos tiempos estudiados. Los niveles de OCN de los alimentados con la dieta comercial no mostraron cambios significativos a los dos tiempos estudiados (Tabla 3A). Como consecuencia, el porcentaje relativo de cambios entre animales SHAM y OVX fue mínimo a tiempos estudiados (Tabla 4A) contrariamente los animales alimentados con la dieta recomendada para roedores (AIN 93M) mostraron cambios significativos en la OCN a los dos tiempos post-OVX evaluados ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3B). El cambio porcentual para OCN a los 90 días fue, en promedio de 30 % mientras que a los 105 días fue de 47 % (Tabla 4B).

Los niveles de CTX de los animales alimentados con la dieta comercial no mostraron cambios entre los grupos OVX y SHAM a los 90 días y se produjo un aumento significativo a los 105 días (Tabla 3A). La diferencia no significativa en los niveles de CTX dio lugar a cambios relativos entre los animales SHAM y OVX de alrededor del

10 % (Tabla 4A). En los animales alimentados con la dieta AIN 93M, el CTX mostró un aumento de aproximadamente el doble a los 90 días de vida ( $p < 0.05$ ); cambio que se redujo notable a un valor estadísticamente significativo a los 105 días ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3B). Estas variaciones del CTX a los 90 días entre los animales SHAM y OVX dieron lugar a aumentos relativos significativos entre ambos grupos que alcanzó el 99 % a los 90 días, para reducirse a un 37 % a los 105 de vida (Tabla 4B).

Al comparar la variación del CTX entre los animales alimentados con la dieta comercial y la AIN 93M se observó que la variación de los animales alimentados con AIN93M fue positiva tanto a los 90 como a los 105 días de vida, lo cual evidencia el aumento en el remodelamiento por OVX. Contrariamente, en los animales alimentados con la dieta comercial el porcentaje de cambio porcentual fue negativo a ambos tiempos evaluados, mostrando variaciones más importantes en los marcadores que los producidos en los animales alimentados con la comercial. Estas diferencias son consecuencia de los diferentes niveles promedios tanto en animales SHAM como OVX por efecto del consumo de dos dietas diferentes.

**Tabla 3.** Niveles de los marcadores de remodelamiento y de la relación OCN/CTX en los animales SHAM y OVX alimentados con: A) con dieta Comercial y B) con AIN 93M, Osteocalcina (OCN); CrossLaps (CTX), Rel OCN/CTX: Relación OCN/CTX, Resultados expresados como media  $\pm$  DE, (\*):  $p < 0,05$  entre los grupos OVX y SHAM de la misma edad

Tabla 3A			
Grupo	CTX (pg/mL)	OCN (ng/mL)	Rel OCN/CTX
R90 SHAM	58,8 $\pm$ 5,6	4,00 $\pm$ 0,98	0,068 $\pm$ 0,028
R90 OVX	53,4 $\pm$ 4,3	4,08 $\pm$ 0,21	0,076 $\pm$ 0,021
R105 SHAM	56,7 $\pm$ 11,1	2,68 $\pm$ 0,06	0,047 $\pm$ 0,006
R105 OVX	48,9 $\pm$ 6,4 *	2,67 $\pm$ 0,08	0,055 $\pm$ 0,003
Tabla 3B			
Grupo	CTX (pg/mL)	OCN (ng/mL)	Rel OCN/CTX
R90 SHAM	20,7 $\pm$ 3,6	5,97 $\pm$ 0,72	0,288 $\pm$ 0,092
R90 OVX	41,2 $\pm$ 4,3*	8,20 $\pm$ 0,95*	0,199 $\pm$ 0,103*
R105 SHAM	21,5 $\pm$ 4,7	6,86 $\pm$ 0,41	0,319 $\pm$ 0,124
R105 OVX	28,1 $\pm$ 1,0	10,12 $\pm$ 2,61*	0,360 $\pm$ 0,154*

**Tabla 4:** Cambios porcentuales relativos en los niveles de marcadores de remodelamiento de animales OVX vs, SHAM, alimentados con dieta: A) comercial y B) AIN 93M, Resultados expresados como (media ± DE)

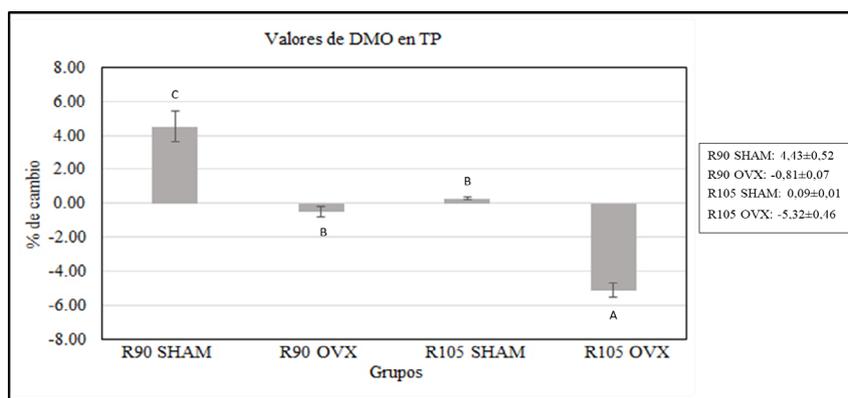
Tabla 4A		
GRUPO	90 días	105 días
% de cambio CTX (pg/mL)	-9,2±0,7	-13,8±0,6
% de cambio OCN (ng/mL)	1,90±0,51	-0,53±0,03

Tabla 4B		
GRUPO	90 días	105 días
% de cambio CTX (pg/mL)	99,0±21,2	37,4±12,7
% de cambio OCN (ng/mL)	30,72±5,81	47,53±17,33

La figura 1 muestra el éxito del modelo de pérdida de masa ósea por OVX. En este sentido, las barras muestran el cambio en la DMOtp de los animales SHAM y OVX entre el tiempo inicial, correspondiente al momento de la OVX y el tiempo final correspondiente a los 45 días (90

días de vida) ó 60 días (correspondiente a los 105 días) post-OVX. Mientras en los animales SHAM el cambio en la DMOtp a los dos tiempos evaluados fue positiva, en los animales OVX la variación fue negativa a los dos tiempos, evidenciando la pérdida de masa ósea por efecto de la OVX.



**Figura 1.** Cambios porcentuales en (%) DMO en tibia proximal de los grupos SHAM y OVX a los 90 y 105 días de vida alimentados con dieta AIN 93M, DMO: Densidad mineral ósea. Letras diferentes indican un p-valor<0,05

## DISCUSIÓN

El remodelamiento óseo es un proceso continuo, cíclico y bifásico de resorción del hueso envejecido y formación de hueso nuevo donde previamente se ha degradado el hueso viejo, llevado a cabo por la actividad de las células óseas. Este proceso, denominado remodelamiento óseo ocurre a lo largo de la vida<sup>17</sup>, en la mayoría de los vertebrados, incluyendo mamíferos, aves y reptiles, y se encuentra estrictamente regulado por diversos factores sistémicos y locales, entre

ellos nutricionales y niveles hormonales<sup>23</sup>. El aumento de masa ósea que se produce durante el periodo de crecimiento es el resultado de un proceso similar al remodelamiento, llamado modelamiento. En el humano este proceso se detiene al producirse el cierre del cartílago epifisario. La diferencia entre ambos es que si bien el remodelamiento produce hueso nuevo donde previamente se resolvió el hueso viejo, en el modelamiento puede sintetizarse hueso nuevo donde previamente no existió resorción. Este proceso permite el crecimiento en largo y ancho

del esqueleto que se produce hasta que se alcanza el denominado pico de masa ósea (PMO) que es la máxima cantidad de hueso que se puede alcanzar y que constituye el capital con que cuenta un individuo para hacer frente a la pérdida normal de hueso que ocurre con la edad. A partir de los 20 años, comienza una pequeña pero constante pérdida de masa ósea que se acelera en la mujer cuando ocurre la disminución de estrógenos que se produce en la menopausia<sup>5, 18, 19</sup>. Los estrógenos controlan el nivel de remodelamiento óseo, la caída en sus niveles acelera el recambio óseo pero como el proceso de resorción es más rápido que el de formación (en el humano 15 días presente a 3 meses) la aceleración del ciclo lleva a pérdida de masa ósea. Alrededor de los 70 años en el humano, el nivel de remodelamiento se iguala entre hombres y mujeres, reflejando una convergencia en los cambios del metabolismo óseo relacionados con el envejecimiento<sup>20, 22</sup>.

El 90 % de la masa ósea de un individuo está determinado por la genética del individuo, el 10 % restante puede ser modificado por diversos factores entre los que se encuentran la nutrición, las hormonas y el ejercicio<sup>5</sup>. Respecto de la nutrición, la ingesta de Ca, fósforo y magnesio constituye uno de los factores más importantes que influyen en PMO<sup>3, 5</sup>. Una baja ingesta de Ca puede disminuir el PMO por lo cual la pérdida que se produce en la edad adulta puede desencadenar una osteopatía metabólica, como osteopenia/osteoporosis en la cual se observa una masa ósea reducida y una microarquitectura trabecular alterada, lo que aumenta el riesgo de fracturas<sup>23</sup>.

La rata presenta algunas diferencias en el proceso de recambio óseo respecto del humano. Por un lado, la rata modela continuamente pero además la tasa metabólica es varias veces superior a la del humano. Este último hecho hace que el periodo de remodelamiento en la rata sea menor al del humano: 45-60 días vs. 21-22 días. En este último caso en el humano coincide con el segundo pico de crecimiento aproximadamente a los 12 años en el sexo femenino y los 14 años en el sexo masculino mientras que en la rata se logra aproximadamente a los 45 días de vida. Este último hecho no permite identificar ciertos cambios en el remodelamiento que se produce durante el crecimiento y que son visibles en el humano, como el segundo pico de crecimiento<sup>10</sup>. Sin embargo, el patrón de remodelamiento óseo es

similar en ambas especies es decir elevado durante las primeras etapas de crecimiento para disminuir notablemente durante la maduración esquelética. Como resultado de ello, los animales más jóvenes muestran tasas de actividad osteoblástica y osteoclástica significativamente más altas en comparación con las ratas maduras<sup>3, 26</sup>. En concordancia, los resultados del presente estudio muestran que los niveles del marcador de formación OCN se encuentran elevados en los animales jóvenes hasta aproximadamente los 60 días a partir del cual, los valores disminuyen a medida que las ratas envejecen. Los niveles del marcador de resorción CTX muestra un patrón similar a la OCN pero en este caso la disminución se produce alrededor de los 90 días de edad, luego de lo cual la caída porcentual se minimiza. Estos cambios porcentuales evidencian que los niveles de ambos marcadores alcanzan su punto máximo durante las primeras etapas de la vida y luego disminuyen gradualmente a medida que el crecimiento se desacelera<sup>27</sup>. Posteriormente se evidencia una disminución progresiva en la actividad de remodelamiento, consistente con los cambios esperados en las etapas de madurez y envejecimiento. Este cambio en la actividad de osteoblastos y osteoclastos inducen variaciones en el índice de remodelamiento evaluado por la relación OCN/CTX. Nuestros resultados evidencian un aumento del mismo hasta los 90 días para permanecer aumentados más adelante producto del continuo remodelamiento que existe en la rata.

La rata OVX es el modelo experimental de pérdida de masa ósea debido a la disminución de los niveles de estrógenos como ocurre en la menopausia<sup>12, 26</sup>. Los estrógenos regulan negativamente los niveles de citocinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ , ante la caída de estrógeno este control se pierde aumenta los niveles de estas citoquinas y con ello se acelera la remodelación ósea. Un análisis histopatológico en ratas Sprague Dawley luego de 12 semanas de OVX revela una disminución del grosor del hueso cortical, mientras que hacia el centro del hueso, el trabeculado óseo se encuentra muy desorganizado. Asimismo, la médula ósea presenta menor cantidad de tejido hematopoyético y mayor cantidad de tejido adiposo blanco<sup>26</sup>. Este efecto es concordante con un aumento en el remodelamiento óseo que conduce a la pérdida de

hueso trabecular y conexión trabecular con mayor depósito de grasa corporal. Se debe recordar que el hueso trabecular es metabólicamente más activo que el hueso cortical por lo cual contribuye en un 80 % al remodelamiento óseo total, en comparación con el 20 % del hueso cortical. Este predominio metabólico del hueso trabecular lo convierte en una de las primeras áreas afectadas por desequilibrios en el recambio óseo<sup>7, 4, 24, 26</sup>. En nuestro estudio la densitometría comparativa entre animales SHAM y OVX alimentados con la dieta recomendada para ratas adultas demuestra esta pérdida de masa ósea a nivel de la tibia proximal, compuesta principalmente por tejido trabecular con alto recambio. Este efecto es el resultado del remodelamiento aumentado que se evidencia por el marcador de resorción CTX luego de 45 días de OVX, mientras que los niveles del marcador de formación OCN no variaron significativamente. Si bien a los 60 días post-OVX los marcadores no se modificaron en las ratas OVX respecto de las SHAM, el aumento observado en etapas más tempranas evidenció la pérdida de masa ósea evaluada por densitometría. Nuestros resultados coinciden con los observados por otros autores<sup>3, 27</sup> donde las ratas OVX exhiben marcadores de recambio óseo aumentados, densidad mineral ósea disminuida y microarquitectura ósea alterada en comparación con los controles operados simuladamente.

Un hallazgo importante del presente estudio es que los cambios en el remodelamiento óseo por efecto de la OVX fue diferente de acuerdo al tipo de dieta consumida. Los animales alimentados con la dieta comercial no mostraron cambios significativos en los marcadores respecto de los animales SHAM a los dos tiempos post-OVX evaluados. Estos hallazgos podrían explicarse en base a que la dieta comercial aporta entre 2 y 3 veces la cantidad recomendada de Ca y el fosfato aumenta mucho menos, estos niveles modifican la relación adecuada de Ca a fosfato en la dieta necesaria para una correcta mineralización del esqueleto.

En este sentido, las guías internacionales recomiendan una relación Ca/P en la dieta de aproximadamente 1.1 a 1.2 y expresan que, en ratas hembras, una relación menor a la recomendada favorece el depósito de Ca en riñón, mientras que si la relación se eleva se afecta negativamente la mineralización<sup>14, 27</sup>. Según lo

indicado por el fabricante, la dieta comercial presenta una relación Ca/fosfato de 2 o aún mayor, lo cual afectaría el proceso de mineralización que también se encuentra regulado por las células óseas y cuya actividad da lugar al remodelamiento óseo. Nuestros resultados muestran niveles del marcador de resorción CTX menores tanto en los animales SHAM como OVX alimentados con la dieta recomendada respecto de los niveles en los alimentados con la dieta comercial lo que sugiere que la dieta afectó el remodelamiento óseo tanto en suficiencia como insuficiencia de estrógenos.

## CONCLUSIÓN

Los resultados del presente proyecto concuerdan con el hecho de que el remodelamiento y el índice de remodelamiento se modifica en función de la edad en forma similar al cambio en el metabolismo óseo que ocurre durante las distintas etapas de vida ensayadas. Los valores absolutos de OCN y CTX permitirían establecer niveles de referencia e intervalos para estos marcadores en ratas hembras alimentadas con dieta comercial. Asimismo, cuando los animales fueron alimentados con la dieta comercial que aporta niveles diferentes y superiores a los recomendados para el desarrollo normal, no fue posible observar el aumento en el remodelamiento óseo que se genera ante un menor nivel de estrógenos. Contrariamente, dicha diferencia se hizo visible cuando la alimentación fue la recomendada para animales adultos. Estas diferencias evidencian la importancia que presenta para la salud ósea tanto el consumo de Ca y fósforo como la relación Ca/P en la dieta.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bonucci, E.; Ballanti, P. Osteoporosis—Bone Remodeling and Animal Models. *Toxicol Pathol.* 2014 Aug; 42(6):957-69. doi:10.1177/0192623313512428.
2. Cummings, SR.; Bates, D; Black, DM. Clinical Use of Bone Densitometry Scientific Review. *JAMA.* 16 de octubre de 2002; 288(15):1889-97.
3. Díaz-Tocados, S.; Rodríguez-Ortiz, M.; Almadén, Y.; Carvalho, CM.; Frazão, J.; Rodríguez, M.; Muñoz-Castañeda, J. Efecto de una dieta rica en calcio sobre el metabolismo mineral y óseo en ratas. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2022. DOI:10.4321/s1889-836x2022000100006

4. Elormendi, C.; Gómez Echeverría, G.; Gregorio, N.; Jimenez Sanchez, S.; Lafuente, S.; Martínez, M. *et al.* Utilidad de los marcadores de remodelado óseo teniendo en cuenta el valor de referencia para el cambio. *Rev Argent Endocrinol Metab.* septiembre de 2015;52(4):198-203.
5. Elorriaga, MM.; Martínez, JA.; Lecanda, F.; Larralde, J. Factores de crecimiento óseo. *Rev Med Univ Navarra.* 2016 Aug 11; 39:6336. doi:10.15581/021.39.6336.
6. Guide to the Care and Use of Experimental Animals, Volume 1, 2nd Edition. 1.
7. Hlaing, TT.; Compston, JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. *Ann Clin Biochem.* 2014; 51(Pt 2):189-202. doi:10.1177/0004563213515190
8. Kalu, DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991; 15(3):175-91.
9. Kanis, JA.; Cooper, C.; Rizzoli, R.; Reginster, JY. on behalf of the Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis (ESCEO) and the Committees of Scientific Advisors and National Societies of the International Osteoporosis Foundation (IOF). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 1 de enero de 2019; 30(1):3-44.
10. Khosla, S.; Pacifici, R. Estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, editors. *Marcus and Feldman's Osteoporosis.* 5th ed. Vol. 1. Elsevier; 2021. p. 773-797. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813073-5.00032-0>.
11. Kim, TH.; Jung, JW.; Ha, BG.; Hong, JM.; Park, EK.; Kim, HJ. *et al.* The effects of luteolin on osteoclast differentiation, function in vitro and ovariectomy-induced bone loss. *J Nutr Biochem.* 2011; 22:8-15. PMID: 20233653.
12. Kimmel, DB. Animal Models in Bone Research. En: Smith SY, Varela A, Samadfam R, editores. *Bone Toxicology.* Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 129-71. (Molecular and Integrative Toxicology).
13. Leary, S.; Pharmaceuticals, F.; Underwood, W., Anthony, R.; Cartner, S.; Johnson, CL. *et al.* AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. 2020;
14. Lei, Z.; Xiaoying, Z.; Xingguo, L. Ovariectomy-associated changes in bone mineral density and bone marrow haematopoiesis in rats. *Int J Exp Pathol.* 2009; 90:512-519. PMID: 19765105.
15. Mickelson, B.; Herfel, TM.; Booth, J.; Wilson, RP. Chapter 9 - Nutrition. En: Suckow MA, Hankenson FC, Wilson RP, Foley PL, editores. *The Laboratory Rat (Third Edition)* [Internet]. Academic Press; 2020 [citado 26 de febrero de 2024]. p. 243-347. (American College of Laboratory Animal Medicine). En: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012814338400009X>
16. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* [Internet]. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011 [citado 26 de febrero de 2024]. (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). En: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
17. Nielsen, FH. 90th Anniversary Commentary: The AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents—The Development of a Landmark Article in *The Journal of Nutrition* and Its Impact on Health and Disease Research Using Rodent Models. *J Nutr.* 1 de octubre de 2018; 148(10):1667-70.
18. Pacheco-Pantoja, E.; Salazar-Ciau, P.; Yáñez-Pérez, V. Metabolismo óseo y Osteoporosis: Conceptos y Funciones. *Rev Bioméd.* 2022 Jan 1; 33(1):906. doi: 10.32776/revbiomed.v33i1.906.
19. Park, SB.; Lee, YJ.; Chung, CK. Bone mineral density changes after ovariectomy in rats as an osteopenic model: stepwise description of double dorso-lateral approach. *J Korean Neurosurg Soc.* 2010; 48:309-312. PMID: 21113356.
20. Parra, M.; Romero, I.; Olate, S. Análisis Descriptivo de un Modelo de Osteoporosis Inducida en Ratas (*Rattus norvegicus*). *Int J Morphol.* 2021;39(1):282-286. DOI:10.4067/s0717-95022021000100282
21. Reeves, PG.; Nielsen, FH.; Fahey, GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123(11):1939-51.
22. Sánchez-Escobar F. Formación y adquisición de la masa ósea. Un compromiso del Ginecoobstetra en un programa interdisciplinario. *An Acad Med Medellín.* 2023 Sep 30; 2(23). doi:10.56684/ammd/2023.2.23.
23. Schini, M.; Vilaca, T.; Gossiel, F.; Salam, S.; Eastell, R. Bone Turnover Markers: Basic Biology to Clinical Applications. *Endocr Rev.* 8 de mayo de 2023; 44(3):417-73.
24. Seijo, M.; Bonanno, MS.; Vénica, CI.; Pita Martín de Portela, ML.; Bozzini, C.; Bergamini, CV.; Wolf, IV.; Perotti, MC.; Zeni, SN. Absorción mineral y retención ósea en ratas normales en crecimiento por el consumo de un yogur experimental reducido en lactosa que contiene galactooligosacáridos (GOS). *Actual. Osteol.* 2022; 18(2):60-74.

25. Suzuki, S.; Nakada, H.; Legeros, R. *et al.* Bone quality of the femoral mid-shaft of ovariectomized rats fed a low-mineral diet. *J Hard Tissue Biol.* 2012; 21(3):245-250. doi:10.2485/JHTB.21.245.
26. Yoon K-H.; Cho, D-C.; Sung, J. *et al.* The change of bone metabolism in ovariectomized rats: analyses of microCT scan and biochemical markers of bone turnover. *J Korean Neurosurg Soc.* 2012; 51(6):323-328. doi:10.3340/jkns.2012.51.6.323.
27. Yousefzadeh, N.; Kashfi, K.; Jeddi, S.; Ghasemi, A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. *EXCLI J.* 2020; 19:89-107.