

# PREVENCIÓN PARCIAL DE PÉRDIDA A LARGO PLAZO DEL HUESO FEMORAL EN RATAS ENVEJECIDAS OVARIECTOMIZADAS SUPLEMENTADAS CON ÁCIDO ORTOSILÍCICO ESTABILIZADO CON COLINA

---

M. Calomme  
P. Geusens  
N. Demeester  
G.J. Behets  
P. D'Haese  
J.B. Sindambiwe  
V. Van Hoof  
D. Vanden Berghe

Reimpreso de Calcified Tissue International (Tejido Calcificado Internacional)  
Volumen 78, N° 4, 2006

*Investigaciones de Laboratorio*

## **Prevención Parcial de Pérdida a Largo Plazo del Hueso Femoral en Ratas Envejecidas Ovariectomizadas Suplementadas con Ácido Ortosilícico Estabilizado con Colina**

**M. Calomme,<sup>1</sup> P. Geusens,<sup>2,3</sup> N. Demeester,<sup>1</sup> G.J. Behets,<sup>4</sup> P. D'Haese,<sup>4</sup> J.B. Sindambiwe,<sup>1</sup> V. Van Hoof,<sup>5</sup> D. Vanden Berghe<sup>1</sup>**

Recibido: 2 de diciembre de 2006 / Aceptado: 6 de febrero de 2006 / Publicado en línea: 13 de abril de 2006

**Reseña.** La deficiencia de silicio (Si) en animales resulta en defectos óseos. Se encontró que el ácido ortosilícico estabilizado con colina (ch-OSA) tiene una alta biodisponibilidad comparado con otros suplementos de Si. Se investigó el efecto de la suplementación con ch-OSA en la pérdida ósea en ratas envejecidas ovariectomizadas (OVX por sus siglas en inglés). Las ratas Wistar hembras ( $n = 58$ , edad 9 meses) se distribuyeron de forma aleatoria en tres grupos: un grupo de control con operación simulada (simulación,  $n = 21$ ), y los otros dos a cuyas ratas se les realizó OVX bilateral. Se suplementó oralmente a las ratas OVX con ch-OSA por más de 30 semanas (OVX1,  $n = 20$ ; 1 mg de Si/kg de peso corporal diario), o se las utilizó como controles (OVX0,  $n = 17$ ). El concentrado de suero Si y la excreción urinaria de Si a las 24 horas de las ratas OVX suplementadas fue significativamente mayor comparado con los controles simulados y OVX. La suplementación con ch-OSA reversó significativa aunque parcialmente el decrecimiento en la excreción de Ca, lo que se observó luego de la OVX. El incremento en el recambio óseo en las ratas OVX tuvo tendencia a la reducción por la suplementación con ch-OSA. La suplementación con ch-OSA incrementó significativamente el contenido mineral del hueso (BMC por sus siglas en inglés) femoral en la región distal y el BMC total del femoral en ratas OVX; mientras que el BMC lumbar se incrementó de forma marginal. El BMD femoral se incrementó significativamente en dos sitios en la región distal en las ratas OVX suplementadas con ch-OSA, comparado con los controles OVX. La densidad total mineral ósea lumbar se incrementó marginalmente mediante la suplementación de ch-OSA. En conclusión, la suplementación con ch-OSA parcialmente previene la pérdida de hueso femoral en el modelo de ratas OVX envejecidas.

**Palabras clave:** Ácido ortosilícico estabilizado con colina - Silicio - Hueso - Densidad mineral ósea - ovariectomía

---

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Biomédicas y Veterinarias, Universidad de Amberes, Universiteitsplein I, B-2610 Wilrijk-Amberes, Bélgica

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Biomédica, Universidad Hasselt, Campus Diepenbeek, Agoralaan, B-3590 Diepenbeek, Bélgica

<sup>3</sup> Departamento de Reumatología, Hospital Universidad, P. Debyelaan 25, 6229 HX, Maastricht, Holanda

<sup>4</sup> Patología y Toxicología Clínica Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Amberes, Universiteitsplein 1, B- B-2610 Wilrijk-Amberes, Bélgica

<sup>5</sup> Departamento de Química Clínica, Hospital Universidad de Amberes, Wilrijkstraat 10, B-2650 Edegem, Amberes, Bélgica

6

Las enfermedades relacionadas con la edad tales como la osteoporosis han emergido como problemas mayores de salud pública. Aun cuando la etiología de la osteoporosis es multifactorial [1], el tipo más común de osteoporosis es la pérdida ósea asociada con la deficiencia de la hormona ovárica en la menopausia. Los medicamentos tales como el calcio (Ca) y los suplementos de vitamina D, los bifosfonatos y el estrógeno y los moduladores receptores de estrógeno [2] se usan ampliamente para tratar de ralentizar o revertir la osteoporosis. La osteoporosis resulta de un desbalance entre la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos y la formación ósea por parte de los osteoblastos [3]. Los estrógenos y los bifosfonatos reducen la reabsorción ósea. Solo unos pocos medicamentos tales como el ranelato de estroncio [4] y las inyecciones diarias de hormona paratiroidea [5] pueden incrementar la actividad del osteoblasto y aumentar la formación ósea. También ha habido interés en los minerales óseos (magnesio y fluoruro [6]) y elementos nutricionales traza (zinc, cobre y manganeso). El zinc, el cobre y el manganeso son cofactores esenciales de las enzimas involucradas en la síntesis de los constituyentes de la matriz ósea [7]. La ingesta dietética de estos elementos traza está positivamente asociada con la masa ósea, mientras que su deficiencia ha sido correlacionada con masa ósea reducida o curación lenta de fracturas [8].

El Silicio (Si) puede ser útil como un agente preventivo o terapéutico contra la osteoporosis, en combinación con estrógeno, Ca y Vitamina D, considerando su papel sugerido en la mineralización ósea. Estudios previos con dietas deficientes en Si en ratas y polluelos han descrito signos de tejido conectivo anómalo y metabolización ósea (corteza más delgada, matriz ósea menos calcificada). Carlisle [9] encontró una relación cercana entre la concentración de Si y el grado de mineralización del hueso joven. La deficiencia de Si también se asoció a una reducción del número de osteoblastos en la matriz ósea de gallinas [10]. La formación de glicosaminoglicanos y la síntesis de colágeno en el hueso y el cartílago se redujeron debido a la deficiencia nutricional de Si [11]. Más recientemente, Seaborn y Nielsen [12, 13] mostraron que la carencia de Si en las ratas resulta en una composición mineral ósea alterada y una actividad reducida de enzimas óseas tales como la fosfatasa alcalina del fémur (ALP por sus siglas en inglés). Keeting et al. [14] y Schütze et al. [15] reportaron que la zeolita compuesta que contiene Si (zeolita de sodio A) estimula la síntesis de ADN en los osteoblastos e inhibe la reabsorción ósea producida por osteoclastos *in vitro*. En un estudio reciente, se mostró una correlación positiva entre la ingesta dietética de Si y la densidad mineral ósea (BMD por sus siglas en inglés) en la cadera en hombres y mujeres premenopáusicas, sugiriendo que una toma mayor de Si puede tener un efecto beneficioso en la salud del hueso cortical [16].

El ácido ortosilícico (OSA), también conocido como sílice soluble, está presente en concentraciones bajas ( $<10^{-4}$  M) en bebidas y agua. Los silicatos dietéticos se someten a hidrólisis, formando OSA, que es fácilmente absorbida en el tracto intestinal [17]. Recientemente se encontró que las concentraciones fisiológicas de OSA estimulan la síntesis tipo I de colágeno y la diferenciación osteoblástica en células humanas tipo osteoblasto, *in vitro* [18]. Se encontró que una forma estabilizada de OSA llamada OSA estabilizada con colina (ch-OSA) tiene una alta biodisponibilidad comparada con otros suplementos de Si, que contienen especies polimerizadas de OSA [19]. La suplementación de animales jóvenes con ch-OSA resultó en una concentración de colágeno más alta en la piel [20] y densidad ósea femoral incrementada [21]. La toma

---

<sup>6</sup> Correspondencia a: M. Calomme; dirección de correo electrónico microfar@ua.ac.be

oral de ch-OSA en humanos, por más de 20 semanas, resultó en un efecto positivo significativo en la superficie de la piel y en las propiedades mecánicas de la piel [22]. El mejoramiento en los parámetros de la piel luego de la suplementación con ch-OSA sugirió la regeneración o síntesis *de novo* de fibras de colágeno.

En el presente estudio, utilizamos ratas envejecidas ovariectomizadas (OVX) para evaluar el efecto de ch-OSA en el recambio óseo en un modelo animal para pérdida ósea posmenopáusica.

## Materiales y Métodos

### *Animales y Dieta*

Ratas Wistar hembras de nueve meses de edad se asignaron de forma aleatoria a tres grupos ( $n = 58$ ; Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France), con un peso promedio de 250 g. Las ratas se alojaron individualmente en jaulas a 25°C, con un ciclo de 12 horas / 12 horas luz / oscuridad. Un grupo era con operación simulada ( $n = 21$ ) y se realizó OVX bilateral a los otros dos grupos. Se suplementó a las ratas OVX con ch-OSA (OVX1,  $n = 20$ ; 1 mg Si/kg de peso corporal diario; Bio Minerals n.v., Destelbergen, Bélgica) por más de 30 semanas, o se las utilizó como controles (OVX0  $n = 17$ ).

Se pesó a las ratas semanalmente. En el grupo simulado estaba disponible *ad libitum* una dieta basada en caseína (C1000: 0,9% Ca, 0,7% P, vitamina D<sup>3</sup> 500 IU/kg, vitamina K<sup>3</sup> 10 mg/kg, cloruro de colina, 1.012 mg/kg; Altromin, Lage, Alemania), mientras que a las ratas OVX se les alimentó en paralelo. El agua potable contenía  $0,60 \pm 0,05$  mg Si/L. La media de la concentración de Si analizada en dos lotes de esta dieta fue de  $322 \pm 47$  µg Si/g. La suplementación de ch-OSA inició inmediatamente luego de la OVX y continuó por 30 semanas. El ch-OSA se administró diariamente en una solución frescamente preparada de ácido cítrico 0,1% (t mL) en agua desmineralizada. Durante la administración de ch-OSA, las ratas no tuvieron acceso a agua potable. A las ratas sin suplementación de ch-OSA se les administró 5 mL de una solución de ácido cítrico al 0,1% como placebo.

El protocolo de estudio fue aprobado por el comité ético local (Universidad de Amberes).

### OVX

La OVX se realizó bajo anestesia con éter, utilizando un enfoque dorsal con una pequeña incisión medial en la piel. Los animales control se sometieron a cirugía simulada, exponiendo mas no retirando los ovarios. El éxito de la OVX se confirmó en la necropsia al no haber detectado tejido ovárico y atrofia del cuello uterino.

### *Análisis de la Orina y el Suero*

Se recolectó orina en jaulas metabólicas luego de 20 semanas de suplementación y se la almacenó a -70°C. Se anestesió a las ratas con éter después de 30 semanas de suplementación (o 7,5 meses luego de la cirugía) y se las mató con punción cardiaca. Se recolectó sangre en instrumentos de laboratorio de polipropileno libre de Si (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Luego del centrifugado de la sangre coagulada, las muestras de suero se almacenaron en tubos de polipropileno a -70°C (Sarstedt). Se analizó la concentración de Si en el suero y la orina en un lote, mediante espectrometría

de absorción atómica electrotérmica con corrección longitudinal inversa Zeeman de segundo plano (AAAnalyst 800, Perkin Elmer, Bodenseew, Alemania). Se utilizaron tubos de grafito pirolítico recubierto. La configuración de la lámpara de cátodo hueco fue, respectivamente, corriente de la lámpara 30 mA, línea espectral 251,6 y ancho de banda 0,2 nm. El volumen de muestra inyectada fue de 20  $\mu$ L, y se midieron las señales en el modo área pico. Se midieron las muestras de suero por duplicado mediante adición estándar. Las diluciones de los estándares y el suero se prepararon en una solución modificadora de matriz que contenía 72 mg/L CaCl<sub>2</sub> (Aldrich, Bornem, Bélgica), 1,508 g/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Overijse, Bélgica) y 0,5 g/L Na<sub>4</sub>EDTA (Aldrich) en agua ultra pura (conductancia  $\leq$  0,08  $\mu$ S). La sensibilidad, determinada como la cantidad de Si que arroja una señal Abs.s de 0,0044, fue de 90 pg. Se analizó por varios días una reserva de suero obtenida de sujetos saludables en ayunas para determinar el coeficiente de variación entre ensayos, que fue de 8,7% para una concentración media de Si de 109,09  $\mu$ g/L ( $n = 16$ ).

El Ca urinario total y las concentraciones de fósforo se determinaron a través de espectrofotometría, mediante un instrumento Vitros 250 (Johnson & Johnson, Ortho Clinical Diagnostics, Beerse, Bélgica). El método de portaobjetos de Vitros Ca se basa en la formación de un complejo coloreado de Ca con tinte Arsenzo III. Los coeficientes de variación son 1,50% para una concentración media de Ca de 8,0 mg/dL y 1,02% para una concentración media de 11,7 mg/dL.

El método de portaobjetos de fósforo se basa en la reacción de fosfato inorgánico con molibdato de amonio para formar un complejo de fosfomolibdato de amonio, que es reducido por sulfato de *p*-metilaminofenol para formar un cromóforo azul de heteropolimolibdeno estable. Los coeficientes de variación son 1,63% para una concentración media de fósforo de 51,4 mg/dL y 1,77% para una concentración media de 24.9 mg/dL.

La actividad ALP en el suero se determinó mediante espectrofotometría, midiendo la liberación de *p*-nitrofenol desde fosfato de *p*-nitrofenol. La actividad enzimática se determinó como el cambio de absorbencia a 405 nm por un período de 5 minutos, según lo reconocido por la Federación Internacional de Química Clínica. Los coeficientes de variación fueron 4,26% para una actividad ALP media de 68,0 U/L y 1,55% para una actividad media de 422 U/L.

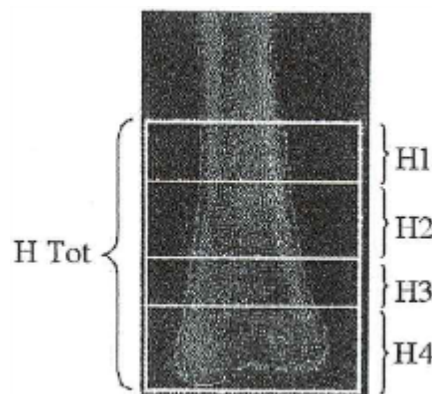
La osteocalcina (OC) se midió utilizando el kit de prueba inmunoradiométrica OC para ratas (Immunotopics, San Clemente, CA). Los coeficientes de variación son 3,5% para una concentración media de OC de 186,63 ng/mL y 4,41% para una concentración media de 15,6 ng/mL.

La piridinolina y la desoxipiridinolina en la orina se midieron mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) en un aparato Bio-Rad (Munich, Alemania), con reactivos también de Bio-Rad. Se añadieron estándares internos (25  $\mu$ L) a 175  $\mu$ L de orina y 200  $\mu$ L de HCl al 3% y se incubaron durante la noche a 100°C. Se corrieron trescientos microlitros de la muestra hidrolizada a través de columnas condicionadas de celulosa en una caja al vacío, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se inyectaron cincuenta microlitros del eluato en el aparato HPLC. La columna analítica era una columna Rio-Rad de 100 x 4,0 mm de fase inversa, y el detector de fluorescencia era de Shimadzu (Kioto, Japón; RF-551, excitación 295 nm, emisión 400 nm). Se utilizó una celda de flujo de 25  $\mu$ L, el flujo era de 0,8 mL/min, la temperatura era de 50°C, y el tiempo de corrida fue de 15-17

minutos. Los coeficientes de variación para piridinolina fueron 6,66% para una concentración media de 290 pmol/L y 6,67% para una concentración media de 1,330 pmol/L; los coeficientes de variación para desoxipiridinolina fueron 3,32 para una concentración media de 280 pmol/L y 6,75% para una concentración de 70 pmol/L.

#### *Mediciones Minerales Óseas*

Se diseccionaron la columna lumbar (vértebras L1-L4) y el fémur, liberándolos cuidadosamente de tejido blando, y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la prueba. Se analizó el contenido mineral óseo (BMC, por sus siglas en inglés) y la BMD mediante absorciometría de rayos X de energía dual (QDR 1000; Hologic, Waltham, MA) de acuerdo a un protocolo previamente descrito [23]. Se registraron los escaneos para el fémur total, las cuatro regiones de interés en el fémur (H1, diáfisis; H2, H3, H4, metáfisis distal; ver Fig. 1), y las vértebras lumbares (L1-L4). El coeficiente de variación fue de  $<1\%$ .



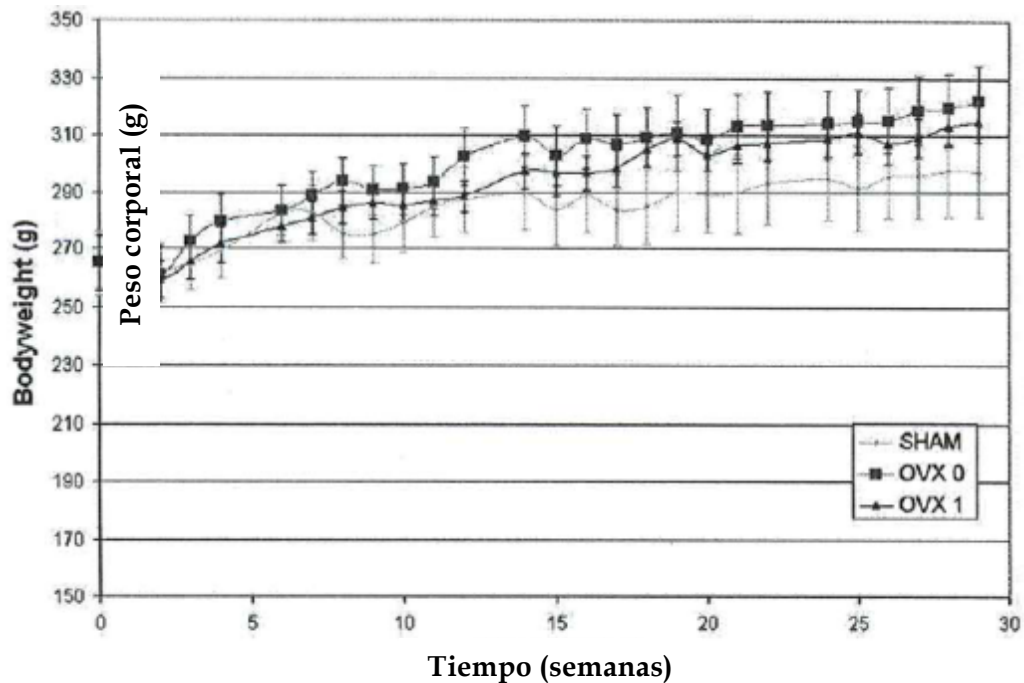
**Fig. 1.** Las áreas de interés escaneadas en el fémur se localizaron en la región de la diáfisis (H1) y metáfisis distal (H2, H3, H4).

#### *Análisis Estadísticos*

Los resultados están expresados como medias  $\pm$  error estándar (SE por sus siglas en inglés). La evaluación estadística de los datos se realizó utilizando software SPSS (Chicago, IL) (versión 13.0). Las ratas OVX suplementadas con ch-OSA se compararon tanto con los controles simulados como con OVX, y se evaluaron las diferencias entre grupos con Mann-Whitney *U*-test.  $P < 0,05$  se consideró significativo.

#### **Resultados**

A pesar de la alimentación en paralelo, el peso corporal de las ratas OVX fue mayor en todo momento comparado con las ratas control (simulado) (Fig. 2). Los pesos corporales finales de OVX0, OVX1 y ratas simuladas a las 29 semanas fueron, respectivamente,  $343,30 \pm 38,62$ ,  $343,75 \pm 18,27$  y  $297,15 \pm 19,49$  g. Las ratas suplementadas con 1 mg de Si/kg de peso corporal incrementaron su ingesta de Si en 5,5%.



**Fig. 2.** Evolución del peso corporal medio (media  $\pm$  SE) de cada grupo de tratamiento durante el período experimental de 30 semanas. Ratas con simulación, intactas; OVX0, controles OVX no suplementados; OVX1, ratas OVX suplementadas (1 mg Si/kg peso corporal).

La OVX incrementó marginalmente la concentración de suero Si, mientras que la excreción urinaria de Si tendió a ser menor luego de la OVX. La suplementación con ch-OSA incrementó significativamente tanto la concentración de suero Si como la excreción urinaria de Si en las ratas OVX comparadas con los controles no suplementados (Cuadro 1) y las ratas simuladamente operadas.

Las ratas OVX diferían de las ratas intactas por, respectivamente, excreción urinaria de Ca y P reducida, y niveles incrementados de suero OC y actividad ALP. La excreción urinaria de desoxipiridinolina también se incrementó significativamente luego de la OVX. La suplementación con ch-OSA revirtió de forma significativa pero parcial la reducción en la excreción de Ca. Los niveles de OC y ALP en las ratas OVX tendieron a ser menores luego de la suplementación de ch-OSA, comparados con los controles. El monto de desoxipiridinolina excretado en la orina luego de la OVX fue de cerca de dos veces el de los controles intactos y no cambió por la suplementación con ch-OSA. La excreción urinaria de la piridinolina era similar en los controles OVX y en las ratas con operación simulada, pero incrementó significativamente luego de la suplementación con ch-OSA.