

Acta Ortopédica Mexicana

Volumen
Volume **17**

Número
Number **4**

Julio-Agosto
July-August **2003**

Artículo:

Medición del contenido mineral óseo en las vértebras lumbares L2-L4 de ratas Long Evans hembras por absorciometría de rayos X de doble energía y por análisis químico

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Sociedad Mexicana de Ortopedia, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

Artículo original

Medición del contenido mineral óseo en las vértebras lumbares L2-L4 de ratas Long Evans hembras por absorciometría de rayos X de doble energía y por análisis químico[‡]

Alejandra Quintana-Armenta,* Lidia Ruiz-Rosano,* René Valdez-Mijares,**
María del Pilar Diez-García,*** Fernando Isoard-Acosta,**** Bertha Herrero-Bervera,*****
Rebecca Elizabeth Franco-Bourland*****

Centro Nacional de Rehabilitación
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

RESUMEN. Un método no invasivo para conocer el estado de la masa ósea de ratas es la absorciometría de rayos X de doble energía. Empleando un densitómetro Hologic QDR-2000 programado y calibrado para el estudio de las vértebras lumbares L2-L4 de ratas, evaluamos la precisión y la exactitud de las mediciones de densidad mineral ósea (DMO) y contenido mineral óseo (CMO) de un grupo de 14 ratas hembras Long Evans de 22 semanas de edad y de 290-320 g de peso corporal. Bajo anestesia, se realizaron tres mediciones consecutivas con reposicionamiento por rata. La DMO y el CMO fueron (media \pm DE): 175.20 \pm 2.00 mg/cm² y 450.60 \pm 18.00 mg, respectivamente, con coeficientes de variación de grupo (CV) intraensayo de 1.15 \pm 0.20% y 4.12 \pm 1.95% (media \pm DE), respectivamente, demostrando una buena precisión. El análisis espectrofotométrico del contenido de calcio, magnesio y fósforo en el producto de digestión con HNO₃ de las vértebras L2-L4 de las mismas ratas fueron (en mg, media \pm DE): 131.21 \pm 6.93, 2.22 \pm 0.17 y 55.77 \pm 3.45, respectivamente, con coeficientes de correlación lineal (r) contra su CMO de 0.52, 0.33 y 0.47 ($p > 0.05$) (medida de exactitud), lo que sugiere que las mediciones de CMO son aproximadas y no sustituyen al análisis químico.

Palabras clave: ratas Long Evans, vértebras, lumbares, análisis químico, absorciometría de rayos X de doble energía.

* Ayudante de Investigador, Bioquímica-O, CNR.

** Investigador Asociado C, Bioquímica-O, CNR.

*** Jefa del Servicio de Rehabilitación Osteoarticular y Densitometría Ósea, CNR.

**** Químico A, Departamento de Fisiología de la Nutrición, INCMNSZ.

***** Química, Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, INCMNSZ.

***** Jefa del Servicio de Bioquímica-O, CNR.

† Obtuvo 1^{er} lugar en la categoría de Cartel en la XXII Jornada Nacional de Ortopedia, Acapulco, Gro., México, Mayo 2003.

Dirección para correspondencia:

Dra. en C. Rebecca Elizabeth Franco-Bourland. Calz. México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, Del. Tlalpan. 14389 México D.F., México; Tel. 59991000 ext. 19508; Fax. 55735545

SUMMARY. A non-invasive method for determining bone mass of rats is by dual energy X-ray absorptiometry (DXA). Using a Hologic QDR-2000 densitometer programmed and calibrated for the study of rat L2-L4 lumbar vertebrae, we assessed the precision and accuracy of bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) measurements of a group of 14 female Long Evans rats of 22 weeks of age and 290-320 g of body weight. Under anesthesia, three consecutive determinations with repositioning were made per rat. BMD and BMC were (mean \pm SD): 175.20 \pm 2.00 mg/cm² and 450.60 \pm 18.00 mg, respectively, with group intra-assay coefficients of variation of 1.15 \pm 0.20% and 4.12 \pm 1.95% (mean \pm SD), respectively, showing good precision. The spectrophotometric analysis of the content of calcium, magnesium, and phosphorous in the product of HNO₃ digestion of the L2-L4 vertebrae of the same rats were (in mg, mean \pm SD): 131.21 \pm 6.93, 2.22 \pm 0.17 and 55.77 \pm 3.45, respectively, with linear correlation coefficients (r) vs their BMC of 0.52, 0.33 and 0.47 ($p > 0.05$) (measure of accuracy), which suggest that BMC measurements are approximate, and do not substitute for chemical analyses.

Key words: rats Long-Evans, lumbar vertebrae, analytical chemistry, X-ray absorptiometry, dual-energy.

Introducción

En los últimos años ha progresado el desarrollo de técnicas no invasivas para valorar *in vivo* cambios en la densidad mineral ósea (DMO) y el contenido mineral óseo (CMO) en humanos y en animales pequeños de laboratorio. Actualmente estos procedimientos están más disponibles para su uso tanto en la clínica como en investigación. Incluyen sistemas basados en la atenuación de un haz de luz de rayos γ , rayos X o ultrasonido, en la radiogrametría, en la absorciometría de fotón simple y de doble fotón y en la absorciometría de rayos X de doble energía (AXD).⁹

La AXD, en particular, es una de las técnicas de más amplio uso en la detección y monitoreo de enfermedades óseas en humanos debido a su alta reproducibilidad, bajo costo y baja exposición a la radiación.² Además, programados con un software especial para el estudio de animales pequeños de laboratorio, los equipos de AXD son cada vez más utilizados en investigación en los estudios de modelos murinos con osteopenia y osteoporosis.⁶

En el presente estudio, evaluamos por AXD *in vivo*, la precisión y exactitud de las mediciones de DMO y CMO en las vértebras lumbares L2-L4 de un grupo de ratas Long Evans. Para la determinación de la exactitud del procedimiento comparamos el CMO con mediciones espectrofotométricas de calcio, magnesio y fósforo de un extracto ácido de las mismas vértebras.

Material y métodos

Animales. Se utilizaron ratas hembras de la cepa Long Evans (Bioterio del Centro Nacional de Rehabilitación), de 22 semanas de edad y un rango de peso corporal (pc) de 290-320 g. Todas las ratas fueron alojadas en cajas de acrílico (tres o cuatro por caja), a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Las ratas fueron mantenidas con acceso libre a una dieta comercial estandarizada para ratas (Purina 5001) y agua purificada. El manejo de los animales se realizó en estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM 062 Z001999 para el uso de animales de laboratorio.

Precisión de la densitometría. Se realizaron mediciones de DMO y CMO a un grupo de 14 ratas. Las determinaciones densitométricas se realizaron empleando un absorciómetro de rayos X de doble energía (Hologic QDR-2000) de alta resolución programado con un software versión 5.73 (diseñado únicamente para el análisis de las vértebras lumbares L2, L3, L4 en ratas) y calibrado con un fantasma (phantom) para el estudio de animales pequeños.

Bajo anestesia profunda con una mezcla de ketamina (50 mg/kg pc) y xilacina (10 mg/kg pc) administrada por vía intraperitoneal, los animales fueron colocados en posición decúbito supina con completa abducción de las extremidades, sobre una plataforma de acrílico y una plantilla de acetato cuadriculada para facilitar la reproducibilidad del posicionamiento y reposicionamiento de las ratas en el densitómetro.

Se realizaron tres mediciones densitométricas consecutivas con reposicionamiento para cada una de las 14 ratas. Cada medición tiene una duración de 12 a 14 min, según el tamaño de la rata. Todas las mediciones se realizaron en un período de tiempo no mayor de un mes para establecer la precisión de las mediciones de DMO y CMO por AXD a corto plazo.⁵

Exactitud de la densitometría. Después de realizar las mediciones de DMO y CMO por AXD, se sacrificaron las 14 ratas con bióxido de carbono. Inmediatamente después se disecaron las vértebras lumbares L2-L4 de cada una de

ellas, se colocaron en etanol al 50% en agua desionizada, se removió manualmente todo el tejido blando y se pusieron a peso constante en una estufa a 75°C durante 24 h. Enseguida fueron digeridas en 7 ml de HNO_3 en un digestor (horno de microondas NC 28105, CEM, MDS 2000) a una presión de 200 psi durante una hora y 15 minutos. El producto de digestión de las tres vértebras de cada rata fue aforado a 25 ml con agua desionizada. Alícuotas de 1 ml de esta solución fueron diluidas 1:2000, 1:1000 y 1:50 para las determinaciones de calcio, magnesio y fósforo, respectivamente. Calcio y magnesio fueron medidos en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer 2380) y el fósforo fue medido por el método de Fiske y Subbarow,³ como un complejo no reducido de fosfomolibdato por absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Technicon RA-1000.

Ánálisis estadístico. La precisión de las mediciones densitométricas del grupo de ratas estudiadas se obtuvo calculando la media \pm DE de los coeficientes de variación (CV) intraensayo de tres mediciones consecutivas de la DMO y del CMO de cada rata.

Se determinaron los coeficientes de correlación (r) de las regresiones lineales entre el peso seco de cada tripleta de vértebras lumbares L2-L4 y su contenido de calcio, magnesio y fósforo para conocer la exactitud del análisis químico de los productos de digestión ácida de dichas vértebras.

La exactitud de las determinaciones densitométricas de CMO de las vértebras lumbares L2-L4 obtenidas por AXD se estableció calculando los coeficientes de correlación (r) de las regresiones lineales entre el contenido total de calcio, magnesio y fósforo de cada tripleta L2-L4 de las 14 ratas y su correspondiente CMO.

En todos los casos se empleó el paquete estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software Inc).

Resultados

Ánálisis densitométrico. La figura 1A muestra la colocación de la rata sobre la plataforma de acrílico y la plantilla cuadriculada. Con la plantilla cuadriculada se busca asegurar el posicionamiento correcto de las ratas para cada medición densitométrica. En la figura 1B se muestra la región R1 (vértebras lumbares L2-L4) de la columna vertebral de la rata analizada por AXD.

En la tabla 1 se resumen los valores promedio de la DMO y del CMO de las vértebras lumbares L2-L4 de las 14 ratas Long Evans obtenidos por AXD. El coeficiente de correlación de la regresión lineal de las lecturas densitométricas de DMO y CMO obtenidas fue: $r = 0.79$, $p < 0.05$.

Precisión de la densitometría. Los CV de grupo intraensayo para las mediciones densitométricas de la DMO y el CMO de las 14 ratas fueron (media \pm DE) $1.15 \pm 0.20\%$ y $4.12 \pm 1.95\%$, respectivamente.

Ánálisis químico. En la figura 2 se muestra el esqueleto de una rata, ilustrando las vértebras lumbares L2-L4 que

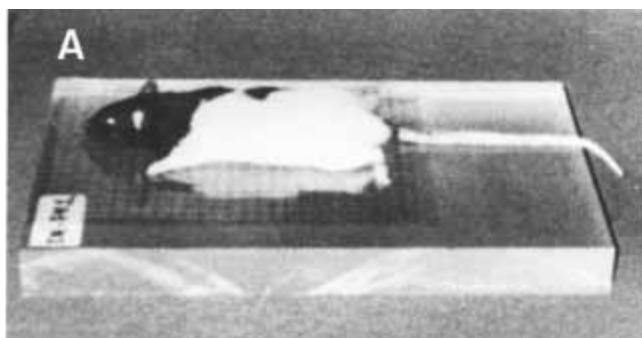


Figura 1A.

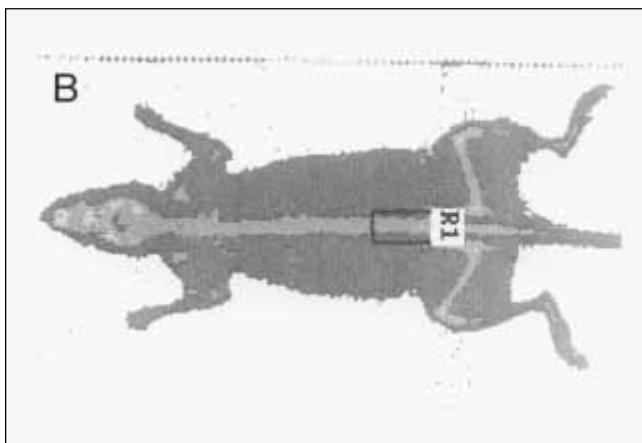


Figura 1B.

Figura 1. Absorciometría de rayos X de doble energía de las vértebras lumbares L2-L4 de las ratas Long Evans. En (A) se muestra la colocación de la rata en el densímetro Hologic QDR-2000 sobre una plataforma de acrílico y una plantilla cuadrículada (que se emplea para asegurar el posicionamiento y reposicionamiento de la rata). En (B) se muestra la región R1 de la columna vertebral que corresponde a las vértebras lumbares L2-L4 analizadas densitométricamente.

primero fueron estudiadas densitométricamente por AXD y luego fueron disecadas, limpiadas de tejido blando residual y digeridas con HNO_3 para el análisis espectrofotométrico de su contenido de calcio, magnesio y fósforo.

En la *tabla 1* se resumen estos valores para cada una de las ratas. De ellos se desprenden las concentraciones promedio de calcio, magnesio y fósforo por mg de peso seco de cada tripleta L2-L4, que fueron ($\mu\text{g}/\text{mg}$): 232.69 ± 4.82 , 3.95 ± 0.18 , 98.87 ± 1.72 .

En las *gráficas 1A, 1B y 1C* se ilustran las regresiones lineales y sus coeficientes de correlación (*r*) correspondientes que se obtuvieron entre contenido total de calcio, magnesio y fósforo de las vértebras lumbares L2-L4 de las 14 ratas Long Evans y su peso seco, observándose una buena asociación entre estos dos parámetros y validez de estas determinaciones.

Exactitud de la densitometría. En las *gráficas 1D, 1E y 1F* se muestran las regresiones lineales y los coeficientes de correlación (*r*) correspondientes que se obtuvieron entre el contenido de calcio, magnesio y fósforo de las vértebras lumbares L2-L4 de las 14 ratas estudiadas y su CMO, indicando correlación pobre entre estos dos parámetros.

En la *tabla 2* se muestra la similitud de las relaciones entre la media del contenido de calcio, magnesio y fósforo de las vértebras lumbares L2-L4 de las 14 ratas Long Evans y las medias de su peso seco y contenido mineral óseo.

Discusión

Evaluamos la precisión y la exactitud de las mediciones densitométricas a corto plazo de la DMO y del CMO de un grupo de 14 ratas hembras Long Evans realizadas en un densímetro Hologic QDR-2000, programado y calibrado para el estudio de las vértebras lumbares L2-L4 de ratas. Se realizaron tres mediciones consecutivas con reposicionamiento para cada rata en un período no mayor de un mes.

Tabla 1. Mediciones densitométricas y análisis mineral de las vértebras lumbares L2-L4 de las 14 ratas Long Evans.

Rata	Peso corporal, g	DMO ^a , mg/cm ²	CMO ^a , mg	Peso seco L2-L4, mg	Calcio ^b , mg	Magnesio ^b , mg	Fósforo ^b , mg
1	290	174.63	417.97	524.50	125.31	1.97	53.56
2	300	161.93	416.43	507.00	116.63	1.95	50.25
3	300	163.56	436.73	561.00	132.75	2.20	56.56
4	310	163.93	450.13	539.50	125.93	2.20	52.50
5	290	180.80	446.03	586.00	134.62	2.40	58.37
6	300	183.73	458.97	594.30	136.48	2.45	59.56
7	300	164.53	396.43	546.40	127.17	2.09	53.81
8	320	184.13	492.77	619.20	140.20	2.34	61.06
9	300	170.96	453.70	612.10	140.82	2.39	58.81
10	300	190.23	489.40	603.30	137.72	2.25	59.81
11	290	182.43	468.73	549.80	130.89	2.14	55.25
12	300	188.26	492.27	525.00	122.83	2.03	51.37
13	300	169.33	449.80	582.20	132.30	2.39	57.06
14	300	174.53	439.10	550.00	133.37	2.39	52.93
media \pm DE	300 ± 7.85	175.2 ± 2.00	450.69 ± 18	564.31 ± 35.39	131.21 ± 6.93	2.22 ± 0.17	55.77 ± 3.45

DMO, densidad mineral ósea; CMO, contenido mineral óseo; L2-L4, vértebras lumbares; a, media de tres determinaciones; b, media de dos determinaciones.

La precisión de un método analítico se define como la capacidad de dicho sistema para obtener siempre los mismos resultados para medidas repetidas y seriadas, siempre y cuando no hayan ocurrido variaciones reales o biológicas en un mismo sujeto de estudio. La precisión de los parámetros analizados se reporta como el coeficiente de su variación, que es una medida porcentual (CV. en %).

En el caso de la precisión de las mediciones densitométricas de la masa ósea de animales por AXD (y en consecuencia de su valor analítico), ésta va a depender de la colocación precisa del animal en el densitómetro, de la definición exacta de la región del esqueleto de interés, así como de las características del equipo.⁷ El coeficiente de variación de grupo de $1.15 \pm 0.20\%$ que obtuvimos para las determinaciones de DMO por AXD refleja una buena pre-

cisión de nuestras mediciones en rata y es comparable a la precisión de las mediciones de DMO *in vivo* en espina lumbar reportadas por otros autores,^{1,4,10} cuyos CV fluctúan entre 0.62-1.77%. A pesar de haber obtenido una precisión menor para las determinaciones de CMO con un CV de $4.12 \pm 1.95\%$, el coeficiente de correlación de $r = 0.79$ con una $p < 0.05$ entre estos dos parámetros densitométricos, refuerza la validez de este procedimiento para el seguimiento de cambios en la masa ósea de ratas sometidas a alguna manipulación experimental que pudiera alterar la integridad de su masa ósea.

La exactitud de un procedimiento se realiza comparando los valores para algún parámetro obtenidos a través de dos o más métodos distintos como pudiera la comparación entre la AXD para medir el estado de la integridad ósea,

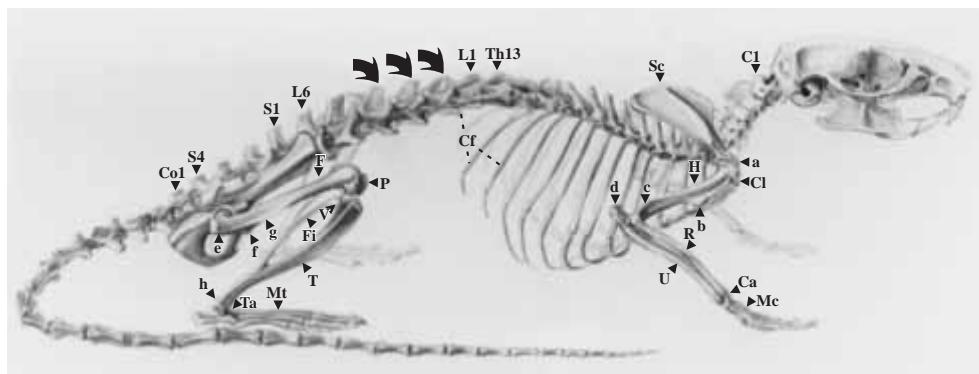
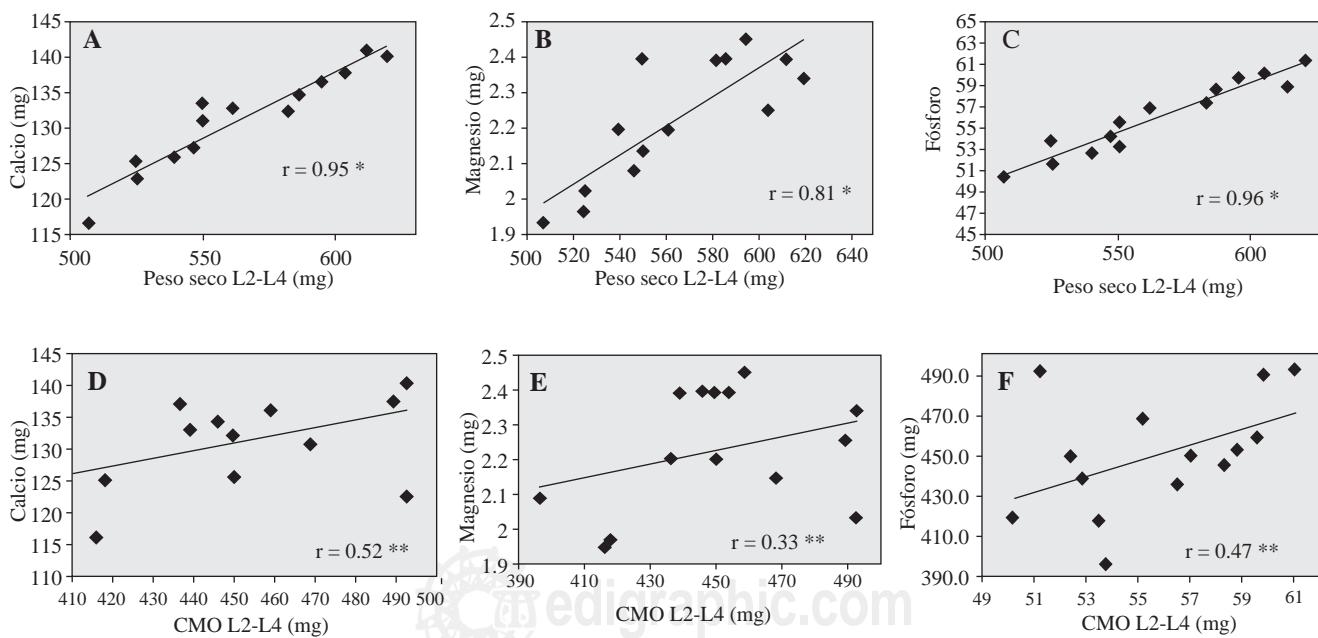


Figura 2. Esqueleto de rata. Se indican (flechas) las vértebras lumbares L2-L4 analizadas densitométricamente que luego fueron desecadas para su análisis químico de calcio, magnesio y fósforo por espectrofotometría, previa digestión con HNO_3 en un microondas a 200 psi. Modificado de: Hebel R, Stromberg MW: Anatomy of the Laboratory Rat. Osteology. Baltimore, The Williams and Wilkins Co., 1976: 1-17.



Gráfica 1. Regresiones lineales y coeficientes de correlación lineal. En (A), (B) y (C) se ilustran las regresiones lineales y coeficientes de correlación correspondientes del contenido de calcio, magnesio y fósforo de las vértebras lumbares L2-L4 de las 14 ratas Long Evans estudiadas contra su peso seco (mg); en (D), (E) y (F) se ilustran las regresiones lineales y coeficientes de correlación correspondientes de los mismos valores de contenido mineral anteriores con respecto a su contenido mineral óseo (CMO, mg, medida densitométrica). r, coeficientes de correlación lineal; * $p < 0.05$; ** $p > 0.05$.

Tabla 2. Relación entre la media del contenido de calcio, magnesio y fósforo de las vértebras lumbares L2-L4 de las 14 ratas Long Evans y las medias de su peso seco y contenido mineral óseo.

Mineral	Mineral/peso de vértebras L2-L4, %	Mineral/CMO, %
Calcio	23.27 \pm 0.48	29.19 \pm 1.77
Magnesio	0.39 \pm 0.02	0.50 \pm 0.04
Fósforo	9.87 \pm 0.17	12.41 \pm 0.79

CMO, contenido mineral óseo; L2-L4, vértebras lumbares.

con mediciones histomorfométricas, análisis químico, análisis bioquímico, etc.^{8,9} Aquí nosotros hemos correlacionando los valores de CMO de las vértebras lumbares L2-L4 *in vivo* de un grupo de 14 ratas obtenidos por el método de AXD con los valores de calcio, magnesio y fósforo obtenidos por el análisis químico del producto de digestión ácida a presión de las mismas vértebras. A pesar de que las determinaciones químicas muestran una buena correlación entre sí (minerales *vs* peso seco de las vértebras L2-L4 con $r = 0.95, 0.81$ y 0.96 , para calcio, magnesio y fósforo, con $p < 0.05$), hemos encontrado una correlación pobre entre las mediciones densitométricas de CMO y las mediciones de los minerales, obtenidas por métodos espectrofotométricos ($r = 0.52, 0.47$ y 0.33 , con $p > 0.05$), para las mediciones de calcio, magnesio y fósforo, respectivamente, contra las mediciones de CMO correspondientes. Nuestras determinaciones contrastan con las de otros autores que reportan una buena correlación entre ambos métodos $r = 0.99, 0.93$.^{2,10} Actualmente estamos buscando averiguar la razón de la discrepancia entre nuestras mediciones densitométricas

(que correlacionan bien entre sí) y nuestras determinaciones químicas (que también correlacionan bien entre sí).

Bibliografía

1. Ammann P, Rizzoli R, Slosman D, Bonjour JP: Sequential and precise *in vivo* measurement of bone density in rats dual-energy X-ray absorptiometry. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 311-316.
2. Cazez JP, Muehlbauer RC, Lippuner K, Kelly T, Fleisch H, Jaeger P: Dual-energy X-ray absorptiometry for measuring total bone mineral content in the rat: Study of accuracy and precision. *Bone Miner* 1994; 26(1): 61-68.
3. Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925; 66: 375.
4. Gala Paniagua J, Díaz-Curiel M, de la Piedra Gordo C, Castilla Reparaz C, Torralbo García M: Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol* 1998; 71(847): 754-8.
5. Gluer CC, Blake G, Lu Y, Blunt BA, Jergas M, Genant HK: Accurate assessment of precision errors: How to measure the reproducibility of bone densitometry techniques. *Osteoporos Int* 1995; 5(4): 262-270.
6. Grier SJ, Turner AS, Alvis Mr: The use of dual-energy X-ray absorptiometry in animals. *Invest Radiol* 1996; 31(1): 50-62.
7. Griffin MG, Kimble R, Hopfer W, Pacifici R: Dual energy X-ray absorptiometry of the rat: Accuracy, precision and measurement of bone loss. *J Bone Miner Res* 1993; 8(7): 795-800.
8. Kastl S, Sommer T, Klein P, Hohenberger W, Engelke K: Accuracy and precision of bone mineral density and bone mineral content in excised rat humeri using fan beam dual-energy X-ray absorptiometry. *Bone* 2002; 30(1): 243-246.
9. Rozenberg S, Vandromme J, Neve J, Aguilera A, Muregancuro A, Peretz A, Kinthaert J, Ham H: Precision and accuracy of *in vivo* bone mineral measurement in rats using dual-energy X-ray absorptiometry. *Osteoporosis Int* 1995; 5(1): 47-53.
10. Yamauchi H, Kushida K, Yamazaki K, Inoue T: Assessment of spine bone mineral density in ovariectomized rats using DXA. *J Bone Miner Res* 1995; 10(7): 1033-1039.

