

Aplicación de estímulos mecánicos en ratas sometidas a ovariectomía para favorecer la osteogénesis

Mechanical stimuli in ovariectomized rats to foster osteogenesis

Dr. Ricardo Amador del Prado, Dr. Adrián Hernández Lomelí, Dr. A. Jesús Vega Malagón, Dr. Genaro Vega Malagón

Resumen

Objetivo: Determinar el número de osteoblastos y observar el área de matriz ósea en ratas sometidas a ovariectomía al aplicar estimulación mecánica para el control de la osteoporosis.

Sede: Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Diseño: Experimental.

Análisis estadístico: Prueba de riesgo relativo con intervalos de confianza al 95% y Chi² con corrección de Yates.

Material y métodos: Se estudiaron 40 ratas *No**vergicus* de la cepa Wistar con edad promedio de cinco meses y un peso promedio de 260 g, a las que se les realizó ovariectomía bilateral; se dividieron en dos grupos: a) grupo experimental con 20 ratas, al que se le aplicó estímulo mecánico y b) grupo control con 20 ratas, al que no se le aplicó ningún estímulo. La determinación de osteoblastos y matriz ósea se realizó con el paquete de software de Carl Zeiss (Imagen análisis, software).

Resultados: Al observar el área de la matriz ósea en el grupo experimental fue de 6,117 píxeles y en el grupo control con sólo 3,166 píxeles. Posterior a la aplicación del estímulo mecánico, 16 ratas manifestaron la presencia de osteoblastos, mientras que en el grupo control que no recibió estímulos sólo cuatro revelaron osteoblastos. Se obtuvo un riesgo relativo de 4.0 con intervalos de confianza al 95% de 1.62 a 9.87 ($p < 0.0005$). La proporción de osteogénesis por campo en el grupo experimental fue de 80.0% y en el grupo control del 20.0%.

Abstract

Objective: To determine the number of osteoblasts and observe the bone matrix in rats, subjected to ovariectomy, when applying mechanical stimulation for the control of osteoporosis.

Setting: School of Medicine, Autonomous University of Querétaro, Mexico.

Design: Experimental.

Statistical analysis: Relative risk test with 95% confidence intervals and Chi square with Yate's correction.

Material and Method: We studied 40 Wistar (*No**vergicus*) rats, average age of 5 months and average weight of 260 g. Rats were subjected to bilateral ovariectomy and divided in two groups: a) experimental group with 20 rats, to which mechanical stimulation was applied, b) control group with 20 rats that did not receive any stimulation. Osteoblasts and bone matrix determinations were performed by means of the Carl Zeiss software (Image analysis).

Results: The bone matrix area of the experimental group was of 6,117 pixels and in the control group of only 3,166 pixels. After application of the mechanical stimulus, 16 rats revealed the presence of osteoblasts, whereas only four rats of the control group (without stimulation) revealed osteoblasts. Relative risk was 4.0 with 95% confidence intervals of 1.62 to 9.87 ($p < 0.0005$). Proportion of osteogenesis per field in the experimental group was 80% whereas in the control group it was 20%.

Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Medicina-

Recibido para publicación: 13 Septiembre 2005

Aceptado para publicación: 15 Enero 2006

Correspondencia: Dr. Ricardo Amador del Prado. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Medicina, Clavel 200

Frac. Prados de la Capilla

Querétaro, Querétaro. 76170

Teléfono y Fax: (442) 2 15 09 28

Correo electrónico: ramador1953@yahoo.com

O bien a: adrianhl@uaq.mx

Conclusiones: El estímulo mecánico en ratas ovariectomizadas favorece la osteogénesis en la osteoporosis tipo 1.

Palabras clave: Osteoporosis, osteogénesis.
Cir Gen 2006;28:88-92

Conclusions: Mechanical stimulation in ovariectomized rats favors osteogenesis in type-1 osteoporosis.

Key words: Osteoporosis, osteogenesis.
Cir Gen 2006;28:88-92

Introducción

La expectativa de vida se ha incrementado en forma muy significativa durante las últimas décadas. Estudios de la Organización Mundial de la Salud consideran que en el año 2025 la esperanza de vida en México se incrementará a 77 años y la mortalidad infantil se reducirá a la mitad. A medida que van adquiriendo más importancia los padecimientos crónicos, es mayor el tiempo que pasa entre la aparición de una enfermedad y su desenlace. La consecuencia de permanecer enfermo por largo tiempo hace que la discapacidad adquiera un mayor peso al definir la situación de salud de una comunidad.^{1,2}

La osteoporosis es un problema de salud pública y se define como enfermedad metabólica que causa considerable morbilidad, mortalidad y utilización de servicios médicos y sociales en países industrializados. Su prevalencia en México es del 25 al 30% de los individuos de 40 años de edad con predominio del género femenino.³ En 1995 y 1996 se observó en el Instituto Nacional de Ortopedia que el 29% de los pacientes que presentaron osteoporosis tenían entre 50 y 59 años, lo que indica un problema de salud pública.³ En los estudios de población en México, 6.2% de la población (en promedio) tienen 65 años y, con una creciente esperanza de vida, se espera un aumento significativo de ancianos susceptibles de osteoporosis, generando un gasto social considerable. Las fracturas por osteoporosis representan un costo de 31,500 pesos por paciente y se esperan 250,000 casos por año lo que representa un costo de 410 a 20,020 pesos per cápita del producto interno bruto y debe ser objeto de estudio por equipos multidisciplinarios de salud, en la búsqueda de alternativas de manejo más eficientes.¹

Por la octava década de la vida, aproximadamente el 50% de las mujeres desarrollará fracturas por compresión en columna.⁴ La osteoporosis ocurre en mujeres blancas postmenopáusicas por deficiencia de estrógenos e inmovilización.⁵

Se atribuye a la presión, el papel de dirigir la configuración de la esponjosa, de tal suerte que ésta es dependiente de la duración del apoyo, del hábito postural durante la posición bípeda y de la restricción relativa de la amplitud de los movimientos articulares del adulto.⁶⁻⁷

Existe una fuerte asociación entre la deformación y adaptación a las señales eléctricas en el tejido musculosquelético y la observación de la ley de Wolf en la remodelación ósea. La estimulación farádica ha sido aplicada al calcáneo del conejo, que reduce la resor-

ción endóstica, ocurriendo la osteogénesis, con aumento de hueso inmaduro y aumento de la remodelación ósea.^{6,7}

Mediante la aplicación de estimulación a baja frecuencia y altos voltajes (30 Hz, 100 V/cm), se redujo significativamente la osteoporosis cortical.^{8,9} El uso de campos electromagnéticos para evocar una respuesta biológica específica en zonas de osteonecrosis no ha dado resultados concluyentes.⁸ La utilización de ondas de choque extracorpórea de alta energía para tratamiento de seudo-artrosis favorece la osteogénesis al expresar sitios de proteínas integrales alfa-beta.^{9,10}

La introducción de la estimulación mecánica al transmitir ondas de vibración al osteoblasto, de manera externa, es un recurso terapéutico para el control de la osteoporosis, es un medio adecuado, seguro, tanto para evitar la pérdida de matriz ósea y estimular al osteoblasto. Esto representa un avance en el abordaje del problema de la osteoporosis. En este trabajo se determinó el número de osteoblastos y el área de matriz ósea en pixeles en ratas sometidas a ovariectomía al aplicarles estimulación mecánica para controlar la osteoporosis.

Material y métodos

El presente estudio fue aprobado en el Comité de Investigación y Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Se utilizaron 40 ratas *No^{ver}gicus* de la cepa Wistar con edad promedio de 5 meses y un peso promedio de 260 g del bioratorio de la Facultad de Medicina, con cumplimiento de la NOM-062-ZOO-1999, a las cuales se les practicó ovariectomía bilateral, divididas en dos grupos, uno experimental al que se le aplicó estimulación mecánica y un grupo control al cual no se le aplicó estímulo. Los criterios de exclusión fueron infección, idiosincrasias a la anestesia o complicaciones transoperatorias como hemorragia.

La ovariectomía bilateral fue realizada mediante inducción anestésica de tipo disociativa con maleato de midazolam (0.1 µg/g peso corporal) y clorhidrato de ketamina (2 µg/g peso corporal) se ejecutó incisión en la región lumbar sobre la línea media, de 2 cm de longitud, disecándose lateralmente al borde de los músculos paravertebrales. Se extrajeron los ovarios, disecándose y ligando el lecho vascular con catgut 000 y seccionando en forma bilateral y realizando cierre de herida en un plano.

Estimulación mecánica. Se diseñaron motores, por el investigador, los cuales a través de una lámina de

acero inoxidable de 2 mm de espesor proporcionaban las vibraciones durante un período de dos horas por 6 meses a nivel de las extremidades de la rata. Estas vibraciones se aplicaron en escalas de 0 a 6,000 revoluciones por minuto. La fuente de poder tiene una capacidad para entrada de 8 motores y una perilla que controla el número de motores. Se colocó una jaula sobre la lámina de acero para mantener inmóvil a la rata durante el tiempo de estimulación.

Muestras de tejido óseo. Al término de la estimulación, las ratas se sacrificaron con el fin de obtener los fémures para los estudios de histoquímica y montaje del tejido óseo para realizar la lectura a través del microscopio.

- **Obtención de fémures:** Se extraen los fémures incluyendo el total del tejido óseo para realizar la preparación en sustancia quelante, como sal sódica del ácido etilendiamoniotrécético (EDTA) o también una solución ácida como el ácido nítrico al 5%. Los cortes del tejido se realizaron de 1 x 1 x 0.3 cm.
- **Fijación:** Se utilizó aldehído fórmico al 10%, debidamente amortiguado envuelto en papel engrapado.
- **Deshidratación:** Se llevó a cabo con alcohol absoluto de grado creciente hasta eliminar toda el agua del tejido óseo, con duración de 20 minutos por cada grado de alcohol, que va de 70 al 100%.
- **Aclaración:** Se realizó con inmersión de los fémures en xilol cada 20 minutos con tres cambios de recipientes, ya que es una sustancia que se mezcla con alcohol y parafina hasta sustituir todo el alcohol por el xilol.
- **Inclusión:** Los bloques se colocaron en parafina fundida y se dejó hasta que todo el xilol era substituido por la parafina disuelta.
- **Sección:** Se suprime el exceso de parafina endurecida cortándola. Luego el bloque se monta en un micrótomo y se corta en rebanadas del grosor deseado y se obtiene una cinta de cortes de parafina.
- **Tinción y montaje:** La supresión de la parafina se substituye por agua. Para ello se colocó cada corte en un portaobjeto y se aplicaba xilol, después en alcohol más concentrado y agua. Se comienza la hidratación con xilol cada 3 minutos y se hidrata con alcohol del 100 al 70% cada 20 minutos. Se mezcla con agua natural por 3 minutos, posteriormente con hematoxilina de 3 a 5 minutos y nuevamente con agua y después con alcohol ácido, por último con agua seguido de eosina de 3 a 5 minutos.
- **Lectura de las laminillas:** Se efectuó con un microscopio óptico con adaptador a la computadora y con el paquete de Carl Zeiss (Imagen análisis software). El análisis cuantitativo histomorfométrico se llevó a cabo en todas las muestras de tejido óseo, utilizando el cursor, transmitiendo automáticamente al programa analizador de datos de Zeiss, para calcular el valor de los parámetros de área y perímetro. Las secciones eran vistas con el objetivo 10X, con el cual se median los parámetros de reabsorción y osteoide.¹¹

La definición de términos histomorfométricos son las siguientes:

% Volumen óseo trabecular = el porcentaje de cavidad medular ocupada por hueso osteoide mineralizado.

Promedio de anchura de trabécula (micras) = (total trabéculas) (área trabecular/largo)/ total de trabéculas.

% Volumen óseo cortical = el porcentaje de biopsia ósea cubierto por hueso cortical mineralizado y desmineralizado.

Promedio de ancho cortical (micras) = el promedio de delgadez de las corticales, calculado como la cortical ósea dividida por la anchura de ambas corticales.

% Volumen osteoide cortical = el porcentaje de volumen osteoide expresado como un porcentaje de volumen óseo trabecular.

% Superficie osteoide trabecular = el porcentaje de total de superficie ósea trabecular cubierta por osteoide que está alineada por osteoblastos cuboidales típicos.

Anchura del ostión (micra) = área osteoide trabecular dividida entre los milímetros de superficie ósea trabecular cubierta de osteoide.

% Superficie reabsortiva trabecular = el porcentaje de superficie trabecular, incluyendo con o sin osteoclastos.

% Superficie de reabsorción osteoclástica = el porcentaje de superficie ósea trabecular alineada por osteoclastos.

Evaluación de datos: Se midió la presencia de osteoblastos por campo, así como el diámetro de la formación trabecular de cada una de las muestras para realizar un análisis por campos. Los valores para la presencia de osteoblastos fueron sobre la base de diferentes revoluciones en un total de 40 ratas sometidas a ovariectomía bilateral. En lo referente a la formación ósea en forma de trabéculas estuvo determinada por el diámetro de matriz ósea que rodea al osteoblasto. Los pixeles los calculamos con base en el tamaño de imagen por el número de puntos por pulgada (dpi) del monitor considerado en el software.

El análisis estadístico se realizó por medio de prueba de riesgo relativo con intervalos de confianza al 95% y Chi cuadrada con corrección de Yates

Resultados

El presente estudio experimental utilizó dos grupos comparativos de 20 ratas. A ambos grupos se les extirparon los ovarios, al primero de ellos al cual se le denominará experimental se le aplicó estímulo mecánico, mientras que al segundo llamado control no se le aplicó estímulo. El propósito fue observar el área de matriz ósea (MO) depauperada en los animales en estudio; en el **cuadro I**, se presenta el grupo experimental con 6,117 pixeles y en el grupo control con sólo 3,166 pixeles.

El conteo de osteoblastos (OB) se aplicó a cada una de las ratas reportando el promedio en cada grupo.

En el grupo experimental se reportan 16 ratas con dichas células, con un promedio de 16 OB y en el grupo control sólo en 4 ratas con un promedio de conteo celular de 9 (**Cuadro I**).

En relación a la proporción de osteogénesis por campo, en el grupo experimental fue de 80.0% y en el grupo control sólo del 20.0% (**Cuadro I**).

Los resultados obtenidos en las 20 ratas con ovariectomía y sometidas al estímulo mecánico, 16 de ellas manifestaron la presencia de OB, y para el grupo de comparación sin estimulación mecánica sólo 4 presentaron dicho efecto, obteniendo un riesgo relativo (RR) de 4.0 con intervalos de confianza al 95% de 1.62 a 9.87 ($p \leq 0.0005$) (**Cuadro II**).

Discusión

La deficiencia estrogénica en la mujer mayor de 60 años de edad es la causa más frecuente de osteoporosis causando una pérdida de masa ósea entre el 1 y 2% por año después de la menopausia.

Heaney¹¹ propone que los estrógenos ejercen un efecto tónico inhibitorio en el esqueleto a la acción de la paratohormona y es por ello que la deficiencia de estrógenos determina una mayor sensibilidad a la osteoporosis. Por lo que en los tratamientos de osteoporosis se han administrado dietas hipercalóricas, con alto contenido de calcio, fósforo y vitamina D, con el fin de elevar las cifras de calcio sérico y disminuir los niveles de paratohormona. La pérdida de matriz ósea en

las parálisis neurológicas, reposo prolongado y osteoporosis se han tratado mediante dietas con las cuales se obtiene una remodelación ósea en el 9.8% y 15% de los pacientes en comparación con el 80% que se obtiene en este trabajo con la estimulación mecánica.

La estimulación de baja frecuencia y gradientes de voltaje (30 Hz a 100 V/cm) producen una reducción de la osteoporosis en los fémures de ratas aunque tienen el inconveniente de ser una aplicación local y originan, en el 44% de los casos exostosis en el sitio de aplicación de los electrodos.⁷

La estimulación mecánica tiende a aplicar vibraciones a lo largo del esqueleto columnar de una manera generalizada al aplicarse en las patas de la rata, lográndose una formación de osteoide en el 80% de los casos.

El tratamiento de los sujetos con osteoporosis con hormonas anabólicas, ejercicio y medidas generales durante largos períodos parece detener el progreso de la osteoporosis, pero no restablece la densidad normal de los huesos.¹² Esto sugiere fuertemente que el desbalance hormonal puede ser solamente un factor predisponente en la osteoporosis del estado senil.

El factor determinante real puede residir en diferentes cambios bioquímicos, mecánicos y estructurales que ocurren en la matriz orgánica del tejido óseo. Estas alteraciones representarían sólo un aspecto de los cambios involutivos que se llevan a cabo en mayor o menor grado en todo el cuerpo. Sobre estas bases, se entiende que la osteoporosis del estado senil y/o postmenopáusico se ha considerado algunas veces como una atrofia irreversible e involucional de los huesos. Actualmente se está buscando una solución a través de terapia génica.

Conclusiones

- La diferencia en la matriz ósea demostrada por el estudio morfológico y determinada por el número de pixeles fue mayor en las ratas a las cuales se les aplicó estímulo mecánico.
- Se obtuvo un riesgo relativo de 3.0 veces más, la formación de matriz ósea con la presencia de osteoblastos en las ratas sometidas a estímulo mecánico que en aquéllas a las cuales no se les aplicó dicho estímulo, con intervalos de confianza al 95% de 1.62 a 9.87.
- El promedio de conteo de osteoblastos en las ratas con estimulación mecánica fue de 16 mientras en el grupo control fue de 9.
- La proporción de formación de matriz ósea en el grupo experimental fue de 80.0% y de 20.0% en el grupo control.

Cuadro I.

Resultados obtenidos en ratas sometidas a ovariectomía y estímulo mecánico seis meses después.

Variable	Estímulo mecánico	
	Sí	No
Área de matriz ósea*	6,117	3,166
Promedio de osteoblastos**	16	9
Proporción de osteogénesis por campo	80%	20%

Fuente: Estudio de Investigación

*Expresada en pixeles

** Conteo por campo

Cuadro II.

Formación de matriz ósea y presencia de osteoblastos en ratas sometidas a ovariectomía.

Formación de osteoblastos	Estímulo mecánico		Riesgo relativo	IC al 95%
	Sí	No		
No	4	16	—	—
Sí	16	4	4.0	1.62 a 9.87

Fuente: Estudio de investigación

Chi² con corrección de Yates $p < 0.0005$

Referencias

1. Cruz-González I, Cisneros-Dreinhofer F, Salazar-Pacheco R, Tejeida-Landeros A. Costos institucionales y dificultades en la atención de los pacientes con fracturas por osteoporosis. *Acta Ortop Mex* 2002; 16: 292-295.

2. Gómez GF. Morbilidad de fracturas en mayores de 50 años. *Rev Mex Ortop Traum* 1988; 2: 114-117.
3. Caballero MJ, Mahedero G, Hernández R, Álvarez JL, Rodríguez J, Rodríguez I, et al. Effects of physical exercise on some parameters of bone metabolism in postmenopausal women. *Endocr Res* 1996; 22: 131-8.
4. Iskran AP. The etiology of fractured hips in females. *Am J Public Health Nations Health* 1968; 58(3): 485-490.
5. Kanis JA, Pitt F. Epidemiology of osteoporosis. *Bone* 1992; (Suppl. 1): S7-15.
6. Harris WW, Moyen BJ, Thrasher EL 2nd, Davis LA, Cobden RH, MacKenzie DA, et al. Differential response to electrical stimulation: A distinction between induced osteogenesis in intact tibiae and the effect on fresh fracture defects in radii. *Clin Orthop Relat Res* 1977; 124: 31-40.
7. Hassler CR, Cumming KD, Clark LC. Augmentation of bone healing via electrical stimuli. En: Brighton, C.T. Black J. and Pollack S.R. (eds): *Electrical Properties of Bone and Cartilage*. New York, Grune and Stratton, 1979.
8. Chen YC, Bab I, Mansur N, Muhlard A, Shteyer A, Namdar-Attar M, et al. Structure-bioactivity of C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide (OGP-10-14). *J Pept Res* 2000; 56: 147-156.
9. Matsumoto H, Ochi M, Abiko Y, Hirose Y, Kaku T, Sakaguchi K. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted into the femur of rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2000; 11: 354-360.
10. Coupron P, Meunier PJ. Bone Histomorphometry. Second International Workshop Paris. *Armor Montague* 1977: 39-53.
11. Heaney RP, Recker RP, Saville PD. Menopausal changes in bone remodeling. *J Lab Clin Med* 1978; 92(6): 964-70
12. Terrés-Speziale A. Edad ósea: estimación densitométrica y metabólica. *Rev Mex Patol Clín* 2002; 49: 7-14.

