

Radiopacidad conservada en huesos de ratas deficientes en cobre *

Brem, J.J.¹; Van Rey, J.P.²; Trulls, H.E.¹; Ortíz de Rus, L.M.³; Pochon, D.O.¹; Brem, J.C.¹

¹ Cátedra de Biofísica, ² Servicio de Diagnóstico por Imágenes del Hospital de Clínicas,

³ Laboratorio de Análisis Físico-Químicos, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE,

Sargento Cabral 2139, (3400) Corrientes, Tel/Fax 03783-434372,

E-mail: fisbiol@vet.unne.edu.ar.

Resumen

Brem, J.J.; Van Rey, J.P.; Trulls, H.E.; Ortíz de Rus, L.M.; Pochon, D.O.; Brem, J.C.: Radiopacidad conservada en huesos de ratas deficientes en cobre. La integridad estructural del colágeno óseo depende del entrecruzamiento normal que existe entre sus precursores, requiriendo para ello de la acción de la actividad enzimática de la peptidil-lisil-oxidasa. Esta enzima cobre-dependiente, presente en la matriz conjuntiva extracelular, transforma la función ϵ -amina en ϵ -aldehído de los residuos de lisina del colágeno y elastina, con el propósito de formar uniones cruzadas. Por esta razón, el cobre juega un rol importante ya que en los tejidos deficientes esta conversión está alterada, impidiendo un normal entrecruzamiento de las fibras y provocando fragilidad y baja resistencia del tejido óseo. De los microelementos habitualmente presentes en el organismo animal, cinc, cobre y manganeso se revelan como esenciales para mantener un normal desarrollo del esqueleto. En el ensayo se utilizaron 45 ratas machos de la cepa Wistar de 80 a 90 días de edad, agrupadas en 3 lotes según tratamiento, las cuales durante 270 días recibieron una dieta compuesta por 70% de leche de vaca (entera en polvo) y 30% de harina de maíz, normalizándose sus tenores de hierro y cobre, excepto este último en el lote con deficiencia primaria de cobre. Al lote con molibdenosis (deficiencia secundaria de cobre) se le suministró tetratiomolibdato de amonio en el agua de bebida a razón de 3 mg/100ml. El tejido hepático de los dos lotes tratados mostró bajo contenido de cobre, así como elevados tenores de molibdeno en el lote que recibió altas dosis del mismo. A nivel histopatológico, las lesiones óseas, observadas solo en animales con exceso de Mo, se localizaron a nivel de la placa epifisiaria de crecimiento. No hubo diferencias significativas en la concentración de elementos minerales en el tejido óseo (calcio, fósforo inorgánico, magnesio y manganeso), con excepción del cobre en ambos lotes deficientes. Esto explicaría la no alteración de la radiopacidad de las imágenes radiográficas, que fueron normales en todos los animales bajo ensayo.

Palabras clave: radiopacidad ósea, deficiencia de cobre, molibdenosis, rata.

INTRODUCCIÓN

El cobre juega un rol esencial en el tejido óseo a través de la actividad de enzimas involucradas en la síntesis de colágeno y por ende en los procesos de formación de la matriz orgánica del hueso^{9,17}. La integridad estructural del colágeno depende del entrecruzamiento entre sus precursores, requiriendo para ello de la acción de la peptidil-lisil-oxidasa. Esta enzima cobre-dependiente, presente en la matriz conjuntiva extracelular, transforma la función ϵ -amina en ϵ -aldehído de los residuos de lisina de colágeno y elastina, con el propósito de formar uniones cruzadas^{1,13}. En los tejidos deficientes en cobre esta conversión está dañada, impidiendo el normal entrecruzamiento de las

fibras, lo que provoca fragilidad y baja resistencia en el colágeno óseo.

En ruminantes alimentados sobre pasturas deficientes en cobre se han observado fracturas espontáneas de huesos, no habiéndose siempre evidenciado correlación entre la concentración de cobre óseo y la severidad de las lesiones. Es dificultoso comparar las concentraciones de elementos trazas encontradas en hueso por varios investigadores, debido a los diferentes métodos de preparación de las muestras, tipo de análisis y huesos muestreados. En ciertas áreas de los Estados Unidos^{6,8}, Canadá⁷ y Nueva Zelandia⁵, quedó demostrado que el ganado era incapaz de formar un hueso normal sin la suplementación de cobre.

Muchos desórdenes esqueléticos debidos a deficiencias de elementos trazas han sido reconocidos a partir de imágenes radiológicas, pero pocas investigaciones los han relacionado con parámetros de la

* Trabajo financiado en parte por la Secretaría General de Ciencia y Técnica, UNNE.

química sanguínea y uso de técnicas nucleares para su estudio dinámico. La radiología detecta solo un desbalance entre la formación y la resorción de tejido óseo, pero no diferencia estos dos procesos en forma independiente. De los elementos presentes en el organismo animal, cinc, cobre y manganeso han sido considerados como esenciales para mantener un normal desarrollo del esqueleto^{10, 16, 18}.

El objetivo del trabajo fue determinar si la alteración de la matriz orgánica del hueso, presente en las deficiencias primaria y secundaria de cobre, es acompañada por cambios de su radiopacidad a los rayos X.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 45 ratas machos de la cepa Wistar de 80 a 90 días de edad, agrupadas en forma aleatoria en diferentes lotes según tratamiento y alojados en jaulas *ad-hoc* con no más de 5 animales cada una. Durante 270 días recibieron una dieta compuesta por 70% de leche de vaca (entera en polvo) y 30% de harina de maíz. Realizado el análisis químico de la dieta para conocer su contenido mineral, fue necesario normalizar los tenores de hierro y cobre adicionando 145 mg de citrato de hierro/kg de alimento (para lograr 30 a 40 ppm) y 98 mg de sulfato de cobre/kg de alimento (para llevarlo hasta 8 a 10 ppm); esta última sal no fue agregada en los lotes con deficiencia primaria.

A los lotes con deficiencia secundaria de cobre (molibdenosis) se le suministró además 54 mg/l de tetratiomolibdato de amonio (TTMo, PM = 260,20 con 36,87% de Mo) en el agua de bebida, ya que pruebas de toxicidad previas indicaron que tal concentración era la ideal para provocar molibdenosis experimental³. Teniendo en cuenta que por cada gramo de alimento ingerido se consumen 2 ml de agua, estos lotes fueron sometidos a un desafío de 40 ppm de Mo dietario. En la Tabla 1 se esquematiza la forma en que los lotes bajo ensayo recibieron los tipos de dietas utilizadas.

Al final del ensayo todos los animales fueron sacrificados por *sangría a blanco*, previa anestesia vía intraperitoneal con hidrato de cloral a dosis de 300 mg/kg. Realizada la necropsia, se extrajo el hígado para su desecación y posterior análisis químico; también fueron separados los miembros anteriores y posteriores para efectuar estudios radiológicos.

Se tomaron imágenes radiográficas de miembros anteriores y posteriores de cada uno de los lotes. Se utilizó un aparato de rayos X marca REMS 100R y las mejores condiciones de trabajo encontradas fueron: 30 KV – 1,5 mA/s (5 mA en 0,3 s), 1 mm de foco, 80 cm de distancia foco-film y película tipo Kodak de granulado fino. Las placas fueron digitalizadas mediante scanner Umax Astra 1200S con una resolución de 300 dpi y almacenadas en formato JPG. Estas fotografías digitalizadas fueron procesadas con un programa que permitió la observación comparativa de las imágenes pertenecientes a los diferentes grupos.

Tabla 1: Esquema de tratamientos según dietas recibidas por los distintos lotes.

alimento base	testigos	deficiencia 1 ^{ra} Cu	deficiencia 2 ^{ra} Cu
(+Fe+Cu)	si	–	–
(+Fe sin Cu)	–	si	–
(+Fe+Cu+TTMo)	–	–	si

Las concentraciones de cobre y molibdeno en hígado, así como los niveles de hierro del alimento, fueron valoradas por espectrofotometría de llama de absorción atómica y los resultados expresados sobre base de materia seca. A esos efectos se utilizó un espectrofotómetro GBC Modelo 932 AB Plus, considerándose como valores de referencia a los guarismos publicados previamente por otros investigadores^{11, 12}.

En el análisis estadístico, las variables cuantitativas continuas (cobre, molibdeno) fueron objeto de análisis de la variancia mediante un software estadístico (Statistix 3.5, 1991), para un diseño completo al azar a un criterio de selección, utilizándose un $\alpha = 5\%$ para aceptar la hipótesis nula. Las variables cualitativas (si–no), como presencia de anomalías en las imágenes radiográficas, fueron procesados con tests no–paramétricos a partir de datos tabulados por dietas, utilizándose como prueba comparativa el test de homogeneidad *chi-cuadrado* (χ^2) a partir de tablas de contingencias¹⁵.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tejido hepático de los dos lotes tratados mostró bajo contenido de cobre. El lote que solo recibió altas dosis de molibdeno también reveló altos niveles de dicho oligoelemento. Los valores obtenidos en el lote testigo y en animales con deficiencias primaria y secundaria de cobre, se muestran en la Figura 1.

En las Figuras 2 y 3 se pueden observar en forma comparativa las imágenes radiográficas de miembros anteriores y posteriores de ratas de los lotes bajo ensayo, donde no se pudieron apreciar lesiones ni anomalías. Sin embargo, en el lote con molibdenosis, histopatológicamente fueron detectadas importantes

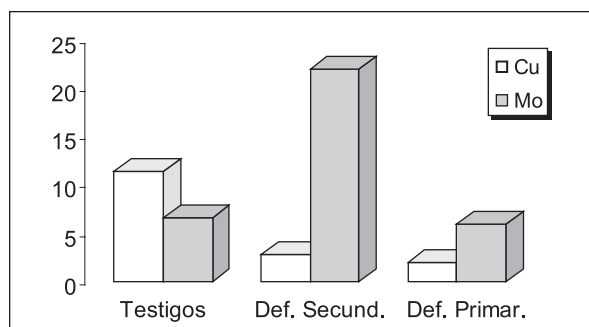


Figura 1: Concentraciones de cobre y molibdeno hepático, expresados en ppm (materia seca).

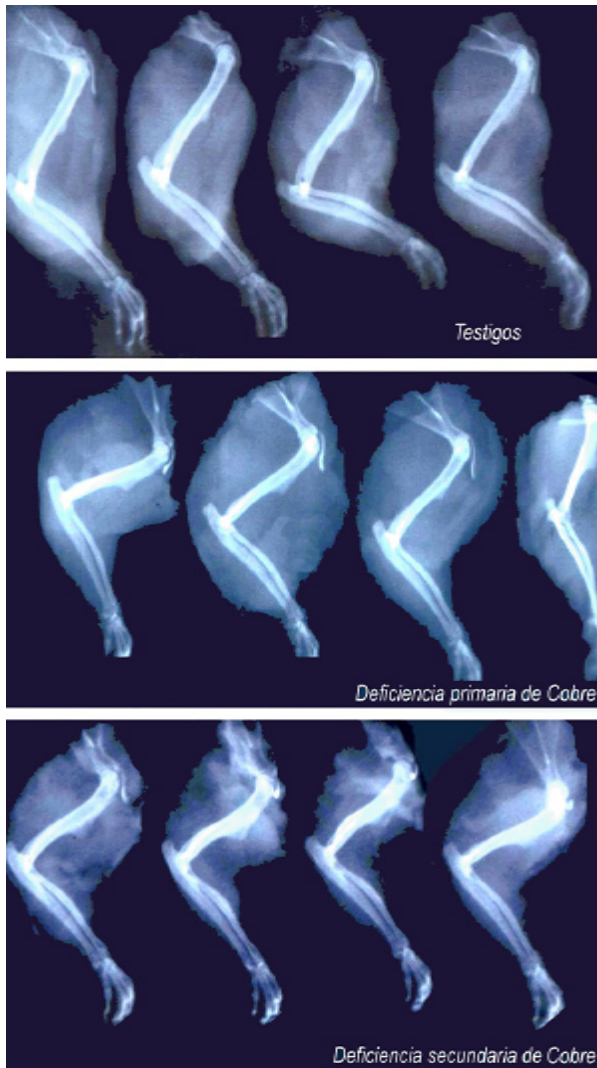


Figura 2. Imágenes radiográficas de miembros anteriores en los tres lotes de ratas colocados comparativamente.

lesiones óseas a nivel de la placa epifisiaria de crecimiento ², aunque no se registraron diferencias significativas en la concentración de elementos minerales en el tejido óseo (calcio, fósforo inorgánico, magnesio ni manganeso), con excepción del cobre, que fue bajo en ambos lotes deficientes ⁴.

La invariabilidad de los principales componentes minerales del hueso explicaría la no alteración de la radiopacidad de las placas radiográficas. En este sentido, el valor de las imágenes radiográficas es discutible porque su interpretación es generalmente dificultosa cuando los cambios estructurales son de escasa magnitud, amén de estar influenciados por la subjetividad del observador. No obstante, los rayos X son capaces de detectar desbalances entre la formación y la resorción de tejido óseo, aunque no diferencian estos dos procesos en forma independiente.

Se concluye que, en ratas bajo las condiciones del presente estudio, las deficiencias de cobre tanto primarias como secundarias, no fueron capaces de alterar

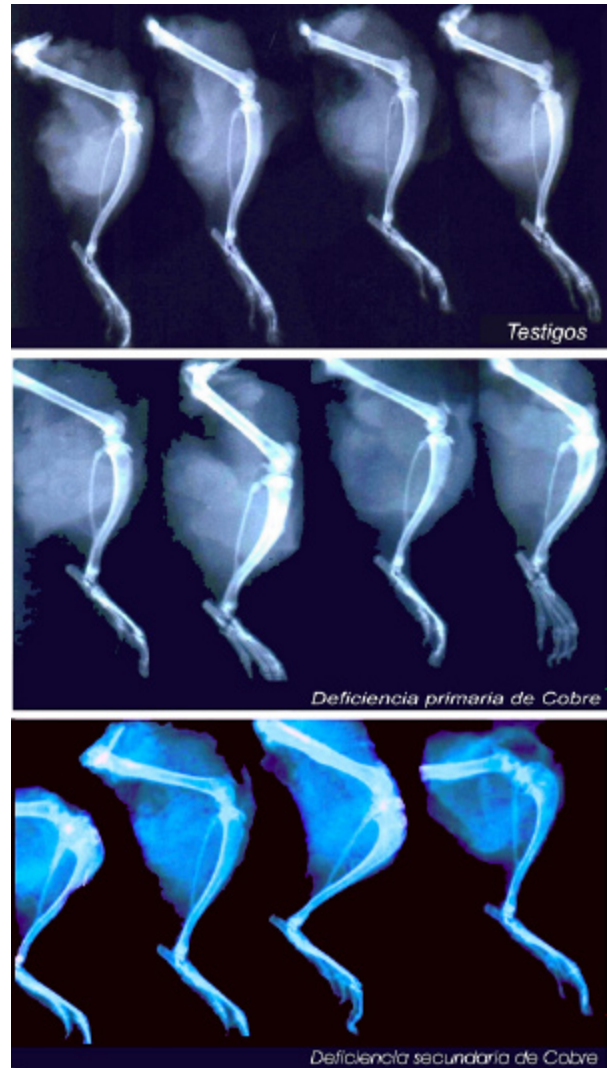


Figura 3. Imágenes radiográficas comparativas de miembros posteriores en los tres lotes de ratas.

la radiopacidad de las imágenes radiográficas de los huesos.

Agradecimientos

A los Med.Vet. J.C. Sampietro y P.A. Zeinsteger, por la valiosa colaboración prestada en la realización del ensayo.

Abstract

Brem, J.J.; Van Rey, J.P.; Trulls, H.E.; Ortíz de Rus, L.M.; Pochon, D.O.; Brem, J.C.: Conserved radiopacity of bone from rats with copper deficiency. Structural integrity of bone collagen depends on the normal crosslinking of its fibers, as well as the enzymatic activity of peptidil-lysyl-oxidase. This enzyme is present in the conjunctive extracellular matrix, and performs the transformation of ϵ -amine into ϵ -aldehyde residues of lysine in collagen and elastin, which is a necessary step for the crosslinking formation. Copper has a crucial importance, as its lack leads to an

increased fragility and decreased resistance of bone. Furthermore, zinc, copper and manganese are essential for the normal development of the skeleton. On this assay, 45 male Wistar rats, 3 months-old, were grouped in three lots. Animals were fed using a balanced diet (70% milk powder, 30% corn flour) with standardized iron and copper levels. The latter was not administered to one group (primary copper deficiency lot). On the group with molybdenosis (copper secondary deficiency), ammonium tetrathiomolybdate was administered in drinking water (3 mg/100 ml). Liver tissue samples from the two lots had decreased copper levels. On the group with high molybdenum intake, bone alterations were observed at the epiphyseal plate. No significant differences were observed in the concentration of bone minerals (calcium, inorganic phosphorus, magnesium and manganese), except for copper in the lots with primary and secondary deficiencies. This could explain the absence of alterations in the radiopacity of the radiographic images

Key words: bone radiopacity, copper deficiency, molybdenosis, rat.

REFERENCIAS

1. **Borel JP, Randoux A, Maquart FX, Le Peuch C, Vaileyre J.** 1989. *Bioquímica Dinámica*, Ed. Panamericana, Buenos Aires.
2. **Brem JJ.** 2003. Aspectos radiológicos, densitométricos, histopatológicos y bioquímicos relacionados al tejido óseo en ratas con deficiencias primaria y secundaria de cobre. *Tesis doctoral presentada a la Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA*, Buenos Aires, Argentina, 73 p.
3. **Brem JJ, Pochon DO, Trulls HE.** 2002. Toxicidad del heptamolibdato y tetratiomolibdato de amonio en ratas. *Rev. Vet.* 10/11: 3–6.
4. **Brem JJ, Ortiz de Rus ML, Trulls HE, Pochon DO, Picot JA, Brem JC.** 2003. Comportamiento de la concentración mineral en huesos de ratas deficientes en cobre. *Anales de la Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la SGCYT-UNNE*, Corrientes, Argentina, Comunicación V-27.
5. **Cunningham IJ.** 1950. Copper and molybdenum in relation to disease of cattle and sheep in New Zealand. In: *Copper metabolism* (McElroy WD, Glass B Ed.), John Hopkins Press, Baltimore, p. 246–273.
6. **Davis GK, Kidder RW, Becker RB.** 1953. Relation of copper and molybdenum to cattle nutrition. *Florida Agric. Exp. Sta. Bull.* 513: 52–50.
7. **Drysdale RA.** 1979. Investigation of the severity, extent, type and treatment of copper deficiency in beef cattle in northwestern Manitoba. *M. Sc. Thesis, University of Manitoba*, Winnipeg, USA.
8. **Irwin MR, Poulos PW, Smith BP, Fisher GL.** 1974. Radiology and histopathology of lameness in young cattle with secondary copper deficiency. *J. Comp. Path.* 84: 611–621.
9. **Jackson SF.** 1957. The fine structure of developing bone in the embryonic fowl. *J.R. Soc. Sci. B.* 146: 270–280.
10. **Leach RM.** 1976. Metabolism and function of manganese. In: *Trace Elements in Human Health and Disease* (Sprasad A Ed.), Academic Press, New York, p. 235–247.
11. **McDowell LR, Conrad JH, Ellis GL, Loosli JK.** 1984. *Minerales para Rumiantes en pastoreo en Regiones Tropicales*, Ed. Cooperative Extensión Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, USA, 92 p.
12. **Mitruka BM, Rawnsley HM.** 1984. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, Ed. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, p. 83–91.
13. **Rucker RB, Parker HE, Rogler JC.** 1969. The effects of copper on collagen crosslinking. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 34: 28–32.
14. **Smith MS, Fisher GL, Poulos PW, Irwin MR.** 1975. Abnormal bone development and lameness associated with secondary copper deficiency in young cattle. *JAVMA* 166: 682–688.
15. **Sokal RR, Rohlf FJ.** 1969. *Biometric*. Ed. Freeman, San Francisco, USA.
16. **Underwood EJ.** 1977. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, 4th ed., Academic Press, New York.
17. **Vaughan JM.** 1970. *The Physiology of Bone*, Clarendon Press, Oxford.
18. **Walravens PA.** 1980. Nutritional importance of copper and zinc in neonates and infants. *Clin. Chem.* 26: 185–189.