

## ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

# CONTROL DE LA TETANIA EN MODELOS QUIRÚRGICOS DE HIPOCALCEMIA EN RATAS.

Maela Lupo,<sup>1</sup> Alfredo Rigalli A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. <sup>2</sup>CONICET.

### Resumen

La remodelación ósea es un proceso bajo el control de un complejo mecanismo que involucra factores endócrinos, autócrinos y parácrinos. La hipocalcemia tiene en parte el control de la remodelación ósea por modificación de los niveles de parathormona (PTH). La disminución de la acción de PTH produce un estado de baja remodelación ósea. La disminución de la función paratiroidea se puede lograr en la rata por ablación simultánea de tiroides y paratiroides (tiroparatiroidectomía: TPTX) o por ablación de las glándulas paratiroides (paratiroidectomía: PX). TPTX es una cirugía de baja complejidad y requiere administración posterior de hormonas tiroideas en agua de bebida. PX requiere más entrenamiento pero no la administración de tiroxina. En ambos casos la hipocalcemia es el signo indicador del éxito de la ablación, cuyo valor es cercano o inferior a 7.5 mg/dl. La búsqueda de modelos de hipocalcemia para obtener estados de baja remodelación ósea ha demostrado que la tetania asociada a la hipocalcemia es la complicación más importante en el mantenimiento de los animales y la realización de cirugías posteriores. Se realizaron cirugías de PX, TPTX y ablación de una de las dos glándulas paratiroides

(1/2PX). Los resultados hallados indican que la PX y 1/2PX producen hipocalcemia más severa que TPTX y la 1/2PX produce un modelo de hipocalcemia muy severa pero transitoria. La administración de gluconato de calcio en agua de bebida evita la presencia de tetania durante el mantenimiento de los animales, pero no durante cirugías con anestesia general. La administración de gluconato de calcio intramuscular evita la tetania que se produce como consecuencia de la anestesia general.

**Palabras claves:** tetania, paratiroidectomía, tiroparatiroidectomía, calcemia.

### Summary

#### MANAGEMENT OF TETANY IN HYPOCALCEMIC MODELS IN THE RAT.

*Bone remodeling and calcemia decrease when levels of PTH are low. This situation can be obtained by ablation of either thyroid and parathyroid glands (TPTX) or parathyroid glands (PX). Both surgeries produce calcemia lower than 7.5 mg/dl. After these surgeries, hypocalcemia and tetany make difficult the follow up of rats under treatments and*

\* Dirección postal: Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral. Facultad de Ciencias Médicas. Santa Fe 3100, (2000) Rosario, SF, Argentina. Correo electrónico: [arigalli@fmedic.unr.edu.ar](mailto:arigalli@fmedic.unr.edu.ar).



surgeries. The objective of this work was the development of hypocalcemic models with controlled tetany. After PX, TPTX and ablation of one parathyroid gland (1/2PX), calcemia (before and, 5 and 20 days after surgery), tetany and survival were assessed. Results were expressed as mean±SEM and differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Experimental groups ( $n=8$  each): G1: PX, G2: PX+calcium gluconate (CaG) in the drinking water. After 5 days rats of G2 were subjected to general anesthesia and divided into G2a: without treatment, and G2b: with intramuscular CaG administration. G3: PX+CaG in the drinking water+ water without CaG, G4: 1/2PX+CaG in the drinking water, G5: TPTX. Calcemia (mg/dl) before surgery was not different among groups. Calcemia after 5 days was lower in all groups when compared to the day of surgery (G1:4.8±0.7, G2:7.6±0.8, G2a:7.2±0.5, G2b:7.7±1.3, G3:5.9±0.8, G4:3.5±4.9, G5:7.6±0.3). Rats of G1 developed tetany, not present in the other groups. G2a and G2b had tetany after anesthesia. The intramuscular injection of CaG in G2b reversed tetany. Calcemia at day 5 were lower in G1 and G4 compared to the other groups. Conclusions: 1- PX and 1/2PX produced a more severe hypocalcemia than TPTX. 2- The administration of CaG in the drinking water prevented tetany, but not under anesthesia. 3- 1/2 PX is a model of transitory severe hypocalcemia. 4- The intramuscular administration of CaG reversed tetany.

**Key words:** tetany, parathyroidectomy, thyroparathyroidectomy, calcemia.

## Introducción

El tejido óseo se origina por dos mecanismos: osificación intramembranosa y osificación endocondral. Ambos procesos conducen a la formación de un mismo tipo de hueso, que luego se mantiene y renueva por el proceso de remodelación ósea. La remo-

delación ósea consta de dos procesos básicos: la resorción ósea (remoción de tejido óseo) y la formación de nuevo tejido. Los osteoclastos son las principales células encargadas de la resorción.

En las BMU (unidades metabólicas básicas del hueso) los procesos de resorción y formación ósea están acoplados, es decir la resorción y la formación proceden en igual magnitud. Estos procesos mantienen la estructura del hueso, removiendo hueso antiguo, con defectos o con microfracturas y rellenando con tejido óseo nuevo.<sup>1</sup> En algunas patologías el proceso de remodelación puede estar aumentado o disminuido respecto del valor normal.

La remodelación ósea es un proceso bajo un complejo mecanismo que involucra factores endócrinos, autócrinos y parácrinos. La calcemia tiene indirectamente el control de la remodelación ósea por modificación de los niveles de parathormona. Los niveles elevados y bajos de parathormona se asocian a estados de alta y baja remodelación ósea, respectivamente.

La disminución de la acción de la parathormona produce en la rata un estado de baja remodelación ósea, que se acompaña de disminución de la calcemia. Los estados de baja remodelación ósea son alcanzados básicamente por supresión de la secreción de hormona paratiroidea, acción que es alcanzada con facilidad a través de procesos quirúrgicos. La tiroparatiroidectomía (TPTX)<sup>2</sup> y la paratiroidectomía (PX)<sup>3</sup> son dos cirugías de baja complejidad y alto éxito en el laboratorio de investigación con roedores. Sin embargo la hipocalcemia y la tetania asociada son complicaciones habituales, que influyen en el mantenimiento de los animales y la realización de posteriores intervenciones quirúrgicas. La descripción de la frecuencia de presentación de esta complicación, los tratamientos y resultados son habitualmente descriptas sin muchos detalles en la bibliografía específica.

El objetivo de este trabajo fue establecer pro-

cedimientos tendientes a controlar la tetania asociada a la hipocalcemia severa antes o durante posteriores intervenciones experimentales en modelos animales con baja remodelación ósea.

## Materiales y Métodos

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 7 semanas provistas por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Los animales se alojaron en jaulas colectivas (hasta 5 animales por jaula) con agua y alimento balanceado (Gepsa, Argentina) *ad libitum*.

Durante el tiempo que duraron los experimentos las ratas se encontraron en un ambiente termostatzado a 20-27 °C, con ciclo luz oscuridad 12 hs y circulación de aire filtrado a intervalos de tiempo programados. Durante el mantenimiento de los animales y las cirugías se procedió de acuerdo a las normas internacionales aceptadas para el manejo de animales.<sup>4</sup> En la elección de los modelos y el número de los animales se siguió el principio de las 3Rs de Russell and Burch.<sup>5</sup> Los modelos quirúrgicos utilizados en estos trabajos fueron parte de otros trabajos realizados en el laboratorio y de ninguna manera demandaron sacrificio extra de animales. Al finalizar los experimentos los animales fueron sacrificados por inyección intracardíaca de una solución acuosa saturada de KCl, estando el animal bajo profundo efecto sedativo y anestésico.<sup>6</sup>

Cuando se requirió anestesia general se realizó preanestesia con 1.2 mg de xilazina/100 g de peso corporal y 3 mg ketamina/100 g de peso corporal por vía subcutánea. Luego de alcanzar la sedación y relajación se administraron 3 mg ketamina/100 g de peso corporal por vía intramuscular, previa desinfección de la zona con iodopovidona y anestesia local con 1 mg de clorhidrato de lidocaína/100g de peso corporal.

Treinta minutos antes de cada cirugía se

administró por vía intramuscular en el muslo izquierdo 3 mg ceftriaxona/100 g de peso corporal y posterior a las cirugías se realizó analgesia con 2.5 mg de diclofenac/100 g de peso corporal por vía subcutánea. El material quirúrgico utilizado fue pretratado con un lavador ultrasónico, lavado con detergente, enjuagado con agua corriente y destilada, secado a 37 °C y finalmente esterilizado durante 180 minutos a 140 °C en un horno de esterilización dentro de cajas de acero inoxidable. Algodón, hisopos, hilos y agujas, guantes, campos fenestrados y ropa para la cirugía, se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 120°C.

### Paratiroidectomía

Se realizó PX<sup>3</sup> en 24 ratas, con anestesia general como se detalló anteriormente. Luego de rasurar y desinfectar con iodopovidona la zona, se realizó una incisión mediana en el cuello hasta exponer la glándula tiroidea. Las glándulas paratiroides, ubicadas en la porción cefálica-distal de la glándula tiroidea, fueron extirpadas con microforceps y bisturí, utilizando una lupa estereoscópica. Luego de la ablación bilateral, se suturó músculo y piel. Finalmente, se lavó con clorhexidina y desinfectó con iodopovidona. Antes de la cirugía se realizó antibioticoterapia y luego analgesia, como se detalló anteriormente. Luego los animales fueron alojados en jaulas individuales hasta su recuperación. El éxito de la cirugía fue verificado por medio de la medición de calcemia 48-72 horas luego de la operación. Los niveles de calcio en plasma menores de 7.5mg/dl indican el éxito de la cirugía. La calcemia se midió por espectrofotometría utilizando un equipo comercial (Calcio color AA Wiener Lab, Rosario, Argentina).

### Hemiparatiroidectomía

Se realizó la ablación de la glándula paratiroides derecha (1/2 PX) a 8 ratas, siguiendo los pasos descriptos para la paratiroidectomía bilateral.



### Tiroparatiroidectomía

La TPTX<sup>2</sup> se realizó a 8 ratas siguiendo los mismos pasos detallados para la PX. En la misma se extirparon glándulas tiroideas y paratiroides.

Se estudiaron los siguientes grupos experimentales:

G1: 8 ratas PX sin tratamiento para controlar la calcemia.

G2: 8 ratas PX tuvieron un tratamiento de gluconato de calcio al 1% en el agua de bebida (GluCa) por 20 días para controlar la hipocalcemia severa y la tetania. Al 5to día este grupo se dividió en dos subgrupos que fueron sometidos a cirugía con anestesia general:

G2a: sin tratamiento, y G2b: que recibió gluconato de calcio 10% por vía intramuscular.

G3: 8 ratas PX tuvieron acceso a dos bebederos, uno con agua corriente y el otro con gluconato de calcio al 1% en el agua de bebida, durante 20 días.

G4: 1/2PX se mantuvo con gluconato de calcio al 1% en el agua de bebida.

G5: TPTX sin tratamiento.

### Resultados

Los valores de calcemia hallados en los diferentes grupos experimentales, así como la presencia de tetania se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Calcemia antes, a los 5 y a los 20 días de la cirugía.**

Grupos	Calcemia, mg/dl			% de animales con tetania	
	Basal	Día 5	Día 20	Al día 20	Durante anestesia general
G1	10,3±0,01	4,8±0,7 <sup>a</sup>	2,1±1,3 <sup>a</sup>	100	
G2	9,3±0,6	7,6±0,8 <sup>a</sup>		0	
G2a		7,2±0,5		0	100
G2b		7,7±1,3		0	0
G3	10,3±0,4	5,9±0,8 <sup>a</sup>	3,5±0,4 <sup>a,b</sup>	0	
G4	10,3±1,3	3,5±4,8 <sup>a</sup>	10,3±1,0 <sup>b</sup>	0	
G5	10,0±0,2	7,6±0,3 <sup>a</sup>	7,7±0,3 <sup>a</sup>	0	

Los resultados se muestran como medias±SEM. Los resultados se compararon con ANOVA medidas repetidas o T de Student para datos apareados (3 o 2 grupos, respectivamente). <sup>a</sup> diferencias significativas respecto de calcemia basal, <sup>b</sup> diferencias respecto al 5º día dentro de un mismo tratamiento.

Se observó un descenso significativo de la calcemia a los 5 días de todas las cirugías. La hipocalcemia alcanzada fue significativamente mayor en animales con PX que no recibieron tratamiento con gluconato de calcio (G1) y en animales con hemiparatiroidectomía

(G4), aun con el aporte de gluconato de calcio en el agua de bebida. Los animales con cirugía PX que recibieron gluconato de calcio mantuvieron valores significativamente menores de calcemia hasta los 20 días sin presencia de tetania. Por otra parte, los animales

con hemiparatiroidectomía normalizaron los valores de calcemia a los 20 días. Esto podría deberse a hipertrofia de la glándula remanente, aunque esto no se comprobó visualmente al día de realizar la eutanasia. Las ratas con TPTX no necesitaron el aporte de calcio en el agua y la calcemia, si bien significativamente menor que los valores basales, no alcanzó niveles semejantes a los hallados en cirugías de ablación de paratiroides.

Por otro lado, cuando los animales PX tratados con gluconato de calcio en el agua, fueron sometidos a anestesia general, presentaron un 100% de tetania, asociada a la anestesia y esto se revirtió por la inyección intramuscular de gluconato de calcio previo a la anestesia.

## Discusión

La presencia de tetania en modelos quirúrgicos es descripta en forma variable en diferentes trabajos. Mientras que en algunos no se observó tetania en ratas adultas con PX<sup>7</sup> si se observó en ratas normales con TPTX.<sup>8</sup> Contrariamente en otros trabajos con ratas TPTX, no se describen episodios de tetania<sup>9</sup> aun con dieta hipocálcica.<sup>10</sup> En algunos trabajos que incluyen PX bilateral no se menciona la tetania ni su forma de control aun en experimentos de varias semanas.<sup>11</sup> El cloruro de calcio al 1% en el agua de bebida ha sido utilizado luego de la PX para evitar la tetania.<sup>12</sup> Otro suplemento utilizado con éxito en el agua de bebida es el gluconato de calcio en concentraciones 1-5%.<sup>13</sup> La interrelación entre tiroides y paratiroides es habitualmente subestimada. Existe información que indica que esta interrelación es aún poco conocida. Experimentos llevados a cabo con el calcimimético NPS R-568, en ratas con PX demostraron que la hipocalcemia inducida por el déficit de PTH es exacerbado por la presencia de calcitonina.<sup>14</sup> Estos resultados podrían explicar la hipocalcemia marcada observada

en el grupo de animales con hemiparatiroidectomía. La PX en ratas produce un rápido decaimiento de los niveles de PTH en sangre, siendo ésta indetectable 1 h después de la cirugía.<sup>15</sup> Sin embargo la hipocalcemia inducida por la infusión de EDTA en ratas PX se recupera rápidamente, no pudiendo atribuirse estos cambios a la función renal o a que la PTH esté aún ligada a sus receptores. Estos resultados indican la existencia de mecanismos aún desconocidos involucrados en el control minuto-minuto de la calcemia. La ablación unilateral de paratiroides produce un rápido descenso de los niveles de PTH a un 50% del valor basal. Existen trabajos donde se utiliza esta técnica, sin embargo no se reporta tetania, posiblemente por la corta duración de los experimentos.<sup>16</sup>

## Conclusiones

1. La PX y 1/2PX producen hipocalcemia más severa que TPTX. La administración de gluconato de calcio en el agua de bebida disminuye la tetania en los animales, pero no durante la anestesia general.
2. La 1/2PX produce un modelo de hipocalcemia muy severa y de pocos días de duración.
3. La administración de gluconato de calcio al 1% en el agua de bebida evita la presencia de tetania durante el mantenimiento de los animales, pero no durante cirugías con anestesia general.
4. La administración de gluconato de calcio al 10% por vía intramuscular revierte la tetania que está asociada a la anestesia en animales con deficiente función paratiroidea.

## Agradecimientos

El trabajo fue financiado por CONICET PIP 5018.

(Recibido y aceptado: noviembre de 2009)



## Referencias

1. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000; 16:191-220.
2. Rigalli, A, Di Loreto V. Thyroparathyroidectomy. En: *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat* (Rigalli A, Di Loreto V, eds). Taylor and Francis Group, CRC Press, Boca Ratón, USA. 2009; 153-55.
3. Lupo M, Rigalli A. Parathyroid glands. En: *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat* (Rigalli A, Di Loreto V, eds). Taylor and Francis Group, CRC Press, Boca Ratón, USA. 2009; 157-8.
4. Guide to the care and use of experimental Animals, Volume 1 (Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, eds). Canadian Council on Animal Care, 1993.
5. Russell WM, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Methuen; London, 1959; 238.
6. Rigalli A, Di Loreto V. Euthanasia. En: *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat* (Rigalli A, Di Loreto V, eds). Taylor and Francis Group, CRC Press, Boca Ratón, USA. 2009; 31-2.
7. Soejima Y. Effect of parathyroidectomy on enamel formation of incisors in rats. *Fukuoka Shika Daigaku Gakkai Zasshi* 1990; 17: 271-95.
8. Wilson JM, Grossman M, Thompson AR, et al. Somatic gene transfer in the development of an animal model for primary hyperparathyroidism. *Endocrinology* 1992; 130: 2947-54.
9. Blakely P, Vaughn DA, Fanestil DD. Effects of calcium-modulating hormones on thiazide receptor density. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 1052-7.
10. Yamamoto M, Murakami T, Nishikawa M, et al. Hypocalcemic effect of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin in the thyroparathyroidectomized rat. *Endocrinology* 1998; 139: 4012-5.
11. Axelson J, Persson P, Gagnemo-Persson R, Håkanson R. Importance of the stomach in maintaining calcium homeostasis in the rat. *Gut* 1991; 32: 1298-302.
12. Nickerson PA, Conran RM. Parathyroidectomy ameliorates vascular lesions induced by deoxycorticosterone in the rat. *Am J Pathol* 1981; 105: 185-90.
13. Vaziri ND, Deng G, Liang K. Hepatic HDL receptor, SR-B1 and Apo A-I expression in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1462-6.
14. Fox J, Lowe SH, Conklin RL, Petty BA, Nemeth EF. Calcimimetic compound NPS R-568 stimulates calcitonin secretion but selectively targets parathyroid gland Ca(2+) receptor in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290: 480-6.
15. Lewin E, Wang W, Olgaard K. Rapid recovery of plasma ionized calcium after acute induction of hypocalcaemia in parathyroidectomized and nephrectomized rats. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 604-9.
16. Lewin E, Almaden Y, Rodriguez M, Olgaard K. PTHrP enhances the secretory response of PTH to a hypocalcemic stimulus in rat parathyroid glands. *Kidney Int* 2000; 58: 71-81.