

ARTÍCULO ORIGINAL / *Original*

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN MODERADA CON L-ARGININA EN LA PRESERVACIÓN DEL HUESO TRABECULAR DE RATAS LONG EVANS QUE HAN SIDO SOMETIDAS A OVARIECTOMÍA

René Valdez-Mijares^{*✉}, Alejandra Quintana-Armenta[✉], Lidia Ruiz-Rosano[✉], Rebecca E. Franco-Bourland[✉], Víctor M. Domínguez-Hernández[✉], Víctor M. Araujo-Monsalvo[✉], Yaaziel Melgarejo-Ramírez[✉]

Laboratorio de Biotecnología, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra. Ciudad de México, México.

Resumen

Con el objetivo de evitar la pérdida de hueso trabecular en ratas Long Evans jóvenes que han sido ovariectomizadas bilateralmente (OVX), administramos L-arginina (L-Arg), un precursor del óxido nítrico. Veinticuatro ratas de 250–300 g de peso corporal (pc) fueron divididas en tres grupos uniformes: OVX simulado (SIM), OVX control y OVX tratado con L-Arg (OVX L-Arg).

A lo largo de 28 días, el grupo tratado recibió en el agua de beber una dosis de L-Arg de 6% peso/volumen (p/v) equivalente a 1,74 g/día mientras que las OVX y SIM recibieron agua pura como vehículo. Los exámenes bioquímicos (fosfatasa alcalina sérica, desoxipirridinolina urinaria y óxido nítrico), los análisis histológicos de tibia (densidad, grosor del hueso trabecular y médula ósea) y los exámenes biomecánicos del fémur (rigidez, resistencia, fuerza y carga máxima) no mostraron cambios significativos. **Conclusión:** la dosis administrada de L-Arg durante 28 días en el agua de beber no conservó la integridad del hueso trabecular de las ratas OVX L-Arg.

Palabras clave: osteoporosis, modelo de rata, ovariectomía, rata Long Evans.

EFFECT OF MODERATE SUPPLEMENTATION WITH L-ARGININE ON THE PRESERVATION OF TRABECULAR BONE IN LONG EVANS RATS THAT HAVE UNDERGONE OVARIECTOMY

Abstract

With the aim of preventing trabecular bone loss in young Long Evans rats that have undergone bilateral ovariectomy (OVX), we administered L-arginine (L-Arg), a precursor of nitric oxide. Twenty-four rats weighing 250–300 g were divided into three uniform groups: sham OVX (SIM), control OVX, and OVX treated with L-Arg (OVX L-Arg). Over a 28-day period, the treated group received a 6% weight/volume (w/v) dose of L-Arg in their drinking water, equivalent to 1.74 g/day, while the OVX and SIM groups received plain water as a vehicle. Biochemical tests (serum alkaline phosphatase, urinary deoxypyridinoline, and nitric oxide), histological analyses of the tibia (density, trabecular bone thickness, and bone marrow), and biomechanical tests of the femur (stiffness, resistance, strength, and maximum load) showed no significant changes. **Conclusion:** The dose of L-Arg administered for 28 days in drinking water did not preserve the integrity of the trabecular bone in OVX L-Arg rats.

Keywords: osteoporosis, rat model, ovariectomy, Long Evans rat.

*E-mail: valdezmi@gmail.com



Introducción

La osteoporosis es una enfermedad esquelética que se evidencia a través de la disminución de la densidad de los huesos y las alteraciones de la microestructura del tejido óseo, incrementando así la posibilidad de fracturas que dañan principalmente al hueso cortical y trabecular, dificultando la recuperación y afectando principalmente a los adultos mayores;¹ sus consecuencias representan un reto para el sistema de salud mexicano, porque afecta a cerca de 10 millones de individuos debido a su alta morbilidad y presión socioeconómica.^{2,3}

La L-arginina (L-Arg) es un aminoácido semiesencial que interviene en el metabolismo óseo y sus procesos celulares, tales como la generación de nitrógeno, la formación de proteínas, la generación de óxido nítrico (NOx), y en el sistema inmunológico. Se sabe que el uso oral de L-arginina en dosis altas puede mejorar la masa ósea en modelos de ratas ovariectomizadas (OVX) basándose en que la L-arginina estimula la síntesis del óxido nítrico (NOS) que, a su vez, produce NOx, el cual es un regulador de balance entre los osteoblastos y los osteoclastos.^{4,5}

Dado su doble efecto en los reguladores fisiológicos de la reestructuración ósea, la L-arginina tiene la característica de potenciar la formación ósea en comparación con la resorción ósea y, consecuentemente, de aumentar la masa ósea.⁶

Diversos estudios proponen que la suplementación con L-Arg es una estrategia novedosa de tratamiento que puede disminuir la pérdida de densidad mineral ósea causada por la osteoporosis, ya que podría promover la osteoblastogénesis y reducir la osteoclastogénesis. Partiendo de estas observaciones, nosotros deseamos investigar y comprobar que un mayor consumo del aminoácido podría minimizar la pérdida de hueso en un modelo de rata OVX.^{7,8,5}

Por lo tanto, en este estudio planteamos la hipótesis de que un elevado consumo

oral de L-arginina en ratas Long Evans OVX podría prevenir y tratar la pérdida de hueso, ocasionada por la ausencia de estrógeno. Específicamente proponemos que, si la L-arginina es un sustrato crucial para la generación de NOx y este a su vez un regulador de la actividad osteoclástica, entonces una mayor producción de NOx de manera controlada podría regular la actividad de osteoblastogénesis promoviendo de esta manera la conservación y ganancia de hueso.

Material y métodos

Se incluyeron 24 ratas hembras Long Evans de 9-11 semanas de edad y 250-300 g de peso corporal (pc) que fueron mantenidas y manipuladas conforme a la norma oficial mexicana, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio NOM-062-Z00-1999 (NOM 062-Z00-1999).⁹ Se habituaron durante dos semanas previas al estudio en jaulas metabólicas a 20-21 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, y se alimentaron con una dieta comercial pulverizada. Se mantuvo libre acceso a agua purificada. Después de la cirugía de OVX, el consumo de agua y alimento se registró diariamente durante 28 días.

Antes del procedimiento quirúrgico, las ratas fueron distribuidas en 3 grupos homogéneos con relación a su pc: un grupo de ratas ovariectomizadas-simuladas (SIM) que sirve como grupo control del experimento, un grupo de ratas ovariectomizadas (OVX) y un grupo de ratas ovariectomizadas tratadas con L-Arg (OVX L-Arg) inmediatamente después de la cirugía. Las ratas tratadas con L-Arg (Sigma, A8094-100G) fueron suplementadas con una dosis de L-Arg del 6% peso/volumen (p/v) en el agua de bebida durante 28 días consecutivos, tiempo que duró el experimento. Los grupos SIM y OVX recibieron solo agua potable como vehículo por la misma vía.

Para los grupos OVX y OVX L-Arg, 16 ratas fueron ovariectomizadas bilateralmente por aproximación dorsal bajo anestesia con una combinación de ketamina/xilazina de 16,2 mg/2,5 mg por 250 g de pc. Los ovarios fueron extirpados y los oviductos cuidadosamente ligados con Mononylon 3-0® y regresados a su lugar en el abdomen. La incisión fue suturada en capas: para el músculo se usó Vicryl® y para la piel, Mononylon® 3-0.

Para el grupo SIM, 8 ratas fueron sometidas a una ovariectomía simulada (SIM); es decir, se realizó el mismo procedimiento quirúrgico exponiendo brevemente los ovarios y regresándolos a la cavidad abdominal. Para prevenir infecciones después de la cirugía se les administró a todas las ratas operadas (SIM, OVX y OVX L-Arg) 0,5 mL de bencilpenicilina vía intramuscular y 200 mg/kg pc de paracetamol vía oral en el agua de beber durante 24 horas como tratamiento del dolor; las ratas fueron devueltas a su caja para su recuperación y se mantuvieron en observación durante 24 horas.¹⁰

Al finalizar los 28 días de tratamiento se pesaron las ratas, y, bajo anestesia, se extrajo la sangre por punción cardíaca. Se diseccionaron úteros, timos, bazos, tibias y fémures. Los pesos de estos tejidos fueron obtenidos en húmedo. Los úteros, timos y bazos fueron puestos en formol al 10% para su conservación.

Para la técnica de histología, las tibias fueron extraídas y limpiadas de todo tejido blando y puestas en formalina tamponada al 10% para su fijación durante 48 horas, posteriormente fueron descalcificadas en solución de ácido nítrico (HNO₃) al 6% preparada con agua desionizada por 4 semanas. Posteriormente fueron deshidratados en diferentes soluciones de alcoholes ascendentes e incluidos en parafina. Los bloques de parafina fueron cortados a 5 mm de grosor en un micrótopo. Los cortes fueron teñidos con la técnica de hematoxilina & eosina para su posterior análisis descriptivo.

Los fémures fueron limpiados de todo tejido blando puestos en gasa y humedecidos en solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9% para ser almacenados a -20 °C hasta realizarles la prueba biomecánica de flexión a 3 puntos en una máquina universal de ensayos 4502® (Instron Inc., Canton, MA con celdas de carga de 1 kilonewton (kN)) donde se midió: rigidez (RI), resistencia (RE), energía con carga máxima (EM) y energía total (ET).

Para la medición de desoxipiridinolina (DPD) al final de los 28 días de tratamiento con L-Arg, la DPD fue medida por un método de ELISA usando el equipo Metra Quidel® (San Diego, CA) y normalizada por mmol de creatinina urinaria sin desproteinizar, usando el método de punto final (Wiener Lab).

La orina fue colectada en frascos de vidrio que contenían una mezcla de antibiótico, penicilina V potásica (equivalente a 400.000 UI/mg), estreptomicina y amikacina en cantidades de 1 mg de cada uno /mL de orina recolectada con el fin de evitar contaminación bacteriana durante las 16 horas de su recolección. Durante este período, las ratas se mantuvieron en ayuno, aunque tuvieron libre acceso a agua y sin tratamiento.

Los niveles urinarios de nitratos y nitritos, utilizados como un índice indirecto de los metabolitos del óxido nítrico (NOx), se determinaron mediante el método descrito por Miranda, et. al. (2001).¹¹ La fosfatasa alcalina (FA), marcador de formación ósea, se determinó en el suero por un método colorimétrico cinético (Diagnostic®-Chemical Ltd de México, S.A).

Las evaluaciones estadísticas se realizaron con el método de Kolmogorov-Smirnov y la significancia se corrigió con la prueba de Lilliefors.

Los ensayos de comparación entre los grupos experimentales fueron hechos con la prueba de ANOVA y la comparación por pares fue hecha con la prueba de Bonferroni. Todas las evaluaciones estadísticas fueron hechas con el programa estadístico SPSS Statistic V.26®.



Resultados

Comprobación de la ovariectomía

La tabla 1 muestra cómo veintiocho días después de las cirugías y/o tratamientos con L-Arg, las ratas de los tres grupos fueron sacrificadas, se disecaron y pesaron en húmedo los úteros, timos y bazos. Se observó que en las ratas OVX y OVX L-Arg se atrofiaron los cuerpos uterinos ($p<0,05$) comprobando con ello el éxito de la OVX. Además, se hipertrofiaron el timo y el bazo en comparación con los tejidos de las ratas SIM ($p<0,05$). Estos valores corroboran el efecto de la ausencia de estrógenos sobre el cuerpo del animal de experimentación (Tabla 1).

Consumo de agua, alimento y peso corporal

La tabla 2 muestra el aumento de pc, la ingesta de agua y alimento de las ratas en los tres grupos experimentales durante un período de 28 días consecutivos.

Durante 28 días consecutivos inmediatamente después de la cirugía de OVX, el grupo tratado con L-Arg recibió en el agua de beber una dosis del 6% (p/v). El consumo de agua del grupo OVX L-Arg fue de 28 mL/día, lo que derivó en una ingesta diaria de L-Arg de 1,7 g/día. Los grupos OVX y SIM solo recibieron agua potable y su consumo fue muy similar, finalmente no hubo diferencias significativas entre los tres grupos en cuanto a su consumo de agua.

Tabla 1. Efecto del tratamiento/suplementación con L-arginina sobre el peso de útero, timo y bazo después de 28 días postratamiento

TEJIDO	SIM	OVX	OVX L-Arg
Útero mg (n=8)	667,03±57,35	199,57±13,47*	198,43±21,06*
Timo mg (n=8)	374,62±23,03	591,95±32,85*	611,42±46,93*
Bazo mg (n=8)	632,01±14,15	735,75±32,58 ***	744,43±45,54*, **

Los resultados se expresan en mg de tejido húmedo, como la media $\pm$ ES. Para los grupos OVX L-Arg vs. OVX no hubo diferencias significativas entre ellos; OVX L-Arg y OVX vs. SIM fueron significativamente diferentes en todos los casos (* $p<0,05$), para el caso del bazo, OVX y OVX L-Arg vs. SIM fueron significativamente diferentes (** $p<0,05$).

Tabla 2. Efecto del tratamiento/suplementación con L-arginina sobre el consumo de agua, alimento y diferencia de pc de ratas OVX 28 días postratamiento

Parámetro	SIM	OVX	OVX L-Arg
Consumo de agua en mL (n=8)	26,2±0,8	28,2±1,3	28,8±1,2
Consumo de alimento en g (n=8)	21,3±0,7	21,9±0,3	19,9±0,4
Peso ganado g (n=8) ^a	13,7±3,8	54,5±3,0*	47,0±3,2*

Valor promedio de las mediciones de 28 días de tratamiento

^a Valor promedio de las diferencia inicial y final de peso corporal ganada al final de los 28 días de tratamiento.

Los valores son expresados como el promedio de la media $\pm$ ES. No hubo diferencias significativas para el promedio de peso ganado entre las ratas OVX y OVX L-Arg; ambos grupos fueron significativamente diferentes cuando son comparados con respecto al grupo SIM, (* $p<0,05$).

El consumo de agua y alimento no fue estadísticamente significativo (ns).

En relación con el consumo de alimento de los grupos de ratas SIM, OVX y OVX L-Arg se observó que, en los tres grupos experimentales, su consumo fue similar. El consumo de alimento no cambió con la dosis probada de L-Arg.

El aumento de pc al final de los 28 días de tratamiento de los grupos OVX y OVX L-Arg fue mayor con respecto al grupo SIM*($p<0,05$), el cual ganó menos peso.

Se observó que el grupo OVX tratado con L-arginina presentó una variación pequeña en la ganancia de pc con relación al grupo OVX, aunque no fue significativa.

Biomarcadores óseos

Con el objetivo de analizar el efecto de tratamiento con L-Arg sobre el nivel de NOx ng/ μ mol creatinina, desoxipiridinolina (DPD)

marcador de resorción ósea y fosfatasa sérica (FA), en ratas ovariectomizadas (Tabla 3). Los biomarcadores óseos se analizaron en muestras de orina y suero 28 días después del tratamiento. Se observó que los valores de NOx, DPD y FA de los grupos OVX y OVX L-Arg no mostraron diferencia significativa con respecto a los valores del grupo SIM, aunque los grupos OVX y OVX L-Arg presentaron una tendencia al alta en los 3 parámetros medidos con respecto al grupo de ratas SIM.

Peso y longitud de tibia y fémur

Veintiocho días después de las cirugías y/o tratamientos con L-Arg, las ratas de los tres grupos fueron sacrificadas; las tibias y fémures fueron extraídos, medidos y pesados en húmedo (Tabla 4). No se encontraron cambios

Tabla 3. Efecto del tratamiento/suplementación con L-arginina sobre los niveles de NOx y fosfatasa alcalina en suero y DPD en orina 28 días postratamiento

Parámetro	SIM	OVX	OVX L-Arg
NOx ng/ μ mol creatinina*	79,75 $\pm$ 12,78	103,12 $\pm$ 21,18	91,91 $\pm$ 20,73
DPD nmol/mmol de creatinina*	48,3 $\pm$ 4,32	150,81 $\pm$ 4,49	215,98 $\pm$ 20,62
FA IU/L	59,0 $\pm$ 4,25	106,50 $\pm$ 9,45	107,88 $\pm$ 7,35

Todos los resultados se expresan como la media $\pm$ ES. Los grupos OVX L-Arg vs. OVX no fueron significativamente diferentes entre sí, tampoco con respecto al SIM $p<0,05$. *La creatinina fue medida en orina de 24 horas.

Tabla 4. Efecto del tratamiento/suplementación con L-arginina sobre el peso y la longitud de tibia y fémures 28 días después del tratamiento

TEJIDO	SIM		OVX		OVX L- Arg	
	Peso (mg)	Longitud (mm)	Peso (mg)	Longitud (mm)	Peso (mg)	Longitud (mm)
Tibias (n=8)	528,66 $\pm$ 25,36	37,86 $\pm$ 0,16	54711 $\pm$ 585	3778 $\pm$ 0,26	54071 $\pm$ 764	3813 $\pm$ 0,13
Fémur (n=8)	808,58 $\pm$ 3,88	35,08 $\pm$ 0,16	813,56 $\pm$ 6,78	35,08 $\pm$ 0,10	775,37 $\pm$ 11,81	35,50 $\pm$ 0,14

Los pesos de las tibias y fémures fueron tomados en húmedo y se expresan como el promedio de la media $\pm$ ES; para el caso de las longitudes de las tibias y de los fémures el promedio de la media $\pm$ ES. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.



significativos en peso ni longitud de las tibias y fémures entre los grupos SIM, OVX y OVX L-Arg. Se observó que la OVX en las ratas Long Evans jóvenes adultas no produjo cambios sobre el peso ni la longitud de tibias y fémures. Los parámetros no cambian cuando la dieta se complementa con L-Arg administrada en el agua de beber durante 28 días.

Prueba biomecánica de resistencia a la flexión del fémur

La tabla 5 nos muestra cómo la suplementación con L-Arg afecta los parámetros biomecánicos de RI, RE, EM, ET en los fémures de ratas OVX que recibieron tratamiento con L-Arg, empleando la prueba biomecánica de flexión (doblamiento) a 3 puntos, que es un indicador de la integridad del hueso cortical. Se observó que no existieron diferencias de cambio significativas de estos parámetros estudiados, entre los grupos de ratas OVX y SIM con respecto al OVX tratado con L-Arg, indicando que la integridad del hueso cortical de los fémures de los tres grupos de ratas era similar entre sí.

Histología de tibias

La figura 1 muestra los cortes histológicos de la microarquitectura del hueso trabecular de la metáfisis proximal de tibia de ratas SIM (A), OVX (B) y OVX L-Arg administrada en el

agua de beber (C). Brevemente, el análisis de las micrografías nos da una descripción cualitativa de los tres grupos.

El grupo SIM muestra sin alteración alguna las estructuras de la placa de crecimiento (PC), las espículas (Ep) o hueso trabecular, la esponjosa primaria y secundaria (debajo de la placa de crecimiento), la médula ósea (M) y el tejido adiposo (*). En el caso del grupo OVX se observó mayor área de resorción ósea, una malla trabecular menos densa ($\triangleright \blacktriangleleft$), menor crecimiento de las espículas o trabéculas en dirección hacia la cavidad medular y abundante tejido adiposo (*).

De igual manera, el grupo OVX L-Arg mostró marcadas diferencias como una malla trabecular menos densa, mayor área de resorción, menor crecimiento de las trabéculas en dirección hacia la cavidad medular y abundante grasa; estas alteraciones no se modificaron con la suplementación de L-Arg en una dosis de 1,74 g/día en el agua de beber (C).

Por otra parte, en la figura 2 se muestra el análisis descriptivo de las estructuras de la placa de crecimiento de las tibias proximales de los grupos de ratas SIM (A), OVX (B) y OVXL-Arg (C). Observamos que las 3 zonas principales de células que la componen: zona de reserva (R), proliferativa (P) e hipertrófica (Hp) no mostraron variaciones morfológicas entre las estructuras celulares de los tres grupos de ratas SIM, OVX

Tabla 5. Efecto del tratamiento/suplementación con L-arginina sobre las propiedades biomecánicas de hueso cortical del fémur 28 días postratamiento

Parámetro	SIM	OVX	OVX L-Arg
Rigidez (N/mm)	549,22±9,55	514,58±18,34	506,02±18,69
Resistencia (N)	146,55±4,03	149,38±4,74	155,87±2,54
Energía en carga máxima (N-mm)	59,83±3,89	51,30±4,38	45,30±3,34
Energía total (N-mm)	61,53±3,83	53,0±4,44	54,70±4,84

Los resultados se expresan como la media $\pm$ ES de las mediciones de rigidez, resistencia, energía en carga máxima y energía total aplicadas al hueso cortical del fémur. No hubo diferencias significativas $p < 0,05$ entre los grupos. Las ratas OVX L-Arg no presentan cambios con respecto a los grupos SIM y OVX.

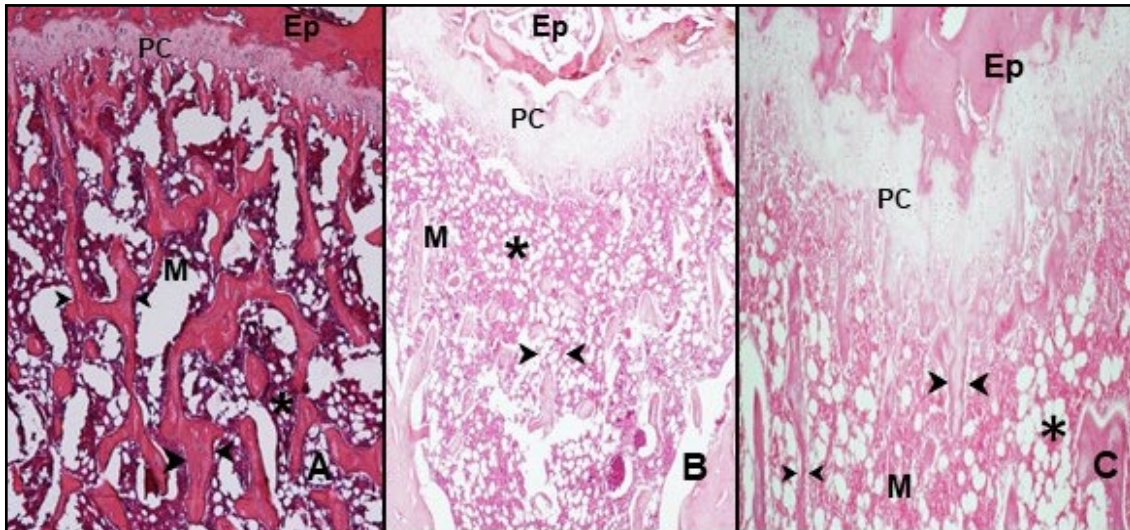


Figura 1. Micrografías de los cortes histológicos de: A) la región proximal de la tibia de ratas SIM, B) ratas OVX y C) ratas OVX L-Arg. La magnificación utilizada en A se logró con el objetivo 4x, en B y en C fue con el objetivo 10x. PC: placa de crecimiento; Ep: espículas; M: médula ósea; *: tejido adiposo; > <: malla trabecular menos densa.

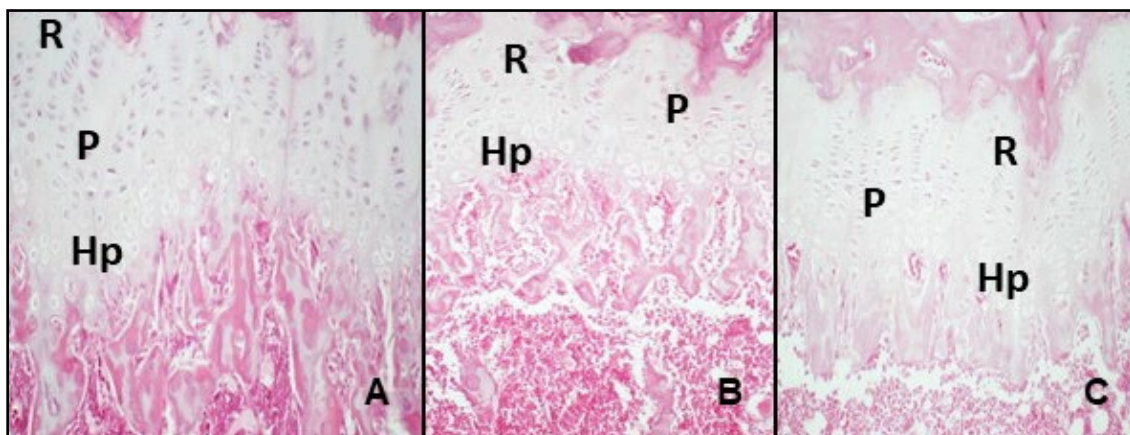


Figura 2. Micrografía de la placa de crecimiento de la tibia proximal de ratas: A) SIM, B) OVX, y C) OVX+L-Arg. De manera descriptiva se aprecian las 3 diferentes zonas que forman la placa de crecimiento: zona de reserva (R), zona proliferativa (P) y zona hipertrófica (Hp). La magnificación utilizada en A, B y C se realizó con el objetivo 20x.

y OVX tratados con L-arginina. En general, solo en los casos OVX (B) y OVX L-Arg (C), se observó que las células de la zona hipertrófica (condrocitos) no continúan el crecimiento ni la

elongación de la espícula ósea desde de la cavidad medular hacia la esponjosa primaria; solo el grupo de ratas SIM no presentó alteración o cambio en sus estructuras en general.



Discusión

La ovariectomía en ratas es una intervención quirúrgica que implica la eliminación de los ovarios. Se emplea a menudo como modelo en estudios preclínicos para simular la disminución de hormonas esteroides (progesterona y estrógeno) y, por ende, representar la menopausia, así como las pérdidas de hueso tanto cortical como trabecular; una situación muy similar a la reducción de masa ósea que experimentan las mujeres durante la posmenopausia.¹²⁻¹⁴

Al final de los 28 días y después de sacrificar al animal de experimentación, los grupos OVX presentaron atrofia del útero en comparación con el grupo SIM. La atrofia del útero es un punto clave que demuestra la eficacia y buenos resultados del modelo de OVX.^{12,13}

Otro punto clave del modelo de OVX en ratas hembra es el aumento significativo del peso corporal y la mayor presencia de tejido adiposo en los animales de experimentación. Con esto demostramos que nuestro modelo simula las características de la posmenopausia en los seres humanos, como el aumento en la ganancia de peso corporal que experimentan, destacando que este incremento se debe a la falta de estrógeno y no a un consumo elevado del alimento.¹³

Cuando las ratas OVX fueron tratadas con L-Arg de forma oral durante 28 días, observamos que estos parámetros de estudio no fueron alterados ni modificados en comparación con los del grupo SIM.

Existe evidencia en la literatura científica que sugieren que el consumo oral de L-arginina podría prevenir las pérdidas de hueso cortical y/o trabecular causadas por la OVX en ratas.^{5,7,8,15-17}

Para determinar el efecto de la suplementación oral con L-Arg en una dosis de 1,74 g/día dada en el agua de beber durante 28 días, estudiamos parámetros en suero, orina y tejido óseo, todos relacionados con la calidad del hueso.

La DPD es un indicador bioquímico de resorción ósea que evalúa el colágeno óseo

degradado. Observamos que los niveles de DPD en orina se elevaron significativamente en las ratas OVX como lo muestra Choi (2009) en su estudio,¹⁵ indicándonos que existe una actividad más intensa de los osteoclastos sobre el hueso y aumentando las pérdidas óseas. En nuestro estudio, las ratas OVX y OVX L-Arg presentaron niveles aumentados de DPD en comparación con el grupo SIM. El grupo OVX L-Arg presentó una tendencia a elevarse más con relación al grupo OVX, aunque no fue significativo estadísticamente.

Se ha informado que el NOx (metabolitos del óxido nítrico NO-2 y NO-3) suele medirse en suero como un biomarcador de estrés oxidativo y la función del endotelio; este se encuentra alterado en ratas OVX por la deficiencia de estrógenos. Cuando bajan los niveles de estrógeno, se afecta la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) favoreciendo el estrés oxidativo y, por consiguiente, teniendo efectos sobre el hueso. La administración de su precursor, la L-Arg podría elevar los niveles de NOx en suero y hacer que aumente la densidad ósea controlando los efectos de la OVX; sin embargo, en nuestro estudio, las ratas OVX y OVX tratadas con L-Arg no presentaron disminución de niveles de NO, que resultaron incluso más elevados que los del grupo SIM.¹⁸

La fosfatasa alcalina (FA) es un biomarcador en suero utilizado para evaluar la formación ósea. En el modelo de ratas OVX, los niveles de FA se alteran significativamente por la falta de estrógenos.¹⁸

En nuestro estudio, el grupo OVX y OVX L-Arg presentan niveles altos de FA que resultan significativos en comparación con el grupo SIM, como ya había sido informado previamente por nuestro grupo.¹⁸

La carencia de estrógeno provoca una ligera disminución de la longitud y peso de los huesos largos (fémur y tibia), del contenido mineral óseo y de la densidad mineral ósea, como lo muestran Yousefzadeh, et. al. (2020).¹³ En relación con la medición de peso y longitud en húmedo de la tibia y el fémur de

los grupos de ratas OVX y OVX L-Arg, nosotros no observamos cambios importantes en estos parámetros; al comparar con el grupo SIM tampoco hubo diferencias importantes, pese a que se han informado alteraciones vinculadas con atrofia en el crecimiento en estos huesos.¹³

El ensayo de flexión a tres puntos es un método estándar en biomecánica que se emplea para examinar las propiedades biomecánicas del hueso cortical, evalúa la rigidez y resistencia mecánica de la diáfisis femoral en ratas OVX.^{19,20}

Este ensayo posibilita la cuantificación de la disminución de calidad ósea que se produce por la falta de estrógenos en el modelo de rata OVX, que se demuestra por una reducción notable en la carga máxima, la rigidez y la energía total que el hueso absorbe.^{19,20}

Durante la prueba, el hueso se lleva a una fractura producida por las cargas aplicadas durante la prueba. En nuestro estudio, los valores de rigidez, resistencia energía en carga máxima y energía total aplicados a los grupos de estudio OVX y OVX L-Arg resultaron ser menores en comparación con lo aplicado al grupo SIM, aunque no representan una alteración significativa. Se observó que la suplementación de 1,74 g/día de L-Arg en el agua de beber a ratas OVX no favoreció la conservación tanto del hueso trabecular (mayor remodelación) como la del cortical en la diáfisis femoral.

La técnica histológica nos mostró la marcada pérdida de hueso trabecular en las ratas OVX. Las alteraciones fueron visibles en la parte proximal de la tibia de estos grupos a los 28 días después de realizada la OVX correspondiendo con lo que indica la literatura.¹³

En nuestro caso usamos la tibia proximal de los tres grupos de ratas estudiadas para llevar a cabo los cortes histológicos y examinar las estructuras internas de la malla trabecular, notando claramente la pérdida de este hueso en los grupos OVX y OVX L-Arg, en comparación con el grupo SIM el cual conservó intacto el hueso trabecular (Figura 1).

El tratamiento, con 1,74 g/día de L-Arg en el agua de beber durante 28 días, no logró evitar la pérdida de hueso trabecular de la tibia proximal del grupo OVX reflejado en el descenso de las trabéculas y un incremento significativo de separación entre ellas.¹³

Finalmente, deseamos resaltar algunos elementos importantes de esta investigación que limitaron nuestros resultados esperados.

La falta de un análisis de histomorfometría ósea mostraría mejor el proceso de remodelación ósea que se llevó a cabo en este modelo de ratas Long Evans OVX, pero con las mediciones de marcadores del metabolismo óseo, técnicas histológicas y análisis biomecánicos esperamos dar una aproximación general y detallada del recambio óseo que está experimentando el modelo, ya que varios de estos parámetros han sido documentados en otros estudios que aquí fueron citados y que incluso utilizaron la L-Arg para abordar la pérdida ósea, utilizando también ratas hembras como modelo experimental.

Estos estudios han informado que las dosis de L-arginina que se administran a los animales de experimentación con resultados positivos se encuentra en un rango de 1 a 15 g/kg del peso del animal. Las vías de administración pueden ser a través de la alimentación, intraperitoneal, u oral usando el agua para beber.²¹⁻²⁷

Nosotros propusimos que un período de 28 días y una dosis de 1,74 g/día de L-Arg, en agua de beber a ratas OVX mostraría efectos positivos en la conservación del hueso trabecular de las tibias, ya que algunos estudios como el de Jiang et. al.²¹ que administran L-arginina en dosis de 0,045 g de L-arginina/1 mL de agua oralmente a ratas durante 28 días presentó efectos positivos sobre el hueso, por lo que justificaba nuestra propuesta. Sin embargo, nuestros resultados fueron lo opuesto indicando con ello que la suplementación oral de L-Arg no resultó benéfica para la conservación del hueso.²¹



Nuestros resultados coinciden con los de Pertusa et. al.²² que administraron 40 mg/día de L-Arg durante 180 días a ratones OVX en el agua de beber y tampoco observaron beneficios en la conservación del hueso.²²

De acuerdo con las investigaciones revisadas en relación con el tiempo de administración de la L-Arg, los períodos de tratamiento oscilan entre 4 y 9 semanas, con dosis que varían entre 1 y 15 g/kg de peso, e informan resultados favorables en la preservación del hueso trabecular bajo estas condiciones.^{4,6,21-27}

Nosotros propusimos evaluar una dosis elevada y en un período de tiempo más corto, tratando de acortar con ello el tiempo de evaluación, teniendo presente que la dosis se encuentra dentro de los rangos experimentales referidos con resultados positivos para el hueso; no obstante, nuestros hallazgos no fueron similares a los publicados.

En consecuencia, planeamos continuar con la investigación y experimentación de otras dosis de L-Arg y tiempos de tratamiento diferentes antes de emitir un juicio de perjuicio de uso alternativo para el tratamiento de las pérdidas de hueso que se sufren por la osteoporosis.

Nuestra perspectiva es perfeccionar nuestras condiciones de estudio para mejorar los resultados que hasta ahora hemos obtenido y así contribuir sobre el conocimiento de los beneficios que el empleo de dosis farmacológicas apropiadas de L-arginina pudiera tener en la conservación y tratamiento de las pérdidas del hueso trabecular.

Conclusión

Nosotros no encontramos resultados favorables al suplementar una dosis elevada de

L-Arg en el agua de beber durante 28 días a rata Long Evans OVX para impedir la pérdida de hueso trabecular.

Recibido: marzo 2026

Aceptado: junio 2026

Publicado: julio 2026

Agradecimiento. Se agradece muy especialmente la participación en el diseño y la verificación de las pruebas estadísticas de este trabajo al Dr. Saúl Renán León Hernández. Unidad de Apoyo a la Investigación. Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra. Ciudad de México. CDMX.

Contribuciones de autores: Conceptualización, Curación de datos, Análisis formal, Redacción- borrador original, Redacción-revisión y edición: RVM, REFB, YMR. Investigación: AQA, LRR, VDH, VAM. Metodología: RVM, REFB, AQA, LRR, VDH VAM. Administración del proyecto, Supervisión: VMR, REFB. Validación, Visualización: RVM, REFB, AQA, LRR, VDH VAM, YMR.

Conflicto de intereses: los autores manifestamos que no presentamos conflictos de intereses en relación con el presente artículo.

Financiamiento. Esta investigación fue realizada dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra. SSA. CDMX. México., con recursos propios del instituto.

Referencias

1. López RA, Saucedo MEM, Valdés MSG, Garza ZR. (2022). Prevalencia de fracturas en adultos mayores Hospital Ángeles Mocel. *Acta Med GA*2022;20(3):250-4. <https://doi.org/10.35366/105728>
2. Secretaría de Salud. Día mundial de la osteoporosis 20 de octubre de 2023. [internet]. Disponible en; <https://www.gob.mx/salud/prensa/345-osteoporosis-afecta-una-de-cada-tres-mujeres-y-uno-de-cada-cinco-hombres-mayores-de-50-anos-inr?idiom=es#:~:text=345.,Salud%20%7C%20Gobierno%20%7C%20gob.mx>
3. INRLGII. [internet]. 2024. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/411-inr-alerta-osteoporosis-afecta-10-millones-de-personas-en-mexico>
4. Saki F, Rahimikashkooli N, Masjedi M, Dastghaib S, Koohpeyma F. Gender-Specific effects of L-arginine supplementation on bone mineral density and trabecular bone volumen in Sprague-Dawley rats; stereological study. *BMC Complement Med Ther* 2024;24(425):1-13. <https://doi.org/10.1186/s12906-024-04736-3>.
5. Visser JJ, Hoekman K. Arginine supplementation in the prevention and treatment of osteoporosis. *Med Hypotheses* 1994;43(5):339-42. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(94\)901139-9](https://doi.org/10.1016/0306-9877(94)901139-9).
6. Guo H, Goa Y, Gu B, Wang J, Liu H. Antiosteoporotic effects of L-arginine in ovariectomized rats. *Biomedicine&Aging Pathology*. 2014; 4(2):117-22. <https://doi.org/10.1016/j.biomag.2014.02.002>.
7. Canintika AF, Dilogio IH, Putera GU, Yafidy M. Oral L-arginine supplementation for fracture healing: a systematic review of preclinical studies. *Acta Orthop Belg* 2022;88(3):609-15. <https://doi.org/10.52628/88.3.7541>.
8. Kamps N, Gerzer R, Heer M. Effects of L-arginine supplementation on bone metabolism. *J Gravit Physiol* 2002; 9(1):179-80.
9. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
10. Foley PL, Kendall VL, Turner V P. Clinical management of pain in rodents. *Comp Med*. 2019;69(6):468-89. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-19-000048>.
11. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001;5(1):62-71. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>.
12. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Mineral* 1991; 15(3):175-92. [https://doi.org/10.1016/0169-6009\(91\)90124-i](https://doi.org/10.1016/0169-6009(91)90124-i).
13. Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. *EXCLI J* 2020; 19:89-107. <https://doi.org/10.17179/excli2019-1990>
14. Luengo-Mateos M, González-Vila A, Torres C AM, Alasaoufi A M, González-Domínguez M, López M, González-García I, Barca-Mayo O. Protocol for ovariectomy and estradiol replacement in mice. *STAR Protocols* 2024; 5;1. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.102910>.
15. Choi MJ. Effects of arginine supplementation on bone mineral density and bone markers in OVX rats. *Korean J Nutr* 2009;42(4):309-17. <https://doi.org/10.4163/kjn.2009.42.4.309>.
16. Fiore CE, Pennisi P, Cutuli MV, Prato A, Messina R, Clementi G. L-arginine prevents bone loss and bone collagen breakdown in cyclosporin A-treated rats. *Eur J Pharmacol* 2000; 408(3):323-6. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00800-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00800-1).
17. Hao YJ, Tang Y, Chen BF, Pei FX. Different doses of nitric oxide donor prevent osteoporosis in ovariectomized rats. *Clin Orthop Relat Res* 2005;435:226-31. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000153990.74837.73>.
18. Valdez-Mijares René, Franco-Bourland RE., Quintana-Armenta A y cols. La



- nitroglicerina no previene la osteopenia en ratas hembras Long Evans adultas jóvenes ovariectomizadas. *Rev Mex Cienc Farm.* 2013;44(2):55-61. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000200009&lng=es.
19. Ayse Guler Okyay, Servet Kavak, Ugur Turktas, Ismet Alkis, Savas Guner, Bunyamin Aksakal. Biomechanical effectss of menopause in ovariectomized rats'femurs. *Gynecol Endocrinol* 2014;30(1):62-5. <https://doi.org/10.3109/09513590.2013.854767>.
 20. Comelekoglu U, Bagis S, Yalin S, et al. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin Rheumatol* 2007; 26:380-4. <https://doi.org/10.1007/s10067-006-0367.2>.
 21. Jiang MY, Cai DP. Oral arginine improves linear growth of long bones and the neuroendocrine mechanism. *Neurosci Bull* 2011;27(3):156-62. <https://doi.org/10.1007/s12264-011-1051-3>.
 22. Pertusa C, Carrasco-García Á, Aliaga R, et al. Effects of L-Arginine on Bone Metabolism: Evidence from In Vitro and In Vivo Models. *Int J Mol Sci* 2025;26(17):8484. <https://doi.org/10.3390/ijms26178484>.
 23. Hanaa H, Hamza AH. Potential role of arginine, glutamine and taurine in ameliorating osteoporotic biomarkers in ovariectomized rats. *Rep Opin* 2009;1:24-35.
 24. Gudyrev OS, Faitelson AV, Sobolev MS, et al. A study of osteoprotective effect of L-arginine, L-norvaline and rosuvastatin on a model of hypoestrogen-induced osteoporosis in rats. 2019. I.P. Pavlov *Russian Medical Biological Herald* 2019;27(3):325-32. <https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2019273325-332>.
 25. Cao S, Li Y, Song R, et al. L-arginine metabolism inhibits arthritis and inflammatory bone loss. *Ann Rheum Dis* 2024;83(1):72-87. <https://doi.org/10.1136/ard-2022-223626>.
 26. Ahmed HH, Eskander F, Mohamed HS, Ahmed BM, Soliman S. Efficacy of certain amino acids in intervention of osteoporosis in ovariectomized rats. *Egypt J Med Lab Sci* 2008;17(2):19-34.
 27. Wang S, Ren Q, Huang Y, et al. Emerging roles of arginine metabolism in skeletal health and disease. *Metabolism* 2026; 175:156451. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2025.156451>.