



Importancia del tiempo de insuficiencia estrogénica en la eficacia de la respuesta ósea a la terapia hormonal en la insuficiencia renal crónica experimental

A. Rodríguez Rodríguez, M. Naves Díaz, C. Díaz Corte, A. González Carcedo, T. Fernández Coto¹ y J. B. Cannata Andía

Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral. Instituto Reina Sofía. ¹Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Oviedo.

RESUMEN

Objetivos: El objetivo de este trabajo fue evaluar, en un modelo animal con insuficiencia renal crónica, la repercusión sobre el metabolismo óseo de diferentes períodos de insuficiencia estrogénica, y la eficacia de su reemplazo con 17β -estradiol-solo o combinado con calcitriol. Como objetivo secundario se estableció valorar la eficacia de la densitometría ósea para predecir cambios en masa ósea por comparación con la histomorfometría.

Material y métodos: se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembras con insuficiencia renal crónica y ovariectomía, que fueron divididas en dos fases de acuerdo con el período de insuficiencia estrogénica al que se sometió a los animales, cuatro semanas (insuficiencia estrogénica larga) y una semana (insuficiencia estrogénica corta). En ambas fases, los animales se dividieron en cuatro grupos de tratamiento a los que se les administró placebo (aceite de maíz), 17β -estradiol, calcitriol o ambos tratamientos combinados. Como grupo control, se utilizó un grupo de animales con insuficiencia renal crónica y función ovárica normal.

Resultados: Este modelo destaca la importancia del período de insuficiencia estrogénica en una posible eficacia del tratamiento. Cuatro semanas de insuficiencia estrogénica conlleva una pérdida de casi todo el entramado trabecular, y una menor posibilidad de recuperación. Por el contrario, tras una semana de insuficiencia estrogénica, si se observó recuperación tras el tratamiento. La utilización de la densitometría ósea permitió predecir los cambios de masa ósea observados en el análisis histomorfométrico.

Palabras clave: Estradiol. Calcitriol. Densitometría. Histomorfometría.

Correspondencia: Dr. Jorge B. Cannata Andía
Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral
Instituto Reina Sofía de Investigación
Hospital Central de Asturias
Julián Clavería, s/n.
33006 Oviedo
E-mail: metoseo@hca.es

IMPORTANCE OF THE ESTROGEN DEPRIVATION PERIOD IN THE EFFECTIVENESS OF THE HORMONAL REPLACEMENT THERAPY IN THE EXPERIMENTAL CHRONIC RENAL FAILURE

SUMMARY

Bone disease develops relatively early in the development of CRF. The aim of this study was to evaluate the repercussion of estrogen insufficiency and the effectiveness of hormonal replacement therapy, after different periods of estrogen deprivation, on bone metabolism in an animal model with chronic renal failure and ovariectomy. A secondary purpose was to evaluate the effectiveness of bone densitometry for predicting changes in bone mass for comparison with bone histomorphometry.

We used Sprague-Dawley rats with chronic renal failure and ovariectomy performed at the same time. Animals were divided into two phases according to the period of estrogen insufficiency, 4 weeks in the long estrogen insufficiency period and 1 week in the short estrogen insufficiency period. In both phases, the animals were divided into four treatment groups receiving placebo (corn oil), 17 β -estradiol (15 μ g/kg body weight/day), calcitriol (10 ng/kg body weight/day) or the combined treatment with estradiol and calcitriol. In both phases, a group of animals with chronic renal failure (normal ovaric function) was used as a control group. The period of treatment was 8 weeks. After this period the animals were sacrificed.

This model emphasizes the importance of the period of estrogen insufficiency in the efficiency of the treatment. Four weeks of estrogen insufficiency resulted in a significant loss of trabecular bone, and less possibility of recovery. After one week of estrogen deprivation a response to the treatment was observed. The utilization of bone densitometry allowed to reproduce changes in bone mass observed afterwards by histomorphometric analysis.

*Key words: **Estradiol. Calcitriol. Densitometry. Histomorphometry.***

INTRODUCCIÓN

La terapia estrogénica sustitutiva previene la pérdida de masa ósea y las fracturas osteoporóticas en mujeres postmenopáusicas¹. Todavía existen dudas acerca del papel de la deficiencia estrogénica en la evolución de la enfermedad ósea en la insuficiencia renal crónica (IRC)². Las pacientes con IRC en hemodiálisis pueden desarrollar el mismo tipo de alteraciones óseas que las observadas en la osteoporosis postmenopáusica³. Como consecuencia de los efectos aditivos de la deficiencia estrogénica, insuficiencia renal y hemodiálisis crónica, el riesgo de sufrir osteoporosis de una mujer postmenopáusica en diálisis puede ser muy superior al de una mujer postmenopáusica con función renal normal². El modesto incremento de masa ósea observado tras la terapia hormonal sustitutiva hace que

su eficacia sea superior como prevención que como tratamiento⁴.

Si bien existen trabajos clínicos que demuestran las peculiaridades de un comienzo precoz y/o tardío del reemplazo hormonal, esos aspectos no han sido específicamente evaluados en un modelo animal en el que se puedan ajustar con mayor precisión el tiempo de insuficiencia y de reemplazo estrogénico.

El objetivo de este trabajo fue evaluar en un modelo experimental, la influencia que tiene el tiempo de mantenimiento de la insuficiencia estrogénica en la respuesta al tratamiento con 17 β -estradiol, solo o combinado con calcitriol. Como objetivo secundario se estableció valorar la eficacia de la densitometría ósea para predecir cambios en masa ósea por comparación con la histomorfometría ósea.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se utilizaron 76 ratas Sprague-Dawley hembras, de entre 3-6 meses de edad, que habían alcanzado su pico de masa ósea⁵. A todas ellas, se les suministró comida y bebida «*ad libitum*». Como alimento se suministró una dieta estándar (Dieta A04, Panlab) que contenía 0,6% de calcio, 0,6% de fósforo y 1.500 UI/kg de vitamina D₃.

Tras una semana de aclimatación en el animalario, los animales se dividieron en dos grupos: a un grupo se le indujo sólo IRC utilizando la técnica descrita por Ormrod y Miller (nefrectomía 7/8)⁶, a otro grupo, además de la IRC se le realizó una ovariectomía bilateral (OVX)⁷ en el mismo acto quirúrgico.

El grupo con IRC+OVX se dividió a su vez en *dos* fases diferenciadas por el *período de insuficiencia estrogénica* al que se sometió a los animales, siendo de 4 semanas en la fase de *insuficiencia estrogénica larga* y de 1 semana en la *fase de insuficiencia estrogénica corta*. Tras estos dos diferentes períodos de insuficiencia estrogénica, los animales de ambas fases se dividieron en 4 grupos de tratamiento:

Grupo 1: Recibió excipiente (aceite de maíz) a dosis de 0,8 ml/kg peso/día (placebo).

Grupo 2: Recibió 17 β -estradiol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). El compuesto activo se disolvió en una pequeña cantidad de etanol y posteriormente se ajustó el volumen con el excipiente hasta una dosis de 15 μ g/kg peso/día (E₂).

Grupo 3: Recibió calcitriol [1 α ,25(OH)₂D₃] (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). El compuesto activo se disolvió en una pequeña cantidad de etanol y posteriormente se ajustó el volumen con aceite de maíz hasta una dosis de 10 ng/kg peso/día.

Grupo 4: Recibió tratamiento combinado de E₂+calcitriol a la misma dosis que los grupos 2 y 3. Todos los tratamientos se administraron mediante inyección intraperitoneal, 5 días por semana durante 8 semanas. Tras este período se procedió al sacrificio de los animales. El grupo al que sólo se le indujo IRC (función ovárica normal) fue utilizado como grupo control.

Estudios complementarios

Análisis bioquímico

En el momento del sacrificio se extrajo sangre y se cuantificaron en suero creatinina, urea, calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, parathormona (PTH) y proteínas

totales, utilizando un autoanalizador multicanal (Hitachi 717, Boehringer Mannheim, Alemania). La PTH se midió utilizando un kit específico de rata, IRMA Rat PTH (Inmunotopics, California, USA).

Densitometría Ósea

La densidad mineral ósea (DMO, g/cm²) se midió en tibia a tres niveles: octavo proximal, octavo distal, y tibia total, con un densitómetro radiológico digital de doble energía (DXA) (Hologic QDR-1000), usando software específico para animales de pequeño tamaño⁸.

Histomorfometría Ósea

Tras el análisis de DMO, la tibia derecha se incluyó en metilmetracrilato. Se obtuvieron secciones de 5 μ m del centro de cada muestra con microtomo Polycut (Reichert-Jung), que fueron teñidas con azul de toluidina al 0,1%, pH = 6.4. Las mediciones se realizaron con microscopio óptico Polyvar (Reichert-Jung) acoplado a una cámara de vídeo digital (Leica Microsystems Mod. Dc-100) conectada a un sistema de análisis de imágenes (Leica Q500IW), software (Leica QWIN standard v.2.3, Leica microsystems). Se hizo lectura ciega de los 6 parámetros histomorfométricos medidos. De ellos, en este trabajo sólo se muestran el volumen trabecular (BV/TV) y la superficie trabecular (BS/TV) totales⁹.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete informático SPSS 8.0 para Windows, y la prueba de Mann-Whitney como test no paramétrico. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas con $p < 0,05$.

RESULTADOS

Análisis bioquímico

El análisis de los diferentes parámetros bioquímicos se muestra en la tabla I. En ambas fases, en el momento del sacrificio, todos los grupos con IRC tenían niveles de urea y creatinina séricas similares entre sí y significativamente superiores a animales de la misma edad con función renal normal (*Fase insuficiencia estrogénica larga*: Urea: 61,7 \pm 12,2 vs

Tabla I. Análisis de diferentes parámetros bioquímicos en suero al final del estudio en los distintos grupos de tratamiento. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar

	Grupos tratamiento	Peso final (g)	Creatinina (mg/dl)	Urea (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	PTH (pg/ml)
Insuficiencia estrogénica larga	IRC (n = 9)	290 \pm 36	1,0 \pm 0,1	62 \pm 16	10,9 \pm 0,5	5,7 \pm 1,1	70 \pm 16
	Placebo (n = 8)	325 \pm 27 ^a	1,0 \pm 0,1	62 \pm 14	10,8 \pm 0,2	6,4 \pm 1,0	58 \pm 13
	E ₂ (n = 9)	302 \pm 32	1,0 \pm 0,1	63 \pm 8	10,9 \pm 0,4	5,6 \pm 1,1	64 \pm 37
	Calcitriol (n = 9)	338 \pm 30 ^{ace}	1,1 \pm 0,2	60 \pm 10	11,8 \pm 0,5 ^{abc}	6,7 \pm 1,3 ^c	54 \pm 19
	E ₂ + calcitriol (n = 9)	305 \pm 24	1,1 \pm 0,2	62 \pm 14	12,2 \pm 0,5 ^{abc}	6,7 \pm 0,6 ^c	47 \pm 14 ^a
Insuficiencia estrogénica corta	IRC (n = 4)	321 \pm 24	1,0 \pm 0,1	70 \pm 11	12,2 \pm 0,3	4,8 \pm 0,6	12 \pm 2
	Placebo (n = 7)	355 \pm 34 ^{ce}	1,0 \pm 0,1	68 \pm 3	11,8 \pm 0,3	5,7 \pm 0,9	19 \pm 7
	E ₂ (n = 8)	313 \pm 19	1,1 \pm 0,1	72 \pm 14	11,7 \pm 0,3	4,7 \pm 0,6 ^b	17 \pm 9
	Calcitriol (n = 7)	350 \pm 56	1,1 \pm 0,1	67 \pm 5	13,0 \pm 1,1 ^{abc}	5,6 \pm 0,9 ^c	4 \pm 1 ^{abc}
	E ₂ + calcitriol (n = 6)	320 \pm 12	1,1 \pm 0,1	75 \pm 9	12,6 \pm 0,3 ^{abc}	5,3 \pm 0,8	4 \pm 1 ^{abc}

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. ^{a,b,c,d,e,p} $p < 0,05$ con respecto a los grupos IRC, placebo, E₂, calcitriol y E₂ + calcitriol respectivamente.

38 \pm 10 md/dl en el grupo normal; Creatinina: 1,05 \pm 0,16 vs 0,8 \pm 0,1 mg/dl en el grupo normal. Fase insuficiencia estrogénica corta: Urea: 70,8 \pm 9,3 vs 31 \pm 5 mg/dl en el grupo normal; Creatinina: 1,06 \pm 0,01 vs 0,6 \pm 0,0 mg/dl en el grupo normal).

Tanto después de la insuficiencia estrogénica corta como larga, los grupos tratados con calcitriol, o con el tratamiento combinado E₂ + Calcitriol, presentaron niveles de calcio sérico significativamente superiores a los observados en el resto de los grupos. Los niveles de PTH en estos dos grupos fueron inferiores a los observados en el resto, si bien las diferencias sólo fueron significativas tras la fase de insuficiencia estrogénica corta.

DMO

En la fase de insuficiencia estrogénica larga (4 semanas) ninguno de los tratamientos ensayados fue capaz de recuperar las pérdidas óseas ocasionadas por la OVX, si bien en los grupos tratados con calcitriol o con E₂ + calcitriol se observaron recuperaciones parciales (fig 1a).

En la fase de insuficiencia estrogénica corta (1 semana), los grupos tratados con calcitriol o con E₂+calcitriol alcanzaron una DMO similar a la observada en el control con función ovárica normal. Cuando sólo se utilizó E₂ no se observó recuperación de masa ósea (fig. 1b).

Histomorfometría Ósea

En la fase de insuficiencia estrogénica larga (4 semanas), a pesar de 8 semanas de tratamiento, no se

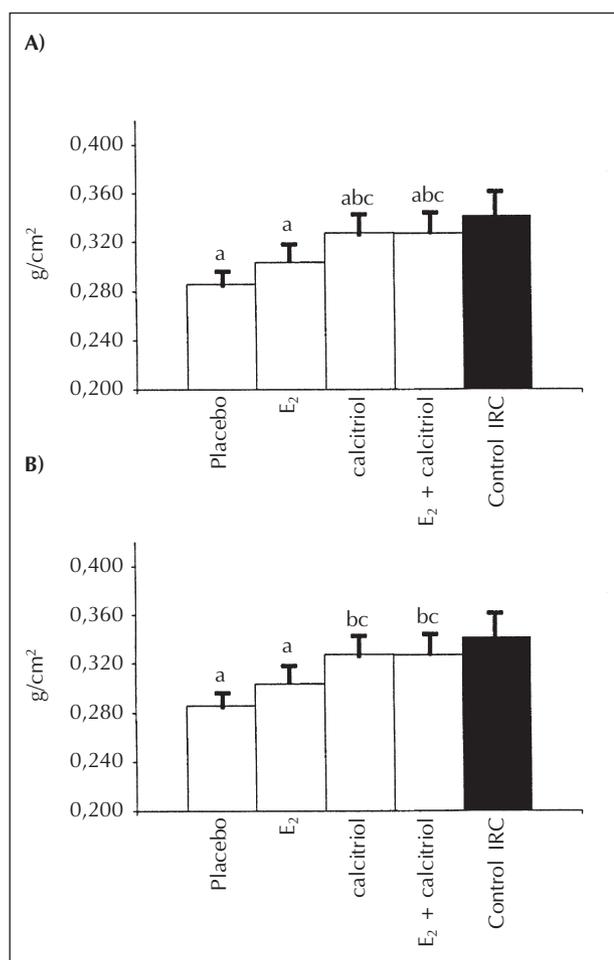


Fig. 1.—DMO en tibia proximal en: A) fase insuficiencia estrogénica larga, y B) fase insuficiencia estrogénica corta. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. ^{a,b,c,p} $p < 0,05$ con respecto a los grupos IRC, placebo y E₂ respectivamente.

observó ninguna recuperación, siendo el volumen (BV/TV) y la superficie trabecular (BS/TV) similares a las observadas en el placebo (tabla II).

En la fase de insuficiencia estrogénica corta (1 semana), los animales tratados solo con E₂, no recuperaron el hueso trabecular. Por el contrario, aquellos que recibieron calcitriol, ya sea solo o asociado a E₂, fueron capaces de revertir las pérdidas de volumen y superficie trabecular provocados por la insuficiencia estrogénica, alcanzando a las 8 semanas de tratamiento valores similares al grupo control con IRC (tabla II).

DISCUSIÓN

Actualmente, la terapia hormonal sustitutiva se inicia tanto inmediatamente después de la menopausia, como en años posteriores, habiéndose descrito en ambos casos efectos beneficiosos de esta terapia sobre el hueso. Este modelo destaca la importancia que tiene el período de privación estrogénica en una posible eficacia del tratamiento. En nuestro modelo animal se pone de manifiesto que cuatro semanas de privación estrogénica, que equivalen a 3 años en una mujer⁵, conllevan una pérdida de hueso trabecular demasiado importante, con pérdidas de casi todo el entramado trabecular, hecho que imposibilita que los antiresortivos puedan revertir la pérdida de hueso trabecular acontecida tras la privación estrogénica, solo demostrada con agentes neoformadores de hueso como son el aluminio y la PTH^{8,10}.

El análisis de los marcadores bioquímicos demostró la presencia de IRC, con niveles séricos de urea y creatinina significativamente superiores a los observados en ratas con función renal normal. En nuestro estudio los estrógenos no parecieron ejercer ningún efecto regulador sobre los niveles séricos de calcio o PTH, aunque existen trabajos que demuestran un posible efecto regulador de esta hormona sobre el calcio o la PTH¹¹. Sin embargo, en ambas fases, los gru-

pos tratados con calcitriol (solo o con E₂) presentaron unos niveles de calcio sérico superiores y niveles de PTH inferiores al resto de los grupos¹², si bien las diferencias en PTH sólo fueron significativas tras la fase de insuficiencia estrogénica corta. El efecto del calcitriol podría ser debido a una acción directa sobre la glándula paratiroides, o bien a un incremento en la absorción intestinal de calcio^{12,13}.

Para evaluar la eficacia de los tratamientos hemos utilizado dos técnicas muy diferentes, la densitometría como técnica no invasiva, pero sensible para medir cambios en masa ósea provocados por hormonas como los estrógenos y el calcitriol y la histomorfometría, como técnica invasiva, más precisa y específica, que permite evaluar por separado cambios trabeculares y corticales en el hueso. Esta última esta considerada el patrón de oro en estudios de metabolismo óseo. La histomorfometría tiene un mayor poder de resolución que la densitometría y permite la cuantificación tanto de parámetros óseos estáticos como dinámicos. La densitometría presenta importantes ventajas prácticas puesto que, además de ser una técnica no invasiva, permite la cuantificación esquelética longitudinal *in vivo*¹.

Existen pocos estudios que analicen correlaciones entre ambas técnicas en ratas¹⁴. En nuestro estudio se observó que en ambas fases la DMO en tibia proximal mostró una buena correlación con los parámetros histomorfométricos (*Fase I*: r = 0,658; *fase II*: r = 0,870; p < 0,0001). Este hecho pone de manifiesto la utilidad de la densitometría, puesto que aunque no permite precisar los cambios en la microarquitectura ósea permite predecir los cambios óseos.

Ambos análisis se llevaron a cabo en tibia proximal, segmento de alto contenido trabecular donde pueden observarse rápidamente las pérdidas óseas, dado que éstas son precozmente mayores que las pérdidas corticales⁵. A nivel densitométrico, en ambas fases se observaron importantes pérdidas óseas en el grupo placebo inducidas como consecuencia de la privación estrogénica.

Tabla II. Análisis histomorfométrico de volumen (BV/TV) y superficie trabecular (BS/TV) a nivel de tibia proximal en las dos fases del estudio y en los distintos grupos de tratamiento.

Insuficiencia estrogénica larga	BV/TV (%)	BS/TV (mm ² /mm ³)	Insuficiencia estrogénica corta	BV/TV (%)	BS/TV (mm ² /mm ³)
IRC (n = 9)	25,8 ± 4,0	19,2 ± 2,0	IRC (n = 4)	27,2 ± 1,2	19,0 ± 5,0
Placebo (n = 8)	10,3 ± 1,2 ^a	8,2 ± 1,3 ^a	Placebo (n = 7)	15,4 ± 5,5 ^a	12,1 ± 3,8 ^a
E ₂ (n = 9)	14,1 ± 1,6 ^a	10,3 ± 3,0 ^a	E ₂ (n = 8)	16,5 ± 8,3 ^a	13,0 ± 2,5 ^a
Calcitriol (n = 9)	15,5 ± 4,6 ^{1b}	12,2 ± 3,6 ^{a,b}	Calcitriol (n = 7)	29,7 ± 8,3 ^{b,c}	20,1 ± 2,7 ^{b,c}
E ₂ + calcitriol (n = 9)	12,3 ± 6 ^a	9,7 ± 3,9 ^a	E ₂ + calcitriol (n = 6)	24,5 ± 6,1 ^{b,c}	19,0 ± 2,6 ^{b,c}

Los datos se expresan como media ± desviación estándar. ^{a,b,c} p < 0,05 con respecto a los grupos IRC, placebo y E₂ respectivamente.

En la fase de insuficiencia estrogénica larga (4 semanas) ninguno de los tratamientos ensayados fue capaz de recuperar los niveles óseos observados en el grupo control. En la fase de insuficiencia estrogénica corta (1 semana), el tratamiento único con E_2 , a la dosis ensayada, no resultó eficaz. El tratamiento combinado con E_2 + calcitriol permitió recuperar la DMO, presentando niveles similares a los observados en el grupo control, si bien esta DMO fue similar a la observada en el grupo tratado sólo con calcitriol, no observándose por tanto efecto del E_2 a este nivel.

Como se comentó anteriormente, la DMO en tibia proximal mostró una buena correlación con la histomorfometría. Así a nivel histomorfométrico, también se puso de manifiesto que en la fase de insuficiencia estrogénica larga ninguno de los tratamientos ensayados fue capaz de alcanzar valores de volumen o superficie trabecular del grupo control. En la fase de insuficiencia estrogénica corta, el tratamiento combinado con E_2 + calcitriol permitió recuperar los valores de volumen y superficie trabecular observados en el grupo control, posiblemente debido fundamentalmente al efecto del calcitriol.

En nuestro modelo animal con IRC + OVX era esperable que la terapia combinada con E_2 + calcitriol fuera la más eficaz, debido a un posible efecto sinérgico o aditivo de ambos tratamientos. El E_2 además de tener un efecto nefroprotector¹⁵, previene la pérdida de masa ósea en estados de deficiencia estrogénica con función renal normal¹. Por otro lado, el tratamiento con calcitriol contribuye a frenar las lesiones óseas ocasionadas por la insuficiencia renal crónica¹⁶. Sin embargo, en nuestro estudio, el tratamiento estrogénico a dosis de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ no resultó eficaz, ni al administrarlo como tratamiento único ni combinado con calcitriol.

Posteriormente, en nuestro laboratorio se han llevado a cabo estudios ensayando en este mismo modelo dosis mayores de E_2 (45 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$), administrada tanto como tratamiento único como combinado con calcitriol, y en este caso si hemos observado un efecto beneficioso del tratamiento estrogénico sobre el metabolismo óseo, así como una mayor eficacia de la terapia combinada E_2 + calcitriol frente al tratamiento único con E_2 ¹⁷. Es importante destacar que ambas dosis (tanto 15 como 45 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) se encuentran dentro del rango de dosis utilizadas en pacientes en tratamiento hormonal sustitutivo^{18,19}.

De acuerdo con estos resultados, el tratamiento estrogénico administrado de forma tardía (tras 4 semanas de insuficiencia estrogénica), no resultó eficaz para revertir la pérdida de hueso trabecular en un modelo animal con IRC. Por el contrario, tras

solo 1 semana de insuficiencia estrogénica el tratamiento si fue capaz de revertir estas pérdidas. Estos resultados resaltan la importancia de instaurar el tratamiento estrogénico en estados tempranos de insuficiencia estrogénica, dado que este tratamiento parece actuar fundamentalmente previniendo las pérdidas óseas y tiene mayor capacidad de recuperar el hueso trabecular perdido como consecuencia de la insuficiencia renal y ovárica. En la valoración de estas pérdidas óseas la densitometría fue útil dado que permitió predecir los cambios en masa ósea observados posteriormente en el análisis histomorfométrico.

AGRADECIMIENTOS

A Paula Muñoz, Socorro Braga y Mercedes Serrano por su colaboración en este estudio. A Carlos Gómez por sus sugerencias sobre el manuscrito. Al FIS que ha financiado este estudio (FIS 98/787). Aránzazu Rodríguez Rodríguez ha estado financiada por la Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo (2001-2002) y por el Plan Regional de Investigación del Principado de Asturias mediante un contrato de investigación de FICYT (2002-2003).

BIBLIOGRAFÍA

1. Fleurence R, Torgerson DJ, Reid DM: Cost-effectiveness of hormone replacement therapy for fracture prevention in young postmenopausal women: an economic analysis based on a prospective cohort study. *Osteoporos Int* 13: 637-643, 2002.
2. Lindberg JS, Moe SM: Osteoporosis in end-state renal disease. *Semin Nephrol* 19: 115-122, 1999.
3. Weisinger JR, González L, Álvarez H, Hernández E, Carlini RG, Capriles F, Cervino M, Martinis R, Paz-Martínez V, Bellorín-Font E: Role of persistent amenorrhea in bone mineral metabolism of young hemodialyzed women. *Kidney Int* 58: 331-335, 2000.
4. Lindsay R: Estrogen therapy in the prevention and management of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol* 156: 1347-1351, 1987.
5. Kalu DN: The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15: 175-191, 1991.
6. Ormrod D, Miller T: Experimental uremia. Description of a model producing varying degrees of stable uremia. *Nephron* 26: 249-254, 1980.
7. Waynforth H: *Experimental and surgical technique in the rat*. London, Harcourt Brace Jovanovich, 1980.
8. Gómez-Alonso C, Menéndez-Rodríguez P, Virgos-Soriano MJ, Fernández-Martín JL, Fernández-Coto MT, Cannata-Andía JB: Aluminum-induced osteogenesis in osteopenic rats with normal renal function. *Calcif Tissue Int* 64: 534-541, 1999.
9. Parfitt AM: Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Summary of proposed system. *Bone Miner* 4: 1-5, 1988.
10. Tam CS, Heersche JN, Murray TM, Parsons JA: Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently

A. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ y cols.

- of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology* 110: 506-512, 1982.
11. Ten Bolscher M, Netelenbos JC, Barto R, Van Buuren LM, Van der Vijgh WJ: Estrogen regulation of intestinal calcium absorption in the intact and ovariectomized adult rat. *J Bone Miner Res* 14: 1197-1202, 1999.
 12. Kanis JA: Vitamin D analogs: from renal bone disease to osteoporosis. *Kidney Int* (Supl. 73): S77-81, 1999.
 13. Coburn JW, Elangovan L: Prevention of metabolic bone disease in the pre-end-stage renal disease setting. *J Am Soc Nephrol* 9: S71-77, 1998.
 14. Cosman F, Schnitzer MB, McCann PD, Parisien MV, Dempster DW, Lindsay R: Relationships between quantitative histological measurements and noninvasive assessments of bone mass. *Bone* 13: 237-242, 1992.
 15. Antus B, Hamar P, Kokeny G, Szollosi Z, Mucsi I, Nemes Z, Rosivall L: Estradiol is nephroprotective in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant* 18: 54-61, 2003.
 16. Ho LT, Sprague SM: Renal osteodystrophy in chronic renal failure. *Semin Nephrol* 22: 488-493, 2002.
 17. Rodríguez-Rodríguez A, Naves M, Rodríguez-Rebollar A, Gómez C, Braga S, Cannata-Andía JB: Hormonal replacement therapy in an animal model with chronic renal failure and ovariectomy: biochemical and densitometric study. *Kidney Int*, in press.
 18. Liel Y, Shany S, Smirnov P, Schwartz B: Estrogen increases 1,25-dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. *Endocrinology* 140: 280-285, 1999.
 19. Verhaeghe J, Oloumi G, Van Herck E, Van Bree R, Dequeker J, Einhorn TA, Bouillon R: Effects of long-term diabetes and/or high-dose 17 beta-estradiol on bone formation, bone mineral density, and strength in ovariectomized rats. *Bone* 20: 421-428, 1997.