

# Influencia de la deficiencia de magnesio sobre la síntesis de la 1,25 dihidroxivitamina $D_3$ en ratas

## Vitamina $D_3$ e hipomagnesemia

P. Climent, M. L. Traba, C. de la Piedra, M. Babé y A. Rapado

Laboratorio de la Unidad Metabólica. Fundación Jiménez Díaz. Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid.

### RESUMEN

Este trabajo tiene como fin estudiar la influencia de la deficiencia de magnesio sobre la síntesis de la 1,25 dihidroxivitamina  $D_3$  ( $1,25(OH)_2D_3$ ) en ratas. A ratas normales, hipomagnesémicas, hipocalcémicas e hipocalcémicas-hipomagnesémicas, se les inyectaron  $2 \mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}-25(OH)D_3$  vía sublingual. Cuarenta horas después fueron sacrificadas y se recogieron los riñones, mucosa del intestino delgado y hueso (tibia y fémur). Los metabolitos tritiados de la vitamina  $D_3$  fueron extraídos (suero con acetonitrilo y tejidos por la técnica de Bligh y Dyer), purificados (Sep-Pak C-18) y separados por sistema CLAE (cromatografía líquida de alta eficacia, fase normal, hexano/etanol 95:5 v/v, flujo 2 ml/min.). Se calcularon los porcentajes correspondientes a la  $^3\text{H}-1,25(OH)_2D_3$  con respecto a la radiactividad total del cromatograma. Se ha encontrado un descenso de los porcentajes de radiactividad del pico correspondiente a la  $1,25(OH)_2D_3$  en el grupo hipomagnesémico con respecto al grupo normal, así como un descenso en los niveles séricos de este metabolito. Por otra parte, como era de esperar, se encontró un aumento muy significativo del porcentaje de  $^3\text{H}-1,25(OH)_2D_3$  en el grupo de ratas hipocalcémicas debido a que en este grupo la  $1\alpha$  hidroxilasa se encuentra estimulada por la hipocalcemia. Sin embargo, en el grupo de ratas hipocalcémicas-hipomagnesémicas estos valores se encontraron disminuidos con respecto al grupo de ratas hipocalcémicas y no fueron significativamente diferentes a los del grupo de ratas normales. Estos hechos sugieren la existencia de una interrelación entre la deficiencia de magnesio y la síntesis de la  $1,25(OH)_2D_3$ .

Palabras claves: **Hipomagnesemia. Hipocalcemia. 1,25 dihidroxivitamina  $D_3$ . 24,25 dihidroxivitamina  $D_3$ . 25,26 dihidroxivitamina  $D_3$ .**

Correspondencia: Dr. P. Climent.  
Laboratorio de la Unidad Metabólica.  
Fundación Jiménez Díaz.  
Avda. Reyes Católicos, 2.  
28040 Madrid.

Recibido: 14-X-85.  
En forma definitiva: 17-XII-85.  
Aceptado: 8-I-86.

## EFFECTS OF HIPOMAGNESEMIA ON THE SYNTHESIS OF 1,25 DIHYDROXYVITAMIN D<sub>3</sub> IN RATS

### SUMMARY

To study the relationship between magnesium deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> synthesis, we analyzed the percentage of radioactivity in HPLC chromatographic profiles (normal phase, hexane: ethanol, 95:5 v/v) of vitamin D metabolites. These were extracted from serum (acetonitrile); intestine, kidney and tibia (chloroform/methanol 50:50 v/v) in four groups of rats: normal (N), hypomagnesemic (-Mg), hypocalcemic (-Ca) and hypocalcemic-hypomagnesemic (-Ca -Mg) 40 hours after the i.v. administration of 2  $\mu$ Ci of <sup>3</sup>H-25-hydroxyvitamin D. We observed a decrease in <sup>3</sup>H-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in bone, kidney and intestine in (-Mg) rats compared to (N) rats. A significant increase in the percentages of radioactivity of the peak corresponding to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was observed in serum and organ extracts from (-Ca) rats compared with (N) rats, while a minor increase was detected in these samples from (-Ca -Mg) rats, in spite of their low serum calcium levels. Serum levels of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in (-Mg) rats were decreased compared to (N) rats. From these results we can suspect that there is an interrelationship between magnesium deficiency and synthesis of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> at least in rats.

Key words: **Hypomagnesemia. Hypocalcemia. 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. 24,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. 25,26 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>.**

### Introducción

La 25 hidroxivitamina D<sub>3</sub>-1 $\alpha$  hidroxilasa es la enzima responsable de la hidroxilación en posición 1 $\alpha$  de la 25 hidroxivitamina D<sub>3</sub> (25(OH)D) en el riñón, para originar la 1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), reconocida como el metabolismo más activo de la vitamina D<sub>3</sub><sup>1</sup>.

La regulación de esta enzima se realiza en el organismo de acuerdo con las necesidades fisiológicas de calcio. Existen una serie de factores reguladores de esta hidroxilasa: iónicos, hormonales y otros que se interrelacionan entre sí. Entre los factores iónicos se encuentran el calcio, fósforo, magnesio y potasio, y entre los hormonales, la hormona paratiroidea (PTH) y la misma 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub><sup>2</sup>. Se ha observado que en los estados de deficiencia de magnesio existe una alteración en la secreción y/o acción de la PTH<sup>3-5</sup>. Como se sabe, esta hormona es un factor trófico de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa. Por otra parte, la  $\alpha$ -hidroxilasa es una enzima magnesio dependiente<sup>2</sup>. Estos dos hechos hacen suponer que en los estados hipomagnesémicos debería haber una disminución en la síntesis de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, aunque hasta el momento este hecho no haya sido confirmado. Por tanto, este trabajo pretende estudiar la posible alteración de este

metabolito en los estados de deficiencia de magnesio.

### Material y métodos

#### Aparatos

Cromatógrafo de alta eficacia (CLAE) (Waters Associates, Milford Mass), que consta de una bomba M 6000A, inyector U6K, un módulo de compresión radial RCM, un detector de longitud de onda fija (254 nm.), un módulo de datos M-730. Se utilizaron columnas de sílicalumnas de sílice gel (10 m) y C-18. Para la purificación previa de las nuevas se utilizaron cartuchos de Sep-Pack C-18 y sílice (Waters Associates, Milford Mass).

#### Reactivos

Todos los disolventes y reactivos fueron de grado analítico (Merck, Ferosa). Para la purificación de las muestras, los disolventes fueron filtrados y sonificados durante media hora antes de su uso.

La 25(OH)D<sub>3</sub> fue amablemente cedida por los laboratorios Upjon (Kalamazoo, Michigan); las 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y 25,26(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> por el doctor Meier, de Hoffman-La Roche (Basilea, Suiza). Los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> fueron disueltos en

etanol hasta una concentración de 0,05 g/L y conservados a 4° C hasta el momento de su uso. La concentración se comprobó por espectrofotometría de absorción ultravioleta, utilizando el coeficiente de extinción molar de 18.300 a 265 nm. para todos los metabolitos.

El 25-hidroxi(26(27)-metil- $H^3$ ) colecalciferol (20 Ci/mmol.), 24R,25 dihidroxi(23,24(n)- $H^3$ ) colecalciferol y 1 a,25-dihidroxi(23,24(n)- $^3H$ ) colecalciferol (60-90 y 80-120 Ci/mmol., respectivamente) fueron obtenidos de Radiochemical Center (Amersham, UK).

Para el citorreceptor-análisis de la 1,25(OH) $_2D_3$  se utilizó un citorreceptor de timo de ternera (Immuno Nuclear Corporation, Stillwater, Minnesota; 1,25 dihydroxyvitamin  $D_3$  por RIA CAT. núm. 6000)<sup>6</sup>.

#### Dietas

Dieta normal: Mg, 30 mg.; Ca, 0,50,6 g.; P, 0,3-0,4 g/100 g. de dieta y una mezcla vitamínica completa estándar.

Dieta deficiente en magnesio: Mg, 3 mg.; Ca, 0,5-0,6 g.; P, 0,3-0,4 g/100 g. de dieta y una mezcla vitamínica completa estándar.

Dieta raquitogénica: Mg, 30 mg.; Ca, 0,5-0,6 g.; P, 0,1 g/100 g. de dieta y una mezcla vitamínica carente en vitamina D.

Dieta deficiente en calcio y magnesio: Mg, 3 mg.; Ca, 0,05-0,06 g.; P, 0,3-0,4 g/100 g. de dieta y una mezcla vitamínica completa estándar.

Estas dietas fueron suministradas por los laboratorios Pan-Lab, París (Francia). La composición mineral del agua analizada por nuestro laboratorio fue: Ca,  $8,5 \times 10^{-3}$  g/L, y Mg.,  $0,8 \times 10^{-3}$  g/L.

#### Protocolo experimental

Ratas macho Sprague-Dawley de 90-100 g. de peso fueron mantenidas en jaulas individuales con libre acceso al agua y a la comida. Las ratas se dividieron al azar en cuatro grupos. El grupo I fue alimentado con dieta normal; el II, con dieta deficiente en magnesio; el III, con dieta raquitogénica, y el IV, con dieta deficiente en magnesio y deficiente en calcio. Los grupos I, II y IV se mantuvieron con sus respectivas dietas durante quince días y el grupo III durante cuarenta días. Durante estos períodos de tiempo se tomaron muestras de sangre del rabo de estas ratas para determinar los niveles séricos de calcio y magnesio, con el fin de comprobar si se había obtenido el modelo experimental deseado. Al finalizar los períodos de tiempo mencionados, los cuatro grupos de ratas se subdividieron a su vez en dos subgrupos, A y B. Las ratas procedentes de los subgrupos A se mantuvieron en ayunas durante veinticuatro horas y al día siguiente, entre las nueve y diez de la mañana, se sacrificaron bajo anestesia intraperitoneal con nembutal sódico (5 mg/100 g. de peso). Se les extrajo sangre de

la vena suprahepática con objeto de realizar las determinaciones de calcio y magnesio, así como de los metabolitos de la vitamina  $D_3$  en suero: 25(OH) $D_3$ ; 24,25(OH) $_2D_3$  y 1,25(OH) $D_3$ .

A las ratas del subgrupo A-I (normales) y A-III (raquíticas) se les hicieron radiografías de las extremidades posteriores para evidenciar la presencia de raquitismo y compararlas con las ratas normales.

Las ratas procedentes de los subgrupos B fueron utilizadas para el estudio de la distribución de los metabolitos tritiados de la vitamina  $D_3$  sintetizados a partir del substrato radiactivo  $^3H$ -25(OH) $D_3$  en suero y tejidos. Para ello se les administraron 2  $\mu$ Ci de  $^3H$ -25(OH) $D_3$ /50  $\mu$ l. de etanol, vía sublingual previamente anestesiadas. A las cuarenta horas se les extrajo sangre a través de la vena suprahepática. A continuación se les hizo un corte en la vena cava inferior y se perfundió con 50 ml. de solución salina por la vena porta. Se recogieron los riñones, mucosa del intestino delgado y hueso (tibia y fémur). Las ratas fueron sacrificadas siempre entre las nueve y diez de la mañana.

#### Técnica para el estudio de la distribución de los metabolitos tritiados de la vitamina $D_3$ en suero y tejidos

Suero: A 2 ml. de suero se les añadieron 2 ml. de acetonitrilo y la mezcla se mantuvo en reposo durante treinta minutos. Se centrifugó a 2.500 r.p.m. quince minutos a 4° C. El sobrenadante contenía los metabolitos de la vitamina  $D_3$ .

Organos: Para la extracción de los metabolitos de la vitamina  $D_3$  tritiados en riñón, hueso e intestino delgado se utilizó la técnica de Bligh y Dyer<sup>9</sup>. La capa inferior clorofórmica procedente de la extracción de los órganos se secó con rotavapor a temperatura ambiente y se resuspendió en 4 ml. de acetonitrilo/agua (50:50 v/v). Tanto la fase procedente de la resuspensión de los órganos como el sobrenadante procedente de la extracción de los metabolitos de la vitamina  $D_3$  tritiados del suero de la etapa anterior se pasaron a través de un cartucho de Sep-Pak C-18. El eluido se eliminó. Los cartuchos se lavaron con 3 ml. de metanol/agua (50:50 v/v), descartándose el eluido. Los metabolitos de la vitamina  $D_3$  fueron eluidos con 3 ml. de acetonitrilo.

Las muestras obtenidas de la etapa anterior se secaron bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. El extracto seco se resuspendió en 500  $\mu$ l. de hexano/etanol (95:5 v/v) y se inyectó en un sistema CLAE con una columna de sílice-gel (10  $\mu$ , fase normal) y se eluyó con el mismo solvente a un flujo de 2 ml/min., recogiendo fracciones cada 0,5 minutos. La radiactividad contenida en ellas se contó en un contador de radiactividad B. Se construyeron los perfiles cromatográficos de las distintas muestras y se

calcularon los porcentajes de radiactividad con respecto a la radioactividad total del cromatograma correspondiente a cada metabolito de la vitamina D<sub>3</sub> estudiado.

Con objeto de determinar el tiempo de retención de los diferentes metabolitos se inyectó en el sistema CLAE, con cada muestra a analizar, una mezcla de estándares fríos de 25(OH)D<sub>3</sub>; 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; 25,26(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Con el fin de chequear el sistema cromatográfico en fase normal, en algunas de las muestras los picos correspondientes al 25(OH)D<sub>3</sub>; 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; 25,26(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en la fase normal fueron recromatografiados en fase reversa. Para ello los picos correspondientes a cada metabolito en fase normal se recogieron por separado, se secaron bajo corriente de nitrógeno y se resuspendieron en una disolución de metanol/agua (80:20 v/v) para el 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y en metanol/agua (95:15 v/v) para el 25(OH)D<sub>3</sub>; 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y 25,26(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Se inyectaron por separado, junto a sus respectivos estándares fríos, en un sistema CLAE equipado con una columna de fase reversa C-18, a un flujo de 2 ml/min. Como fase móvil se utilizó el mismo disolvente, en el cual iban resuspendidos los metabolitos. Se recogieron fracciones cada 0,5 minutos, se contó la radiactividad contenida en cada una de ellas y se calcularon los porcentajes de radiactividad con respecto a la radiactividad total del cromatograma correspondiente a cada metabolito de la vitamina D<sub>3</sub>.

#### Métodos analíticos

Los niveles séricos de calcio y magnesio se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica.

Los niveles séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> y 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> se analizaron por un método que comprende una extracción de los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> existentes en suero con acetonitrilo, una purificación por cartuchos de Sep-Pak C-18, una separación por cromatografía líquida de alta eficacia y una cuantificación por análisis de competición proteica<sup>7, 8</sup>. Los límites de detección de este análisis para ambos metabolitos son de 0,2 ng/ml. Las cifras de normalidad para el 25(OH)D<sub>3</sub> son  $14,9 \pm 5,5$  ng/ml., y los coeficientes de variación intra e interanálisis son de 8,7 y 9,6 %, respectivamente<sup>7</sup>. Las cifras de normalidad para el 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> son de  $2,9 \pm 1,9$  ng/ml., y los coeficientes intra e interanálisis son de 7,7 y 11,2 %, respectivamente<sup>8</sup>.

La determinación de los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> fue realizada por un método que emplea una extracción de los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> existentes en suero con acetonitrilo, una purificación a través de cartuchos de Sep-Pak C-18 y sílice y una cuantificación por un radioreceptor-análisis que utiliza un citorreceptor de timo de ternera<sup>6</sup>. Las cifras de nor-

malidad son de  $35 \pm 11$  pg/ml. El límite de detección de este análisis para la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> es de 5 pg/ml., y los coeficientes de variación intra e interanálisis son de 6,8 y 11 %, respectivamente.

#### Tratamiento estadístico

El análisis estadístico de los resultados se ha realizado utilizando el test t de Student no emparejado.

#### Resultados

La tabla muestra los valores séricos de calcio y magnesio en los diferentes grupos de ratas, así como los de los metabolitos 25(OH)D<sub>3</sub>; 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en los diferentes grupos de ratas (subgrupo A).

El grupo raquíctico presentaba una disminución del calcio sérico y de los niveles circulantes de 25(OH)D<sub>3</sub> con respecto al grupo normal. A su vez, las radiografías realizadas a las extremidades posteriores de las ratas de este grupo mostraban una línea de calcificación epifisial difusa y un hueso osteopénico y múltiples fracturas a nivel de la cabeza del fémur y en el extremo inferior de la tibia, características todas ellas de raquitismo.

El grupo hipomagnésémico y el hipomagnésémico-hipocalcémico mostraban rasgos característicos de los estados hipomagnésémicos: disminución de tamaño con respecto al grupo normal, lesiones cutáneas, vasodilatación periférica, irritabilidad y alopecia. En estos dos grupos el magnesio sérico se encontraba disminuido y el último de ellos presentaba a su vez hipocalcemia.

Los niveles séricos de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en el grupo de ratas hipomagnésémicas estaban significativamente disminuidos, no habiéndose encontrado diferencias en la 25(OH)D<sub>3</sub> sérica frente a las ratas normales.

La figura 1 (trazo continuo) representa la separación por CLAE en fase normal de una muestra de suero obtenida tras cuarenta horas de la inyección de <sup>3</sup>H-25(OH)D<sub>3</sub>, al que se adicionaron 100 ng. de 25(OH)D<sub>3</sub>; 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; 25,26(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> como estándares. Las barras de la figura representan la radiactividad encontrada en cada una de las fracciones recogidas. La resolución obtenida en fase normal nos parece correcta, ya que, como se ha mencionado en el apartado de materiales y métodos, la recromatografía en fase reversa de los picos obtenidos en fase normal realizada en algunas muestras ha mostrado una recuperación del 90-100 % para la 25(OH)D<sub>3</sub> y 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, y del 85 % para la 25,26(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Las figuras 2 y 3 comparan respectivamente los porcentajes de radiactividad correspondientes a los

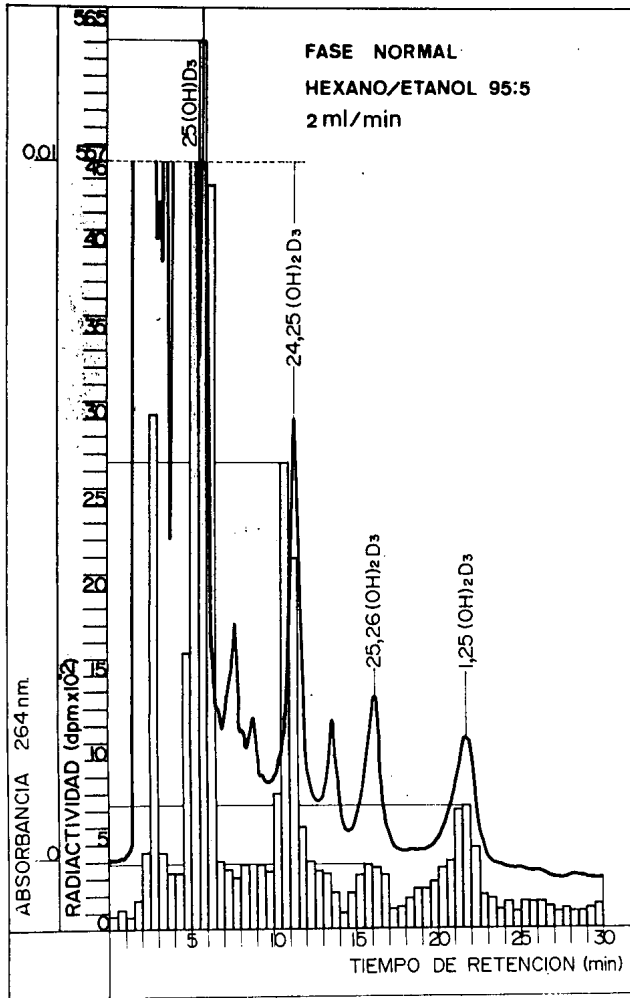


Fig. 1.—Perfil cromatográfico (CLAE, fase normal) de una muestra de suero de rata normal obtenida tras cuarenta horas de la inyección de  $^3\text{H}$ - $25(\text{OH})\text{D}_3$ , al que se adicionaron 100 ng. de  $25(\text{OH})\text{D}_3$ ;  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ;  $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$  y  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  como estándares. Las barras representan la radiactividad contenida en cada fracción. Los picos correspondientes a cada metabolito vienen señalados en la figura\*.

Fig. 3.—Porcentajes de radiactividad correspondientes a los picos del  $24,25$  dihidroxivitamina  $\text{D}_3$  y  $25,26$  dihidroxivitamina  $\text{D}_3$  en ratas normales, hipomagnesémicas, hipocalcémicas e hipomagnesémicas-hipocalcémicas en suero, hueso, riñón e intestino. La significación estadística se ha realizado comparando el grupo de ratas hipomagnesémicas frente a las ratas normales y el grupo de ratas hipomagnesémicas-hipocalcémicas frente a las ratas hipocalcémicas. Se representa la media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

\* Las líneas horizontales continuas dibujadas sobre el cromatograma indican la radiactividad máxima alcanzada de los picos correspondientes a los metabolitos de la vitamina  $\text{D}_3$  de la muestra y la línea de puntos señala un corte realizado en la escala de radiactividad que pasa de  $45$  a  $557$   $9\text{dpm} \times 10^{-2}$ .

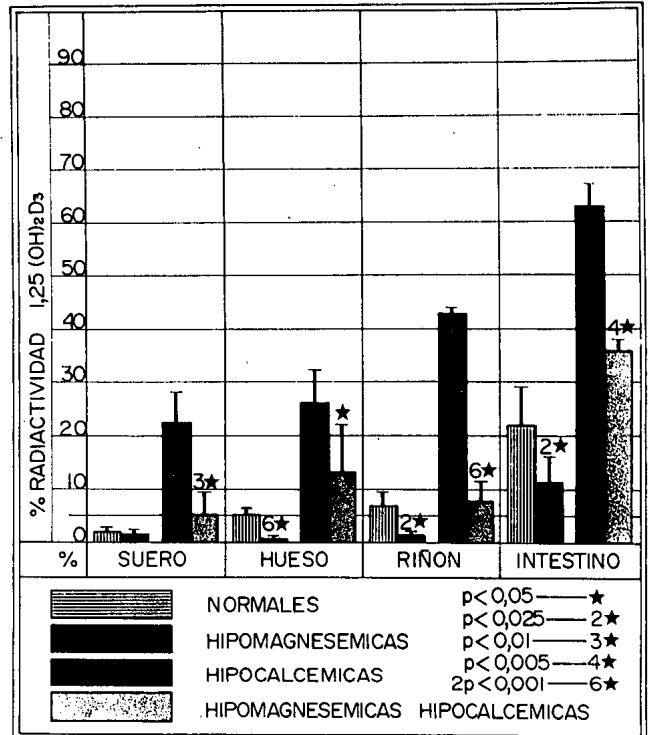
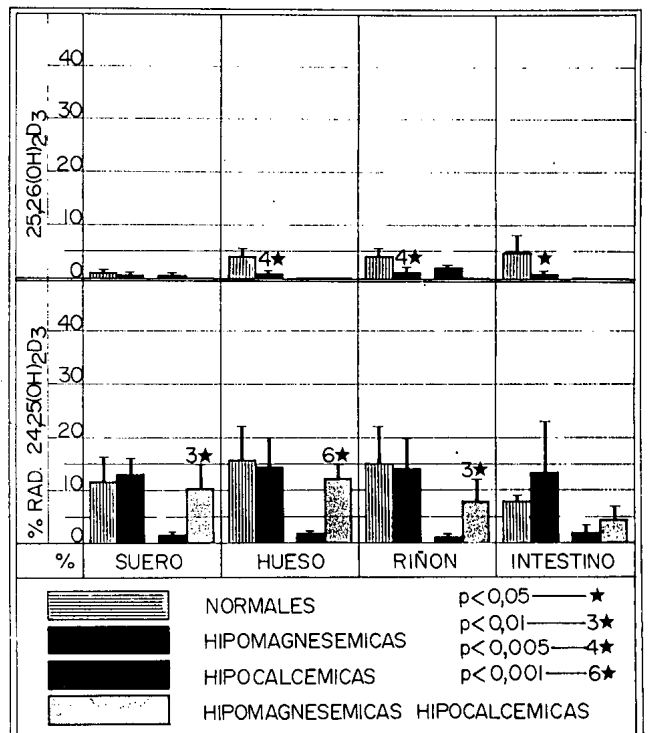


Fig. 2.—Porcentajes de radiactividad correspondientes al pico del  $1,25$  dihidroxivitamina  $\text{D}_3$  en ratas normales, hipomagnesémicas, hipocalcémicas e hipomagnesémicas-hipocalcémicas en suero, hueso, riñón e intestino. La significación estadística se ha realizado comparando el grupo de ratas hipomagnesémicas frente a las ratas normales y el grupo de ratas hipomagnesémicas-hipocalcémicas frente a las ratas hipocalcémicas. Se representa la media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



**Tabla I.** Concentraciones séricas de calcio, magnesio, 25(OH)D; 24,25(OH)<sub>2</sub>D y 1,25(OH)<sub>2</sub>D en los grupos de ratas normales, hipomagnesémicas, hipocalcémicas o raquíticas e hipomagnesémicas-hipocalcémicas

Grupo de ratas	n	Calcio (g/L)	Magnesio (g/L)	25(OH)D (ng/ml.)	24,25(OH) <sub>2</sub> D (ng/ml.)	1,25(OH) <sub>2</sub> D (pg/ml.)
I. Normales.....	5	0,098 ± 0,004	0,021 ± 0,001	13,2 ± 4,9	10,7 ± 2,2	68,7 ± 25,1
II. Deficientes (-Mg).....	5	0,103 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,013 ± 0,002 <sup>b</sup>	9,8 ± 0,2	—	38,9 ± 10,5 <sup>b</sup>
III. Raquíticas (-Ca).....	5	0,074 ± 0,010 <sup>b</sup>	0,023 ± 0,002 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,9	—	—
IV. Deficientes (-Ca -Mg).....	5	0,081 ± 0,004 <sup>b</sup>	0,013 ± 0,003 <sup>b,c</sup>	—	—	—

n: número de ratas.

(-Mg): ratas hipomagnesémicas.

(-Ca): ratas hipocalcémicas o raquíticas.

(-Ca -Mg): ratas hipocalcémicas-hipomagnesémicas.

a: diferencia significativa frente a los valores normales p < 0,05.

b: diferencia significativa frente a los valores normales p < 0,01.

c: diferencia significativa frente a los valores raquíticos p < 0,01.

picos de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (fig. 2); 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y 25,26(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (fig. 3) en los cuatro modelos experimentales de ratas en suero, hueso, riñón e intestino encontrados a las cuarenta horas de la administración de la <sup>3</sup>H-25(OH)D<sub>3</sub> utilizado como sustrato.

Hemos encontrado una disminución muy significativa en el porcentaje de <sup>3</sup>H-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en el intestino, riñón y hueso de las ratas hipomagnesémicas frente a las normales, aunque este descenso no se ha observado en suero. Por otra parte, hemos observado un descenso en dicho porcentaje tanto en suero como en tejidos de las ratas hipomagnesémicas-hipocalcémicas en relación con las ratas hipocalcémicas, siendo estos valores iguales a los porcentajes encontrados en el suero, intestino y hueso de las ratas normales, aunque fueron significativamente superiores en intestino (p < 0,01).

Los porcentajes de radiactividad de la 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> obtenidos en el grupo hipomagnesémico no presentaron diferencias significativas en suero ni en ningún órgano estudiado frente al grupo normal (fig. 3). Por el contrario, en el grupo de ratas hipocalcémicas este porcentaje disminuyó drásticamente en todos los casos estudiados. En el grupo hipomagnesémico-hipocalcémico el porcentaje de <sup>3</sup>H-24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> encontrado en suero, riñón y hueso no presentaba diferencias significativas frente al grupo de ratas normales, no ocurriendo lo mismo en intestino, donde se encontraba disminuido (p < 0,025).

Los porcentajes de <sup>3</sup>H-25,26(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> disminuyeron en el grupo hipomagnesémico en todos los órganos estudiados, excepto en suero, con respecto a las ratas normales. En el grupo hipocalcémico se hizo indetectable en todos los casos y en el grupo hipocalcémico disminuyó en sangre y riñón y fue indetectable en hueso e intestino.

## Discusión

La hipótesis de trabajo mantenida por nosotros de que la hipomagnesemia podría afectar a la síntesis de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> surgió de trabajos previos que demostraban que en los estados de deficiencia de magnesio existía una alteración en la secreción y/o acción de la PTH sobre los órganos diana<sup>3-5</sup>. Como se sabe, la PTH es un factor trófico de la 1 α-hidroxilasa, enzima responsable de la síntesis de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> a partir del sustrato 25(OH)D<sub>3</sub><sup>1</sup>. Por otra parte, la propia hipomagnesemia podría afectar a la síntesis de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, ya que la α-hidroxilación es una reacción magnesio dependiente<sup>2</sup>. A pesar de esta hipótesis, los resultados que existen respecto a una alteración del metabolismo de la vitamina D<sub>3</sub> en la hipomagnesemia son contradictorios. Así, Hartenbower, en 1973<sup>10</sup>, sugirió una homeostasis anormal de calcio en pollos deficientes en magnesio, pero no pudo relacionarlo con una alteración del metabolismo de la vitamina D<sub>3</sub>.

Por el contrario, en ese mismo año, Coburn y cols.<sup>11</sup> encontraron disminuida la producción de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> a partir de 25(OH)D<sub>3</sub> «in vitro», aunque no pudieron encontrar un metabolismo alterado de la vitamina D<sub>3</sub> «in vivo».

Más recientemente, Luckert<sup>12</sup> tampoco encontró alteraciones en el porcentaje de radiactividad de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sérica en pacientes hipomagnesémicos, a los que se les administró <sup>3</sup>H-25(OH)D<sub>3</sub>, con respecto a los individuos normales. En este mismo año, Miravet y cols.<sup>13</sup> hicieron un estudio similar en ratas hipomagnesémicas y tampoco encontraron alteraciones en la <sup>3</sup>H-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sintetizada tanto en suero como en los tejidos estudiados.

Por el contrario, Ralston y cols.<sup>14</sup> estudiaron la respuesta de las hormonas reguladoras del calcio en

un paciente con hipoparatiroidismo hipomagnesémico mientras se le infundía magnesio y observaron una rápida restauración de la secreción de PTH y de la producción de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . En una reciente publicación, Rude y cols.<sup>15</sup> encontraron descendidos los niveles de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  séricos en 21 pacientes hipomagnesémicos, los cuales cursaban con hipocalcemia.

En este trabajo se ha demostrado la existencia de una inhibición de la síntesis de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en los estados de deficiencia de magnesio, ya que hemos encontrado una disminución de los porcentajes de  $^3\text{H}-1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  obtenido tras la inyección de la  $^3\text{H}-25(\text{OH})\text{D}_3$  en intestino, riñón y hueso del grupo de ratas hipomagnesémicas, aunque este descenso no se ha encontrado en suero, hecho que estaría de acuerdo con los resultados de Lucker<sup>12</sup> previamente mencionados. Nuestros resultados discrepan con los obtenidos por Miravet<sup>13</sup>, la cual no encontraba disminución de la síntesis de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en los tejidos de las ratas hipomagnesémicas. Las diferencias pueden ser debidas: 1) a que la cantidad de substrato radiactivo utilizado por ellos es menor que el utilizado por nosotros; 2) a que sólo espera siete horas desde la inyección de la  $^3\text{H}-25(\text{OH})\text{D}_3$  para la extracción de los metabolitos de la vitamina D, a diferencia de las cuarenta horas utilizadas en este trabajo, y 3) a que el método de separación utilizado por ellos, el Sephadex LH-20, es de menor poder de resolución que el sistema utilizado por nosotros, CLAE.

Por otra parte, encontramos un descenso muy significativo de la  $^3\text{H}-1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sintetizada tanto en suero como en tejidos de las ratas hipocalcémicas-hipomagnesémicas en relación con las ratas hipocalcémicas. Este hecho es de suma importancia, ya que la hipocalcemia actúa estimulando directamente o por medio de la PTH la síntesis de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y, sin embargo, su asociación con la hipomagnesemia reduce esta estimulación de tal forma que estos porcentajes no son significativamente diferentes a los de las ratas normales.

A su vez hemos encontrado un descenso muy significativo de los niveles circulantes de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en el grupo de ratas hipomagnesémicas, hecho que corrobora los resultados encontrados en los porcentajes de radiactividad de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en los tejidos a partir del substrato  $^3\text{H}-25(\text{OH})\text{D}_3$ .

Con respecto a los porcentajes de  $^3\text{H}-24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , parece que la hipomagnesemia no afecta a la síntesis de este metabolito, lo cual hace pensar que la regulación de la 24-hidroxiolasa está más relacionada con el calcio que con el magnesio. Como se sabe, la 24-hidroxiolasa está regulada por el calcio, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y la PTH. En los estados hipocalcémicos, la enzima 24-hidroxiolasa se encuentra inhibida<sup>2</sup>. Esto se refleja en nuestro trabajo, ya que en el grupo hipocalcémico los porcentajes de  $^3\text{H}-$

$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se encuentran drásticamente disminuidos frente a los de las ratas normales. En el grupo hipocalcémico-hipomagnesémico no se observa esta disminución. Está descrita la existencia de una relación entre las actividades 24-hidroxiolasa y la 1 a-hidroxiolasa<sup>2</sup>. Como se había mencionado anteriormente, la actividad de la 1 a-hidroxiolasa en este grupo se comporta como en el grupo normal, por lo cual es lógico asumir que la 24-hidroxiolasa se debe comportar de igual manera, hecho confirmado por nuestros resultados.

Los porcentajes de radiactividad de la  $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$  formada a partir de la  $^3\text{H}-25(\text{OH})\text{D}_3$  disminuyen significativamente en el grupo de ratas hipomagnesémicas en todos los órganos excepto en suero, frente al grupo de ratas normales, hecho que induce a pensar en que el magnesio puede influir en la regulación de la 26-hidroxiolasa. En el grupo de ratas que presentan conjuntamente hipocalcemia e hipomagnesemia, el porcentaje de  $^3\text{H}-25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$  se hace indetectable con nuestra técnica de análisis, no siendo así en el grupo de ratas hipocalcémicas, en el que disminuyen en sangre y riñón y se hace indetectable en hueso e intestino. Estos resultados sugieren que, además de la influencia del magnesio sobre esta enzima, también puede ésta estar afectada por el calcio, no descartándose la posibilidad de la intervención en su regulación de los metabolitos de la vitamina  $\text{D}_3$ .

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la hipótesis de que la hipomagnesemia afecta a la síntesis de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , aunque es obligado continuar los estudios sobre este tema para dilucidar a qué nivel se produce esta alteración.

#### Agradecimiento

Este trabajo ha sido realizado en parte gracias a la ayuda número 3.443/79 de la Comisión Asesora de la Investigación Científica y Técnica.

#### Bibliografía

1. Norman AW: La vitamina D como hormona esteroidea: sinopsis de su sistema endocrino. En: *Avances en receptores hormonales*, pp 25-38. Editado por Navarro Moreno MA. II Jornadas Internacionales sobre Receptores Hormonales, 1983.
2. DeLuca HF: Regulation of vitamin D metabolism. The kidney as an endocrine organ. En: *Monographs on endocrinology*, pp 24-34. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1979.
3. Jones JE, Schwartz R y Krook L: Calcium homeostasis and bone pathology in magnesium deficient rats. *Calc Tissue Int* 31:231-238, 1980.
4. Forbes RM y Parker HM: Effect of magnesium deficiency on rat bone and kidney sensitivity to parathyroid hormone. *J Nutr* 110:1610-1617, 1980.

5. Jacob AI, Pennell JP, Lambert PW y Gabellas G: Vitamin D metabolites and parathyroid hormone in hypomagnesemic hypocalcemia. *Mineral Electrolite Metab* 6:316-322, 1981.
6. Reindhart TA, Horst RL, Orf JW y Hollis BW: A microassay for 1,25dihydroxyvitamin D npt requiring high performance liquid chromatography: aplicacion clinical studies. *J Clin Endocrinol Metab* 58:91-98, 1984.
7. Traba ML, Quesada M, Marín A, De la Piedra C, Babé M y Navarro F: Determinación del 25-dihidroxicolecalciferol en suero. *Rev Esp Fisiol* 40:69-76, 1984.
8. Traba ML, Babé M, De la Piedra C y Marín A: 24,25-dihidroxivitamin D in serum sample, purification with Sep-Pak C-18 cartridge and liquid chromatography before protein binding assay. *Clin Chem* 29:1807, 1983.
9. Bligh EG y Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem* 37:911, 1959.
10. Hartenbower DL, Henry HL, Norman AW y Coburn JW: Metabolism of vitamin D in experimental magnesium deficiency. *Clin Res* 23:322A, 1975.
11. Coburn JW, Reddy CR, Brickman AS, Hartenbower DL, Friedler RM y Norman AW: Vitamin D metabolism in magnesium deficiency. *Fed Proc* 32:918, 1973 (abstract).
12. Luckert BP: Effect of magnesium depletion on vitamin D metabolism in man. En: *Magnesium in health and disease*, pp 275-279. Spectrum Publications, 1980.
13. Miravet L, Ayigbede O, Carre M, Rayssignier Y y Larvor P: Lack of vitamin D action on serum calcium in magnesium deficient rats. En: *Magnesium in Health and Disease*, pp 281-289. Spectrum Publications, 1980.
14. Ralston S, Boyle IT, Cowan RA, Crean GP, Jenkins A y Thomson WS: PTH and vitamin D responses during treatment of hypomagnesaemic hypoparathyroidism. *Acta Endocrinol* 103:535-538, 1983.
15. Rude RK, Rizen E, Adams JS, Endres DB Horst RL y Singer FR: Low serum 1,25 dihydroxyvitamin D concentrations in human magnesium deficiency. Reunion American Society of Bone and Mineral Research. Connecticut, 1984.