

ARTÍCULOS ORIGINALES / *Originals*

MÉTODO MINIVASIVO DE MEDICIÓN DE LA REMODELACIÓN ÓSEA EN RATAS. VALIDACIÓN EN DISTINTOS MODELOS BIOLÓGICOS.*

Maela Lupo, Alfredo Rigalli.**

Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

Resumen

La remodelación ósea puede medirse con marcadores bioquímicos óseos, isótopos radioactivos e histomorfometría. En este trabajo se propone un método basado en la farmacocinética del fluoruro. El método consiste en la medición de la fluoremia y la excreción urinaria de fluoruro antes y después de una dosis endovenosa de fluoruro. Con los datos obtenidos se aplica un modelo matemático y se calcula la resorción (Ro) y formación ósea (Fo), medidos en $\mu\text{mol/l.min}$. El método fue validado en ratas Sprague-Dawley con osteoporosis inducida por ovariectomía (OVX), con tratamiento con zoledronato (OVX+Z), con insuficiencia renal por nefrectomía parcial (NFX) y con hipoparatiroidismo por paratiroidectomía (PX). En todos los casos se utilizó un grupo control (C) y cada grupo experimental contuvo 5 ratas; se utilizaron los test de Kruskal Wallis y Mann Whitney, considerando diferencias significativas si $p < 0,05$. Fo y Ro fueron mayores en OVX (Fo=1,36 \pm 0,56 [X \pm EE]; Ro=1,84 \pm 0,47) con respecto a C (Fo=0,50 \pm 0,07; Ro=0,56 \pm 0,38) y a OVX+Z (Fo=0,34 \pm 0,17; Ro=0,45 \pm 0,18). Fo y Ro fueron mayores en ratas NFX (Fo=5,00 \pm 0,40; Ro=5,08 \pm 0,45) con respecto a C (Fo=0,55 \pm 0,14; Ro=0,56 \pm 0,14). Fo y Ro fueron menores en PX (Fo=0,75 \pm 0,08; Ro=0,96 \pm 0,06) respecto de C (Fo=1,20 \pm 0,32; Ro=1,44 \pm 0,27). Conclusiones: el método es de bajo costo, mini-invasivo, requiere reducido volumen de sangre, permite el seguimiento de tratamientos con otras drogas y el mismo marcador es utilizado para medir ambos procesos. Los valores de resorción y formación ósea obtenidos coinci-

dieron con los valores que se esperaban en los modelos biológicos estudiados.

Palabras clave: remodelación ósea, hipoparatiroidismo, insuficiencia renal, osteoporosis postmenopáusicas, ratas, fluoruro.

Summary

NON-INVASIVE TECHNIQUE FOR THE MEASUREMENT OF BONE REMODELING IN RATS. VALIDATION IN DIFFERENT BIOLOGICAL MODELS

Bone remodeling can be measured through bone markers and histomorphometry. This work developed a technique to measure bone resorption (Br) and formation (Bf) in rats, using a mathematical model, fluoremia and renal excretion of fluoride, before and after an intravenous injection of fluoride, in rats. The aim of this work was to validate the method in biological models with modified bone remodeling. Mann Whitney or Kruskal Wallis tests were used to compare two or more groups, respectively. Results are expressed as mean \pm SEM and differences were considered significant if $p < 0.05$. Each experimental group is composed of 5 rats. The following models in Sprague-Dawley rats were used: 1) Post menopausal osteoporosis induced by ovariectomy without treatment (OVX) and with anti-resorptive treatment with zoledronate (OVX+Z) in 100-day-old rats. Bf and Br were higher in OVX (Bf=1.36 \pm 0.56, Br=1.84 \pm 0.47) than C (Bf=0.50 \pm 0.07, Br=0.56 \pm 0.38) and OVX+Z (Bf=0.34 \pm 0.17, Br=0.45 \pm 0.18). 2) Chronic renal failure in

* Este trabajo obtuvo el 1º premio a la Investigación Básica "AAOMM" en la XXV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Buenos Aires, Noviembre de 2008.

** Dirección postal: Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNR. Santa Fe 3100, (2000) Rosario, SF. Correo electrónico: arigalli@fmedic.unr.edu.ar



5/6 nephrectomized-100-day-old-male rats (NX). Bf and Br were higher in NX (Bf=5.00±0.40, Br=5.08±0.45) than in C (Bf=0.55±0.14, Br=0.56±0.14). 3) Hypoparathyroidism in parathyroidectomized-140-day-old-male rats (PX). Bf and Br were lower in PX (Bf=0.75±0.08, Br=0.96±0.06) than in C (Bf=1.20±0.32, Br=1.44±0.27). Conclusions: The values of bone resorption and formation are consistent with the expected values for the biological models. The technique is of low cost, mini-invasive and allows the evaluation of different treatments.

Key words: bone remodeling, menopausal osteoporosis, hypoparathyroidism, renal failure, rats, fluoride.

INTRODUCCIÓN

El tejido óseo se origina por dos mecanismos: osificación intramembranosa y osificación endocondral. Ambos procesos conducen a la formación de un mismo tipo de hueso, que luego se mantiene por el proceso de remodelación ósea que consta de dos procesos básicos: la resorción y la formación ósea. Los osteoclastos son las principales células encargadas de la resorción. Entre la fase de resorción y la de formación, se da un proceso conocido como fase de reversión, en el cual las células mononucleares, como macrófagos, forman una capa de cemento que une el hueso neoformado con el tejido óseo existente. Luego de la formación de matriz, ésta se calcifica y la velocidad del proceso depende de la presencia de pirofosfato, proteínas no colágenas acídicas de la matriz ósea y de la expresión de fosfatasa alcalina en la membrana del osteoblasto. Normalmente los procesos de resorción y formación ósea están acoplados, es decir la resorción y formación ocurren en igual magnitud. Estos procesos mantienen la estructura del hueso, removiendo hueso antiguo, con defectos o con microfracturas y rellenando con tejido óseo nuevo.¹

En algunas patologías, la remodelación ósea puede estar aumentada o disminuida respecto del valor normal, no siendo ninguna de

las dos situaciones deseables.

La medición de la remodelación ósea es un proceso que ha sido encarado de maneras diferentes, dependiendo si se trata de necesidades clínicas o de investigación básica. Una técnica utilizada para la determinación de la remodelación ósea es la histomorfometría ósea.² Requiere la toma de biopsias óseas y el procesamiento histológico del material. Mientras que la histomorfometría estática se puede realizar con técnicas histológicas convencionales, la histomorfometría dinámica se realiza sobre cortes histológicos de hueso sin desmineralizar, y tratamiento previo con tetraciclinas, siendo aplicable a trabajo con animales. El análisis de los resultados puede dar una medida del estado del proceso de remodelación ósea. La desventaja y ventaja de este método es que informará respecto de la zona donde se obtuvo la biopsia y requiere un personal muy especializado. Los parámetros que se pueden medir son numerosos y la aparición de *software* de análisis de imágenes ha contribuido a hacer estas mediciones de manera cuantitativa.

Otra técnica de medida de la remodelación ósea es por medio de la utilización de marcadores bioquímicos óseos. Estas son moléculas cuya concentración se puede medir en plasma y orina, e indican el estado metabólico del tejido óseo.³⁻⁵ Sus concentraciones se detectan habitualmente por ELISA, IRMA o RIA. Existen diversas marcas comerciales y tipos de ensayos para cada uno. Los valores de referencia dependen de las marcas comerciales y la metodología utilizada. Los marcadores bioquímicos óseos son de amplia aplicación en la clínica, dan una medida global del esqueleto, y no requieren personal altamente capacitado. Como desventajas se pueden mencionar que los valores hallados no siempre se correlacionan con la clínica o la realidad dentro del tejido óseo y el elevado costo de los equipos de determinación. Existen marcadores de resorción y formación ósea. Los marcadores de formación más utilizados son: fosfatasa alcalina total, fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina (BGP). Entre los marcadores de

resorción en la actualidad se dispone de hidroxiprolina, piridinolina (Pyr), desoxipiridinolina (D-Pyr), telopéptidos: NTX y CTX, catepsina K, sRANKL, péptido helicoidal del colágeno.

Por último, se puede tener en cuenta que el calcio y el fosfato son dos iones utilizados en la formación del cristal de hidroxiapatita, responsable de la calcificación del hueso. Existen iones que tienen afinidad específica por el tejido óseo y pueden ser utilizados como trazadores de dicho tejido. La captación de calcio radiactivo por el hueso⁶ como la de algunos bifosfonatos con trazadores radiactivos que reemplazan al fosfato en el cristal han sido utilizados como medida de la remodelación ósea.^{7, 8}

Existen otros iones que pueden ser intercambiados por otras partes del cristal, tal es el caso del estroncio y del fluoruro.

La medición de la remodelación ósea y los resultados obtenidos sigue siendo un problema en la clínica y en la investigación básica especialmente con animales, donde los marcadores bioquímicos óseos no están tan desarrollados

La retención corporal de fluoruro ha sido utilizada como trazador del tejido óseo. Este método se ha validado contra la captación de metil-bifosfonato marcado con ^{99m}Tc. Se halló que en pacientes en los cuales el proceso de remodelación ósea estaba aumentado, la retención corporal de fluoruro se hallaba aumentada y esto, correlaciona adecuadamente con otros parámetros de la remodelación ósea como son la excreción urinaria de hidroxiprolina y de la fosfatasa alcalina ósea.⁹ Sin embargo, la técnica carece de adecuada sensibilidad para detectar pequeños cambios.

La medición de la remodelación ósea en animales de experimentación es necesaria para evaluar el progreso del tratamiento con drogas que tienen efecto sobre el tejido óseo, cuando estas sustancias se encuentran en fase de desarrollo.

La farmacocinética del fluoruro de sodio y el monofluorofosfato de sodio han sido extensamente estudiadas,¹⁰⁻¹² obteniéndose modelos matemáticos precisos para la

obtención de los parámetros en la rata. Este trabajo muestra el desarrollo de un modelo matemático, la metodología y los cálculos necesarios para medir simultáneamente la remodelación y formación ósea en esta especie. En este trabajo se muestra la validación del método en modelos experimentales quirúrgicos con remodelación ósea modificada y valores predictivos del proceso como son la ovariectomía, el tratamiento con drogas antirresortivas, la nefrectomía y la paratiroidectomía.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó con ratas Sprague-Dawley provenientes del Bioterio central de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. El número de animales así como sexo y edad se especifican en cada uno de los modelos. El proyecto de investigación fue aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario. El manejo de los animales se realizó acorde con las reglas internacionales.^{13,14} Antes de cada cirugía los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (6 mg/100 g peso corporal) y xilazina (0,6 mg/100 g peso corporal), por vía intramuscular. La zona de incisión se desinfectó con iodopovidona y cuando se detectó falta de analgesia suficiente como para comenzar la cirugía se realizó la inyección de 10 µl de clorhidrato de lidocaína en 4-5 puntos adyacentes a la zona de incisión. Se suturaron los planos musculares con lino 90 y el cuero con nailon 50. Se desinfectó la herida con clorhexidina e inmediatamente después de la cirugía los animales recibieron una dosis intramuscular de ceftriaxona 3 mg/100 g peso corporal en 0,1 ml de solución fisiológica estéril en el muslo derecho y 0,05 ml/100 g peso corporal de diclofenac de 25 mg/ml por vía intramuscular, en el muslo izquierdo. La dosis de diclofenac se repitió cada ocho horas durante el primer día del período post-operatorio. Se colocó un collar isabelino que se retiró pasadas



48 horas de la cirugía, con el objetivo de evitar la autoinjuria del animal. Los animales fueron mantenidos en un bioterio con ciclo luz-oscuridad (12 h-12 h), temperatura 23-27°C, en jaulas metabólicas individuales, con probetas para la provisión de agua y recolección de orina, ambas con apreciación $\pm 0,5$ ml. Salvo el día previo a las cirugías en que las ratas se ayunan por 24 h y el día posterior que se les proveen 10 g de alimento; los animales fueron alimentados con dieta para roedores (Gepsa, Argentina) *ad libitum*. Las muestras de sangre se obtuvieron de la punta de la cola en capilares heparinizados.

Medición de la remodelación ósea

El estudio consta de tres etapas que se realizan en tres días consecutivos.

Día 1: Mediciones basales: Se realizó una inyección intravenosa en la vena de la cola, de 67 μ l/100 g de peso corporal de solución fisiológica, bajo anestesia inhalatoria con éter sulfúrico. El objetivo de esta inyección fue reproducir la intervención que se realizará en el segundo día. De esta manera el animal está sometido en el día de mediciones basales a los efectos de la inyección y la anestesia, situaciones que actúan como factores importantes de generación de estrés. Luego de la inyección se obtuvo una muestra de sangre. Se recolectó orina durante 24 h.

Día 2: Mediciones post-minidosis de NaF: Luego de la recolección de orina de 24 hs se le realizó una inyección endovenosa de 1 μ mol F/100 g de peso corporal (67 μ l/100 g de peso corporal de una solución 15 mmol/l de NaF, Sigma Co., St Louis, MO, USA). Para esto se llevaron a cabo los mismos pasos descritos para la inyección de solución fisiológica del día 1. Luego de la inyección de NaF se obtuvieron tres muestras de sangre a los 3, 18 y 33 minutos de la inyección endovenosa. La primer muestra se extrajo a los 3 minutos de la inyección de manera que el fluoruro se distribuya uniformemente en el compartimiento sanguíneo. Se recolectó orina otras 24h.

Día 3: Se recolectó orina de las 24 h post dosis de NaF.

Se determinó la concentración de fluoruro en muestras de plasma y orina como se describe más adelante. En el tercer día se terminó el estudio, retornando la rata a la condición previa al estudio.

Cálculo de remodelación, formación y resorción ósea

Para estos cálculos se utilizó un modelo matemático desarrollado a partir de la farmacocinética del fluoruro en la rata (ver Anexo).

Con los valores de fluoremia basal y la concentración de fluoruro de la orina obtenido el día 2 se calculó la remodelación ósea (resorción ósea + formación ósea), que simbolizaremos en adelante con V_o . Posteriormente, con las fluoremias medidas en las muestras obtenidas el día 2 (3, 18 y 33 minutos luego de la dosis de NaF) y la concentración de fluoruro en orina obtenida el día 3 se calculó el valor de resorción ósea (R_o). Con los valores obtenidos de V_o y R_o se obtiene el valor de formación ósea (F_o). F_o y R_o se miden en μ mol/l.min

MODELOS BIOLÓGICOS CON REMODELACIÓN ÓSEA MODIFICADA

Insuficiencia renal (modelo de alta remodelación ósea)

La insuficiencia renal se indujo por nefrectomía de 5/6 (NFX)¹⁵ en 5 ratas macho de 7 semanas. Un grupo de 5 ratas se utilizó como grupo control con cirugía simulada (*sham* NFX). El modelo quirúrgico implica la realización de dos cirugías separadas por 1 semana: Primer cirugía: luego de la anestesia se le realizó la ablación del riñón derecho previa incisión lumbar paramedial derecha y ligado del pedículo renal. Segunda cirugía: se realizó una incisión sub-frénica izquierda, y luego de la identificación del riñón izquierdo se retiró el tejido conectivo próximo al pedículo renal dejando a la vista la arteria renal y sus ramas. Se llevó a cabo una microligadura quirúrgica, por medio de lupa estereoscópica de dos de tres ramas extrarrenales de la arteria renal izquierda, provocando una necrosis isqué-

mica de aproximadamente dos tercios (2/3) del parénquima. Se comprobó la isquemia por cambios en la coloración del tejido, que cambia de color rojo oscuro a negro. A los animales del grupo control (*sham* NFX) se los expuso a una cirugía simulada, que consistió en los mismos pasos pero sin la extirpación del riñón derecho y la ligadura de las mencionadas ramas arteriales del riñón izquierdo.

Sesenta días después de la segunda cirugía los animales NFX y los *sham* NFX fueron sometidos a medición de la remodelación, formación y resorción ósea como se detalló anteriormente. El mismo día se determinó el *clearance* de creatinina para evaluar la función renal, a través de valores de creatinina plasmática, urinaria y el volumen minuto urinario.

Ovariectomía (modelo de alta remodelación ósea) y tratamiento con bifosfonatos (droga antiresortiva)

Se realizó ovariectomía bilateral (OVX) en un grupo de 10 ratas hembras de 9 semanas. Cinco ratas ovariectomizadas recibieron inyección subcutánea semanal de ácido zoledrónico (0,15 µg/100 g de peso corporal). Las otras 5 ratas OVX actuaron como modelo de osteoporosis postmenopáusicas. El grupo control estuvo formado por 5 ratas que fueron sometidas a cirugía simulada (*sham* OVX). La ovariectomía se realizó a través de dos incisiones ventrales paramediales y dos ligaduras, una a la altura de la arteria ovárica y otra en el extremo distal del útero. Se realizó luego la excisión del ovario. Sesenta días después de la ovariectomía y el tratamiento con ácido zoledrónico se midió la remodelación ósea. El éxito de la ovariectomía fue verificado al finalizar el experimento por la disminución del peso del útero respecto de los animales *sham* OVX.

Paratiroidectomía (Modelo de baja remodelación ósea)

Se realizó paratiroidectomía en 5 ratas macho de 18 semanas (PX) y 5 ratas fueron

sometidas a una cirugía simulada (*sham* PX). Se realizó una incisión mediana en el cuello a la altura del músculo esternohioideo, exponiendo la glándula tiroidea. Con la ayuda de microfórceps, bisturí y una lupa estereoscópica se realizó la ablación de ambas glándulas paratiroideas. Treinta días después de la paratiroidectomía se realizó la medida de la remodelación ósea. El éxito de la cirugía fue verificado por medio de la medición de calcemia 48-72 horas luego de la operación. Los niveles de calcio en plasma menores de 7,5 mg/dl indican el éxito de la cirugía.

Determinaciones

Calcemia: por espectrofotometría con un *kit* comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

Creatinina urinaria y plasmática: por espectrofotometría con *kit* comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

Fluoruria: por potenciometría directa con electrodo de ion específico Orion 94-04, Orion Research Inc., Cambridge MA, USA.¹⁵

Fuoremia: se realizó por potenciometría directa post destilación isotérmica del flúor de las muestras de plasma.¹⁶

Análisis estadísticos

Cuando se compararon más de una muestra se utilizó el test de Kruskal Wallis y para la comparación de dos muestras el test de Mann Whitney. Se consideraron diferencias significativas si $p < 0,05$. Por claridad los resultados se presentaron como $\text{media} \pm \text{error estándar}$, aunque los tests utilizados fueron no paramétricos.

RESULTADOS

Insuficiencia renal crónica inducida por nefrectomía de 5/6 en ratas macho de 120 días (NFX).

Fo y Ro fueron mayores en ratas NFX con respecto a *sham* NFX (Fig 1). El *clearance* de creatinina de los animales NFX ($1,23 \pm 0,3$ ml/min) fue significativamente menor que en el grupo *sham* NFX ($2,5 \pm 0,8$ ml/min).

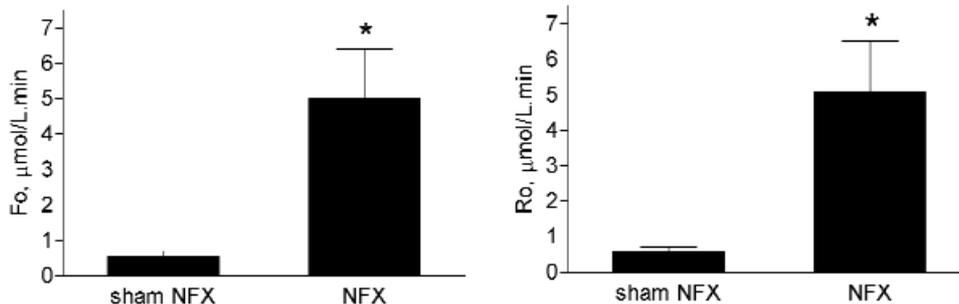


Figura 1. medidas de formación ósea (Fo, izquierda) y resorción ósea (Ro, derecha) en ratas controles (*sham* NFX) y con insuficiencia renal (NFX). Los resultados se expresan como $\text{media}\pm\text{EE}$ por razones de simplicidad, aunque el análisis estadístico fue el test de Mann Whitney. * indica diferencias significativas respecto de *sham* NFX $p < 0,05$.

Osteoporosis postmenopáusica inducida por ovariectomía sin tratamiento (OVX) y con tratamiento antirresortivo con ácido zoledrónico (OVX+Z) en ratas de 130 días. Fo y Ro fueron mayores en OVX con respec-

to a *sham* OVX y a OVX+Z (Fig. 2). El peso del útero ($\text{mg}/100$ g peso corporal) de los animales OVX ($32,3\pm 1,1$) fue significativamente menor que en los animales *sham* OVX ($140,0\pm 20,0$).

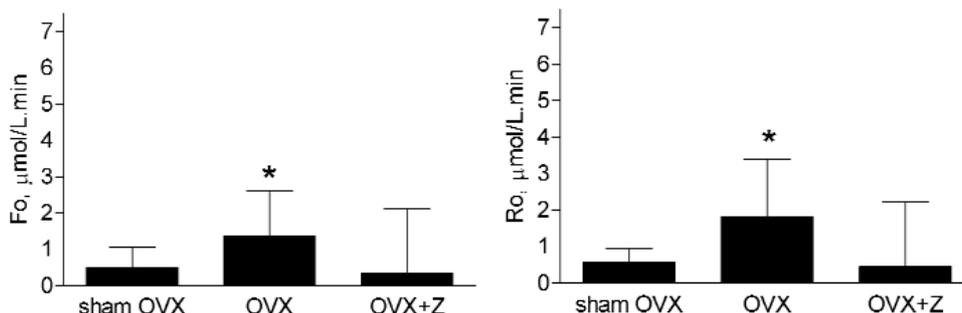


Figura 2. Medidas de formación ósea (Fo, izquierda) y resorción ósea (Ro, derecha) en ratas controles (*sham* OVX), en ratas ovariectomizadas (OVX) y en ovariectomizadas con tratamiento antirresortivo (OVX+Z). Los resultados se expresan como $\text{media}\pm\text{EE}$ por razones de simplicidad, aunque el análisis estadístico fue el de Kruskal Wallis. * indica diferencias significativas respecto de los otros grupos $p < 0,05$.

Hipoparatiroidismo por paratiroidectomía (PX) en ratas macho de 150 días Fo y Ro fueron significativamente menores en PX respecto de Sham PX (Fig. 3). La cal-

cemia (mg/dl) de los animales paratiroidectomizados ($3,8\pm 1,9$) fue significativamente menor que en los *sham* PX ($9,7\pm 0,9$).

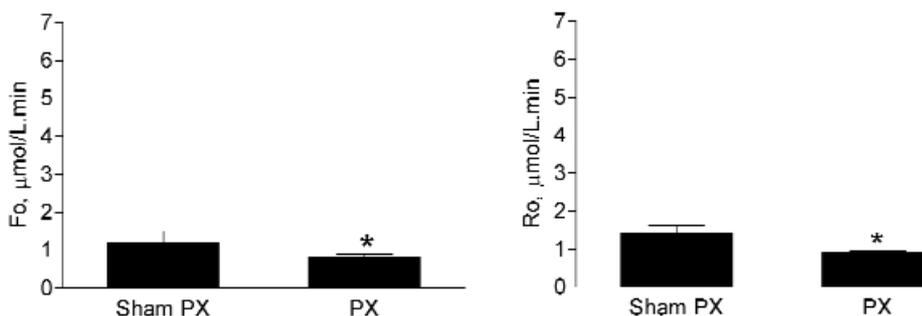


Figura 3. Medidas de formación ósea (Fo, izquierda) y resorción ósea (Ro, derecha) en ratas controles (*sham* PX) y con paratiroidectomía (PX). Los resultados se expresan como $\text{media}\pm\text{EE}$ por razones de simplicidad, aunque el análisis estadístico fue el test de Mann Whitney. * indica diferencias significativas respecto de *sham* PX $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Los valores de resorción ósea (R_o) y formación ósea (F_o) obtenidos coincidieron con los valores esperados de dichas variables en los modelos biológicos estudiados. El método propuesto es de baja complejidad aunque presenta algunas limitantes y desventajas: 1. La aplicación del método en ratas en tratamiento con compuestos que contienen flúor requiere correcciones adicionales (no presentadas en este trabajo). 2. F_o y R_o dependen de la precisión en la medición de la concentración de flúor. 3. La inyección endovenosa, aunque es una técnica de baja complejidad, requiere adiestramiento especial y es dificultosa en animales de bajo peso corporal. Por otro lado se pueden enumerar sus ventajas respecto de otros métodos de medición de la remodelación ósea: 1. Bajo costo. 2. Mini-invasividad. 3. Reducido volumen de sangre. 4. Permite el seguimiento de tratamientos con otras drogas. 5. El mismo marcador es utilizado para medir ambos procesos. 6. Da una medida de resorción y formación ósea que hace referencia a todo el esqueleto. Se están realizando mediciones histomorfométricas estáticas de los huesos de los animales que participaron en el estudio, así como determinaciones bioquímicas de marcadores óseos (desoxipiridinolina urinaria y fosfatasa alcalina ósea). La correlación entre los valores de estos métodos aceptados para la medición de la remodelación y los valores obtenidos con este método aportarán mayor validez a la metodología planteada.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Agustín Ramírez y Valeria Dalmau por la colaboración en la realización del modelo de insuficiencia renal, a Jéssica Nipoti, Diego Holotte, María J. Pretini y Verónica Di Loreto por la colaboración en el modelo de ovariectomía. A laboratorios Wiener Lab por la donación de los reactivos utilizados en la determinación de creatinina y calcio. Los trabajos fueron

financiados con subsidios de CONICET (PIP 5018) y fundación Alberto J. Roemmers.

(Recibido: febrero de 2009. Aceptado: marzo de 2009)

ANEXO: Modelo matemático para la determinación de la remodelación ósea.

Modelo en ausencia de una dosis externa de fluoruro:

La distribución del fluoruro en diferentes compartimientos biológicos se puede representar a través del esquema de la figura 4

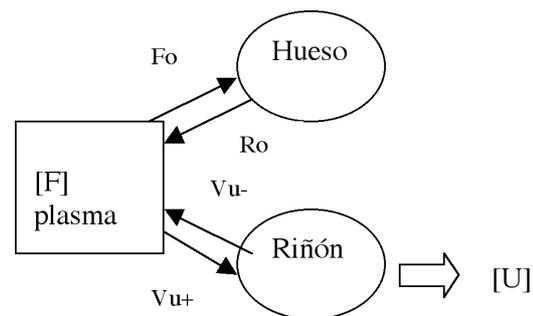


Figura 4.

Donde F_o : velocidad de ingreso de fluoruro al tejido óseo que será considerado una estimación del proceso de formación ósea. R_o : velocidad de salida de fluoruro del tejido óseo, que será utilizado como estimación de la resorción ósea. V_{u+} : velocidad de filtración renal de fluoruro, V_{u-} : velocidad de reabsorción renal de fluoruro. $[U]$: concentración urinaria de fluoruro. $[F]$: concentración plasmática de fluoruro.

La concentración de fluoruro en plasma ($[F]$) depende de los procesos mencionados: F_o , R_o , V_{u+} y V_{u-} .

La variación de $[F]$ puede representarse por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d[F]}{dt} = V_o - V_u$$

donde

$$V_o = R_o - F_o$$

$$V_u = V_{u+} - V_{u-}$$



V_o : remodelación ósea y V_u : manejo renal de fluoruro.

En ausencia de dosis de fluoruro, la concentración de fluoruro en plasma tiene un valor constante, hallándose esta variable en estado estacionario. Por lo tanto

$$\frac{d[F]}{dt} = V_o - V_u = 0 \quad (1)$$

por otra parte, la excreción renal de fluoruro (V_u) que depende de la concentración plasmática del mismo, se puede representar por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d[U]}{dt} = k_u \cdot [F] = V_u \quad (2)$$

De (1) se deduce que

$$V_o = V_u$$

por lo tanto la variación de la concentración de fluoruro en orina se puede expresar por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d[U]}{dt} = V_o$$

Resolviendo la ecuación diferencial:

$$\int_{[U_0]}^{[U]} d[U] = V_o \cdot \int_0^t dt$$

Como $[U_0] = 0$, resulta

$$[U] = V_o \cdot t$$

por lo tanto la remodelación ósea (V_o) se calcula por

$$V_o = \frac{[U]}{t} \quad (3)$$

donde $[U]$ es la concentración de fluoruro urinaria acumulada durante 24 h y t es el tiempo durante el cual se recolectó la orina.

Luego de una dosis externa de flúor

Luego de una dosis intravenosa de NaF, la distribución del anión se puede representar esquemáticamente como se muestra en figura 5.

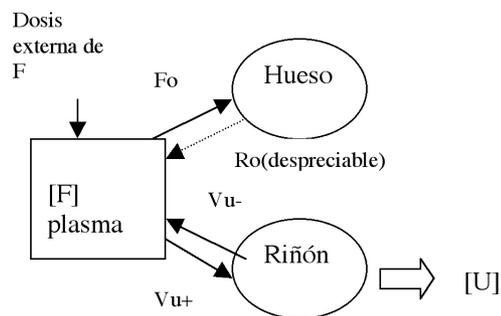


Figura 5.

Donde las variables son las mismas que las descritas para el modelo en ausencia de una dosis externa (figura 4).

En estas condiciones la concentración de fluoruro en plasma puede ser representada por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d[F]}{dt} = V_o - V_u$$

donde

$$V_o = R_o - F_o$$

Reescribiendo la ecuación

$$\frac{d[F]}{dt} = R_o - F_o - V_u$$

Luego de una dosis externa de flúor, se supone que el proceso de salida de fluoruro del hueso (R_o) es despreciable con respecto al ingreso de fluoruro al hueso (F_o) y a la depuración urinaria de fluoruro (V_u). Por lo tanto:

$$\frac{d[F]}{dt} = -F_o - V_u \quad (4)$$

Al resolver esta ecuación se tiene en cuenta que la salida de fluoruro del esqueleto depende de la cantidad de fluoruro en el hueso, mientras que el ingreso de fluoruro al tejido óseo depende de la concentración del anión en el líquido extracelular. Ambas consideraciones quedan representadas en las siguientes ecuaciones:

$$R_o = k_r \cdot [F_{oseo}] \quad (5)$$

Donde kro es la constante de velocidad del proceso de salida de fluoruro del hueso y [Foseo] la concentración de fluoruro óseo.

$$F_o = kfo.[F] \quad (6)$$

Donde kfo es la constante de velocidad de entrada de fluoruro al hueso

En base a estas dos ecuaciones se puede fundamentar la suposición realizada respecto de Ro. Luego de una dosis de NaF la [F] es elevada, mientras que en ese mismo intervalo de tiempo la [Foseo] se mantiene constante y será baja si el animal no ha sido expuesto durante largos períodos de tiempo a tratamiento con compuestos con flúor.

Dado que los procesos estudiados son de orden 1, las constantes se pueden operar algebraicamente.

Reemplazando en la ecuación (4) las ecuaciones (6) y (2), resulta

$$\frac{d[F]}{dt} = -kfo.[F] - ku.[F] = -(kfo + ku)[F] = -ke.[F]$$

$$ke = kfo + ku \quad (7)$$

Eliminando términos de la igualdad:

$$\frac{d[F]}{dt} = -ke.[F] \quad (8)$$

Integrando ambos miembros de la ecuación diferencial (8)

$$\int_{[F_0]}^{[F]} \frac{d[F]}{[F]} = -ke \int_0^t dt$$

Resolviendo:

$$\ln \frac{[F]}{[F_0]} = -ke.t \quad (9)$$

Donde [F] y [F₀] son las concentraciones plasmáticas de fluoruro a un dado tiempo y al tiempo inicial luego de la inyección endo-

venosa de NaF, respectivamente.

Reordenando la ecuación (9):

$$[F] = [F_0].e^{-ke.t} \quad (10)$$

Reemplazando la concentración inicial ([F₀]) por el cociente entre la dosis intravenosa (D₀) y el volumen de distribución (V_d), obtenemos

$$[F] = \frac{D_0}{V_d} e^{-ke.t} \quad (11)$$

Rectificando la ecuación (11)

$$\ln[F] = \ln \frac{D_0}{V_d} - ke.t \quad (12)$$

Con los datos de las concentraciones de fluoruro en plasma luego de la minidosis de NaF se obtienen los parámetros de la ecuación (12): su pendiente (ke) y su ordenada al

origen ($\ln \frac{D_0}{V_d}$). Dado que D₀ es conocido se

puede obtener el valor de V_d, por medio del valor de la ordenada al origen.

La variación de la concentración de fluoruro en orina: [U], luego de la dosis intravenosa de NaF está dada a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{d[U]}{dt} = ku.[F] \quad (13)$$

Reemplazando la ecuación (10) en (13) se obtiene

$$\frac{d[U]}{dt} = ku.[F_0].e^{-ke.t}$$

Resolviendo la ecuación anterior

$$\int_{[U_0]}^{[U]} d[U] = ku.[F_0] \int_0^t e^{-ke.t} dt$$



Cuya solución es:

$$[U] - [U_0] = \frac{ku[F_0]}{ke} (1 - e^{-ke.t})$$

Como $[U_0]=0$

$$[U] = \frac{ku.D_0}{Vd.ke} (1 - e^{-ke.t}) \quad (14)$$

Luego de 24 hs de la mini dosis de NaF se puede considerar que el fluoruro no retenido en el hueso se ha excretado completamente por orina. Este tiempo es suficientemente largo como para considerarse a la excreción urinaria es a tiempo infinito ($[U]_\infty$). Por lo tanto la ecuación (14) resulta:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} [U] = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{ku.D_0}{Vd.ke} (1 - e^{-ke.t}) = [U]_\infty$$

Por lo tanto:

$$[U]_\infty = \frac{ku.D_0}{Vd.ke} \quad (15)$$

Reemplazando en la ecuación anterior los valores obtenidos de $[U]_\infty$ (a partir de la fluoruria luego de 24 post inyección), Vd (obtenido por medio de la ordenada al origen de la recta correspondiente a la ecuación 12), D_0 (mini dosis inyectada) y ke (pendiente de la recta de la ecuación 12) se obtiene ku. Con los valores obtenidos de ke y ku, y la ecuación (7) se obtiene kfo. Por medio de la ecuación (6) y la concentración de fluoruro basal se obtiene Fo. Finalmente, con el valor de la remodelación ósea (V_0) obtenido en la ecuación (3) y el valor de la formación ósea (F_0) se obtiene la medida de resorción ósea (R_0) por la ecuación.

$$V_0 = R_0 - F_0.$$

Referencias

1. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:191-220.
2. Parfitt AM. Bone histomorphometry: proposed system for standardization of nomenclature, symbols, and units. *Calcif Tissue Int* 1988; 42:284-6.
3. Delmas PD, Wahner HW, Mann KG, Riggs BL. Assessment of bone turnover in postmenopausal osteoporosis by measurement of serum bone Gla-protein. *J Lab Clin Med* 1983; 102:470-5.
4. Nobbs BT, Walker AW, Davies TJ. A simplified method for the estimation of urinary total hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 1975; 64:219-25.
5. Puche RC, Caferra DA, Rosillo I. Bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase measured with wheat germ agglutinin. *Clin Chem* 1988; 34:219-25.
6. Reeve J. Radiotracer methods for studying bone formation and its disorders. En: Osteoporosis (Christiansen C *et al.*, eds). Copenhagen; Dept of Clinical Chemistry, Glostrup Hospital, 1984; pp133-8.
7. Hyldstrup L, Mogesen N, Jensen GF, Transbolt I. Urinary ^{99m}Tc diphosphonate excretion as a simple method to quantify bone metabolism. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44:105-9.
8. Thomsen K, Rodbro P, Christiansen C. Bone turnover determined by urinary excretion of ^{99m}Tc diphosphonate in the prediction of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1987; 2:125-32.
9. Puche RC, Rigalli A, Trumper L, et al. Estimation of bone turnover in climacteric women by the whole body retention of fluoride. *Maturitas* 1991; 14:57-64.

10. Rigalli A, Ballina JC, Beinlich A, Alloatti R, Puche RC. Pharmacokinetic differences between sodium fluoride and sodium monofluorophosphate and comparative bone mass increasing activity of both compounds, in the rat. *Arzneimittelforschung* 1994; 44:762-6.
11. Rigalli A, Cabrerizo M, Beinlich A, Puche RC. Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. *Arzneimittelforschung* 1994; 44:651-5.
12. Rigalli A, Morosano M, Puche RC. Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or sodium monofluorophosphate to human volunteers. *Arzneimittelforschung* 1996; 46:531-3.
13. US Department of Health and Human Services. NIH Publication N° 86-23, revised 1985, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.
14. Canadian Council on animal care Guidelines. Guide to the care and use of experimental animal. Guide Vol. 1, 2nd Edition, 1993.
15. Gretz N, Strauch M. The remnant kidney model. En: Experimental and genetic rat models of chronic renal failure (Gretz N, Strauch M, eds.). Karger; Basel, 1993; pp 1-28.
16. Rigalli A, Pera LI, Di Loreto V, Brun LR. Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. Rosario; Editorial de la Universidad Nacional de Rosario, 2007; pp 65-9.