

6. HIPÓTESIS SOBRE MECANISMOS DE ACCIÓN DE COMPUESTOS CON FLÚOR SOBRE EL TEJIDO ÓSEO

ALFREDO RIGALLI,* RODOLFO PUCHE

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

Resumen

El fluoruro es un potente estimulador de la formación ósea debido a que produce la diferenciación y proliferación de osteoblastos a partir de sus precursores. Este efecto se debería en parte a su acción a dos niveles en los mecanismos de transducción de señales. Por una parte el fluoruro inhibiría una tirosinofosfatasa ácida encargada de defosforilar dominios citosólicos de receptores de tirosinkinasa, produciendo de esta manera la prolongación de los efectos de factores de crecimiento. Por otro lado estimularía ciertas proteínas G que por mecanismos aun desconocidos activaría vías de señalización mediadas por kinasas ERK. De esta manera se produce un estímulo en la diferenciación y proliferación que se manifiesta *in vitro* e *in vivo* por un aumento de expresión de fosfatasa alcalina en la membrana del osteoblasto y un incremento en la síntesis de osteocalcina por estas células.

Palabras clave: fluoruro, MFP, mecanismo de acción, diferenciación, crecimiento

HYPOTHESES ABOUT THE MOLECULAR MECHANISM UNDERLYING THE MITOGENIC ACTIVITY OF FLUORIDE IN BONE CELLS

Abstract

*Fluoride is a potent stimulator of bone formation because it increases differentiation and proliferation of osteoblasts. This effect would be the consequence of two putative mechanism: 1- fluoride inhibits a tyrosin phosphatase of osteoblasts, which dephosphorylates cytosolic domains of tyrosin kinase receptors. As a consequence the half-life of phosphorylated kinases increases, enhancing the effect of some growth factors. On the other hand, fluoride would stimulate G proteins which stimulates signaling pathways that involved ERK kinases. The result of these effects is an increase in differentiation of osteoblasts *in vitro* and *in vivo*, in the expression of alkaline phosphatase in the membrane of precursors of osteoblasts and in the production of osteocalcin.*

Key words: fluoride, MFP, mechanism, differentiation, proliferation, mitogenic action.

Efectos mitogénicos

El fluoruro es indiscutiblemente un estimulador de la formación ósea, produciendo una mayor densidad mineral ósea, en casos de ingestas adecuadas durante largos períodos de tiempo. A nivel terapéutico este efecto no siempre se ha logrado y quedan dudas respecto de la resistencia y calidad del hueso formado.

La hipótesis con más evidencia experimental que explica el mecanismo de acción del fluoruro es su efecto sobre una enzima tirosinofosfatasa ácida encargada de defosforilar los dominios citosólicos de ciertos receptores de proteína quinasa intrínseca.¹ Estos receptores, que en general tienen como ligando a factores de crecimiento, se autofosforilan al unirse al ligando, activando vías de transducción de señales que involucran a las proteínas Shc, Grb2, Sos, Ras, Raf, MEK y ERK-2 (Figura 1). Estas últimas fosforilarían a ciertos factores nucleares que aumentarían la expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular, produciendo la proliferación celular y diferenciación. La inhibición de la tirosinofosfatasa aumentaría la vida media de intermediarios fosforilados de la cascada de señalización y de esta manera estaría induciendo la proliferación y diferenciación celular a nivel osteoblástico, con el consecuente aumento de la formación ósea.

La experimentación al respecto, si bien no es muy abundante, arroja resultados concluyentes. En cultivos de células de frontal de embrión de pollo, el fluoruro en concentraciones hasta 10 micromoles/L aumentó la incorporación de timidina tritiada y prolina, la expresión de fosfatasa alcalina y la incorporación de calcio, signos claros de estímulo osteogénico. *In vitro*, células óseas expuestas al fluoruro aumentaron la expresión de fosfatasa alcalina, signo de diferenciación de la progenie osteoblástica.² Este efecto no se observó con otros cultivos celulares provenientes de riñón, hígado, piel y músculo. El efecto del fluoruro no se observó en ausencia de factores externos y fue restablecido en presencia de insulina, IGF-1, calcitonina y parathormona.³

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



Estos resultados estarían indicando que el efecto del fluoruro es selectivo del tejido óseo y requiere la activación de vías de señalización por intermedio de factores de crecimiento.

En pacientes tratados por 2 años con sales de flúor se demostró incremento en el número de osteoblastos y la síntesis de matriz ósea.⁴

El efecto del fluoruro es más importante cuanto más indiferenciadas se encuentran las células, y la presencia de fosfato es determinante. El fluoruro aumenta el proceso de diferenciación de células formadoras de hueso como así también la actividad de fosfatasa alcalina y la producción de osteocalcina (ambos marcadores de diferenciación de osteoblastos). También aumenta el transporte de fosfato inorgánico en células osteoblásticas en cultivo. El fosfato potencia el efecto mitogénico del fluoruro.

La inhibición de vías de señalización relacionadas a receptores asociados a proteínas G y proteínquinasa C⁵ podría estar modificando a su vez los efectos del fluoruro sobre las vías mencionadas.

Otro mecanismo propuesto –no excluyente del planteado anteriormente– es la hipótesis de las proteínas G.⁶ Estas proteínas actúan como nexo entre receptores de membrana y enzimas intracelulares que producen segundos mensajeros. Dado que el fluoruro no produce aumento de la proliferación en ciertos tipos de células en cultivo, pero sí en presencia de Al³⁺, se propuso que el fluoruro formaría con el Al³⁺ un complejo AIF⁴⁻, que es estimulador de las proteínas G. Se observó aumento de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y aumento de la proliferación, siendo el efecto bloqueado en parte por inhibidores de tirosinkinasa. El complejo AIF⁴⁻, de estructura tetrahédrica, simi-

lar al fosfato inorgánico, actuaría favoreciendo el intercambio GDP - GTP de la subunidad alfa de la proteína G, que por un mecanismo aún desconocido favorecería la fosforilación en tirosinas de proteínas involucradas en la activación de ciertos genes.

Estudios del transcriptoma celular por técnicas de *microarray* de genes indican que aproximadamente mil genes se expresan de manera diferente entre individuos que presentan fluorosis dental respecto de los que no la padecen.⁷ Estos datos son evidencia de que el fluoruro afecta la expresión génica. No se conocen datos a nivel óseo, pero posiblemente ocurra un fenómeno similar entre respondedores y no respondedores al tratamiento con fluoruro.

En el caso del monofluorofosfato de sodio (MFP), se suma a los efectos mencionados la presencia de MFP ligado a la alfa-2-macroglobulina ($\alpha 2m$). Esta proteína se inactiva por su unión al MFP, produciendo cambios conformacionales que determinan su eliminación del plasma por receptores específicos e inespecíficos presentes en hígado y hueso. El receptor LRP (lipoprotein receptor-related protein) es uno de los encargados de este clearance. La diferenciación y proliferación de osteoblastos a partir de células pluripotentes del estroma de la médula ósea involucra a las cascadas de señalización del sistema Wnt/beta-catenina. Los osteoblastos poseen expresión del receptor LRP en sus isoformas LRP5 y LRP6. La acción de Wnt sobre el osteoblasto requiere la heterodimerización del receptor LRP5/6 y el receptor Frizzled. La dimerización produce señales intracelulares que inhiben a la enzima GSK3 (glycogen synthase kinase 3). La GSK3 normalmente fosforila a beta-catenina, haciéndola sensible a ubiquitina-ligasas que determinan su posterior degradación por proteosomas. En consecuencia la inhibición de GSK3 produce un estado no fosforilado de beta-catenina que se acumularía y sería traslocada al núcleo donde interactuaría con coactivadores produciendo la expresión de genes que determinan la diferenciación y proliferación del osteoblasto.⁸

La alfa-2-macroglobulina podría estar modificando algunos de estos pasos, manteniendo el efecto sobre las células formadoras de hueso. Si bien la hipótesis de acción a este nivel requiere experimentos comprobatorios, el tratamiento con MFP produjo una masa ósea pico en ratas con la mitad de la dosis de fluoruro de sodio.⁹ Experimentos en curso indican que la suspensión del tratamiento con MFP no produce pérdida de la masa ósea

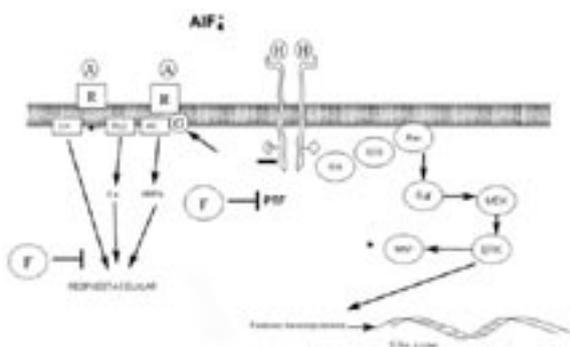


Figura 1: Mecanismo de acción del fluoruro a nivel de progenitores de células óseas. Flechas con líneas de puntos indican efecto estimulatorio y líneas de puntos con guión indican inhibición.

ganada, efecto que sí se presenta al suspender el tratamiento con NaF.

Efecto cariostático

A nivel del esmalte el fluoruro tiene un efecto de aumentar la mineralización además de efecto bacteriostático. El efecto bacteriostático se puede expresar por varios mecanismos (Figura 2). Los dentífricos, enjuagues bucales y barnices tienen entre 1.000 y 25.000 ppm de fluoruro; a estas concentraciones el fluoruro es un poderoso inhibidor de la glucólisis anaeróbica, lo que produce una disminución de las bacterias presentes en la cavidad bucal, la inhibir la principal ruta productora de energía de las bacterias. Por otro lado las bacterias, para formar ATP –la molécula que capta y transporta la energía de un proceso a otro– necesitan trasladar protones al exterior celular; estos protones al unirse al fluoruro son regresados al interior celular o son impedidos de ingresar por la enzima que sintetiza ATP, de esta manera produce otra falla en la obtención de energía. Un efecto adicional es que el fluoruro, al ser una base, es capaz de captar protones generados por el metabolismo bacteriano, evitando la excesiva acidificación del entorno del esmalte y previniendo así su erosión.

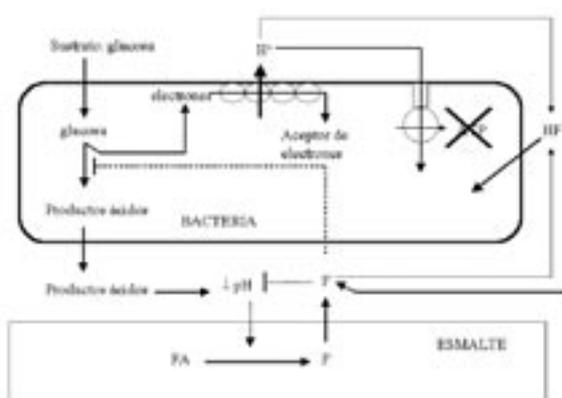


Figura 2: Mecanismo de acción del fluoruro sobre el esmalte dental. Flechas con líneas de puntos indican efecto estimulador y líneas de puntos con guión indican inhibición.

Referencias

1. Lau KMW, Farley JR, Freeman TK, Baylink DJ. A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells. Inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. *Metabolism* 1989; 38: 858-68.
2. Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity in bone forming cells. *Science* 1983; 282: 330-2.
3. Farley JR, Tarbaux N, Hall S, Baylink DJ. Mitogenic action(s) of fluoride on osteoblast line cells. Determinants of the response in vitro. *J Bone Miner Res* 1990; 5(Suppl 1): S107-13.
4. Briancón D, Meunier PJ. Treatment of osteoporosis with fluoride calcium and vitamin D. *Orthop Clin North Am* 1981; 12: 629-48.
5. Menoyo I, Rigalli A, Puche RC. Effect of fluoride on the secretion of insulin in the rat. *Arzneimittelforschung* 2005; 55: 455-60.
6. Caverzasio J, Palmer G, Bonjour JP. Fluoride: mode of action. *Bone* 1998; 22: 585-9.
7. Junling Liu, TAO Xia, Ming Zhang, et al. Screening of environmental response genes related to dental fluorosis. *Fluoride* 2006; 39: 195-201.
8. Krishnan V, Bryant HU, MacDougald A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006; 226: 1202-9.
9. 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.