

EMPLEO DE PLACAS RADIOLÓGICAS PARA ESTIMAR LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA

Existen distintos métodos radiológicos utilizados para evaluar el contenido mineral óseo: radiogrametría, fotodensitometría, absorciometría de fotones monocromáticos (single photon absorciometry), tomografía computarizada y DXA (dual X ray absorciometry).

Todas estas técnicas no invasivas están basadas en el uso de radiaciones ionizantes. ^[1]

Para cumplir con dos de los objetivos particulares de la tesina titulada “Estudio comparativo de la masa y el contenido mineral óseos en ratas ovariectomizadas tratadas con agentes osteogénicos y antirresortivos” que consisten en:

- Estudiar la modificación de la densidad mineral ósea utilizando un método radiológico en ratas ovariectomizadas con y sin tratamiento.
- Evaluar si las drogas utilizadas producen respuestas diferenciales a nivel trabecular y cortical,

Se puso a punto el método de fotodensitometría por RX la cual utiliza la atenuación producida por el mineral óseo sobre una película radiográfica estandar, que mide indirectamente el contenido mineral.

En esta técnica, cada hueso debe ser expuesto simultáneamente con un patrón de densidad mineral conocida a partir del cual se extrapolarán los valores de densidad de los huesos en estudio. Este patrón fue construido con una pieza escalonada de aluminio donde cada escalón o bloque incrementa su espesor gradualmente (ver Figura 1)

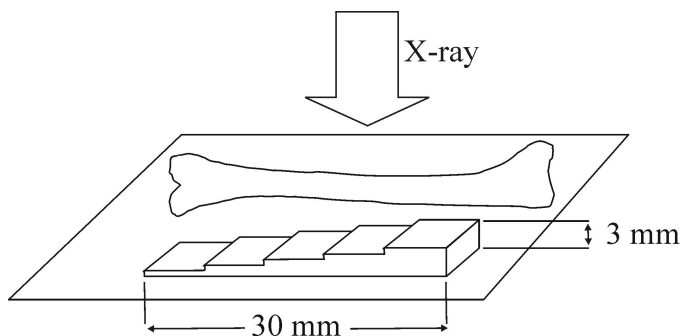


Figura 1. Hueso expuesto a rayos X junto con patrón de Al

Se construyeron tres patrones de espesor diferente. Para decidir que patrón era conveniente usar, se radiografiaron los tres patrones junto con soluciones de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ de concentraciones conocidas en un rango que abarca el contenido mineral óseo y que conservan la relación biológica de $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$. A través de medidas de DO, se eligió el patrón de espesor intermedio (espesor creciente de escalones: 0.6, 1.2, 1.8, 2.4 y 3 mm de espesor, ver figura 1), ya que el rango de DO obtenido con éste es comparable a los valores de las soluciones de Ca.

Luego se determinó que contenido de Ca representa cada bloque de dicho patrón de Al. Para ello se realizaron varias radiografías del patrón con soluciones de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ que equivalen a 10, 20, 30 y 44mgCa/cm² (figura 2).

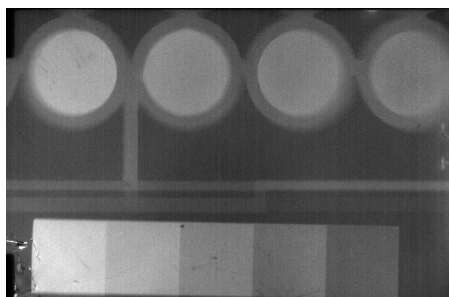


Figura 2. Radiografía del patrón junto a soluciones de fosfato de calcio.

Se realizaron las correspondientes medidas de DO y se graficó DO vs mgCa/cm², se ajustó la gráfica con una recta y con los valores de pendiente (m) y ordenada al origen (h) obtenidos se calcularon los mgCa/cm² que representan cada bloque del patrón por extrapolación a partir de su DO. Este procedimiento se repitió para varias placas con soluciones de igual concentración pero preparadas en momentos distintos y luego se calculó la media y desvío estándar (SD) para cada bloque del patrón de Al. Debido a que por razones de espacio no se pudo incluir en la placa una solución de [Ca]=0, se midió el fondo de la placa (la región más oscura) y se tomó este valor como el correspondiente a cero mgCa. Los resultados obtenidos se observan en la siguiente tabla:

	bloque1	bloque2	bloque3	bloque4	bloque5
N	5	5	5	5	5
Media	7.946	18.72	28.67	40.73	51.93
SD	4.943	4.753	4.213	4.844	6.562
Std. Error	2.21	2.126	1.884	2.166	2.934

Tabla 1. Valores promedio de g Ca/cm² de cada bloque del patrón

Como observamos en la tabla, el contenido de Ca representado por los bloques del patrón se obtuvo con un error que oscila entre el 2 y 3%.

El hecho de que el Al sea un material estable, poco reactivo y de PM semejante al Ca hace posible trabajar con dicho patrón de Al en vez de las soluciones de Ca₃(PO₄)₂ permitiendo evitar las fluctuaciones debidas a la preparación de la solución cada vez que se realizan las radiografías.

Este patrón debe utilizarse en cada film junto con el hueso a estudiar de modo de estandarizar las diferencias que puedan ocurrir debidas a la exposición y procesamiento de la placa.

Una vez obtenido los valores promedios de mgCa/cm² entre las distintas placas para los 5 bloques del patrón de Al se realizó la medición en el hueso de interés.

Se realizaron radiografías de la tibia izquierda de ratas que recibieron los tratamientos indicados en la tabla 2, con un aparato de rayos X. Se utilizaron placas Kodak ultra speed. El hueso a radiografiar se colocó de manera de maximizar la superficie de contacto entre el hueso y la placa radiológica, y se estandarizaron la distancia desde el aparato al film (10 cm) y el tiempo de exposición (1.2 seg) con el fin de mejorar la nitidez, contraste y resolución de la placa.

TRATAMIENTO	DOSIS/VÍA DE ADMINISTRACIÓN	SHAM	OVARIECTOMÍA BILATERAL			
			Control	MFP	Z	Z + MFP
Solución fisiológica	Inyección subcutánea/semana	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Agua	Sonda orogástrica/día	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
MFP	40umoles/100g/día Sonda orogástrica			<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Zoledronato	1.5 ug/kg/semana Inyección subcutánea				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Tabla 2. Grupos experimentales y tratamientos

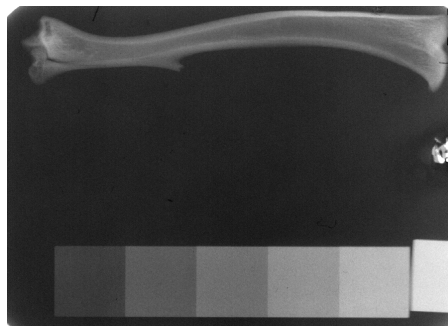


Figura 3. Radiografía de la tibia izquierda de ratona junto al patrón de Al

Luego se procedió a la digitalización de la imagen de cada radiografía y a la medición de la DO en una región fija determinada. La evaluación del contenido mineral óseo de la zona cortical se realizó al 50% del largo total del hueso y para la zona trabecular, al 80% del largo desde el extremo distal de la tibia (a nivel de la metáfisis proximal). A continuación se calculó el contenido Ca cortical y trabecular, obteniéndose los siguientes resultados:

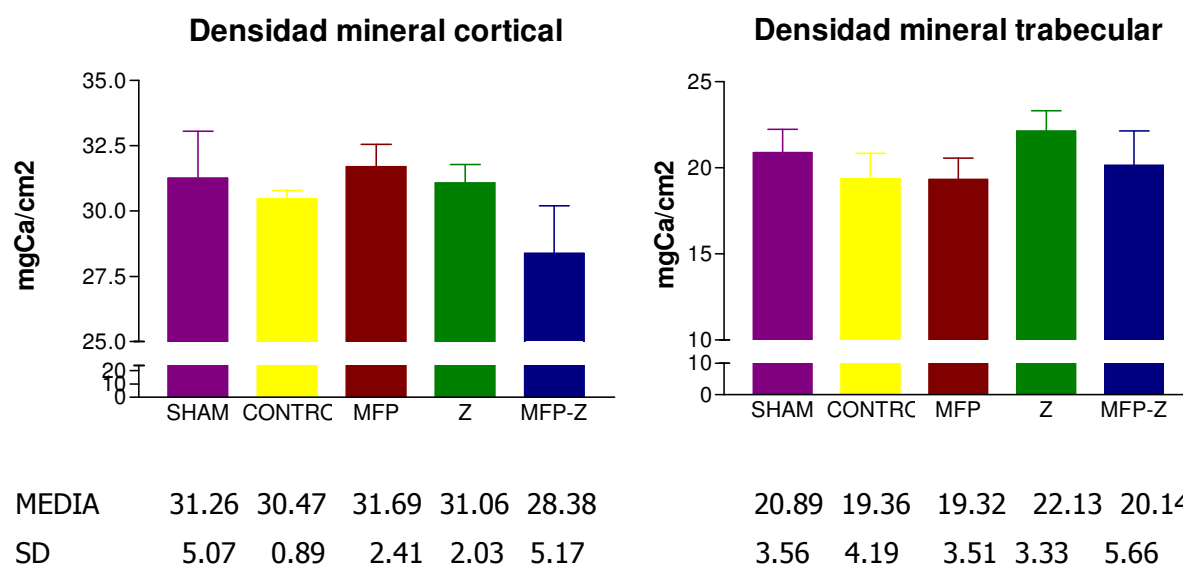


Figura 4. Comparación de la densidad mineral trabecular y cortical entre los distintos grupos. Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos al realizar una tabla de comparación ANOVA es posible que las diferencias puedan tener un significado biológico relevante. Por lo tanto es necesario realizar un análisis minucioso de los resultados.

Coefficientes de variación intra- e interensayo de la técnica

Se calcularon los coeficientes de variación (CV) inter e intraensayo realizando medidas consecutivas sobre la misma placa. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Variación Intraensayo				
	DO Trabecular	mgCa/cm² Trabecular	DO Cortical	mgCa/cm² Cortical
CV	0.0100	0.0381	0.0267	0.0599

E%	1.0016	3.8144	2.6670	5.9879
Variación Interensayo				
CV	0.0090	0.0574	0.0201	0.0932
E%	0.9009	5.7366	2.0106	9.3246

Tabla 3. Coeficientes de variación intra e interensayo

Debido a que el revelado de las placas se realiza de modo manual, se obtiene una notable variación en la intensidad y contraste entre las distintas radiografías. Por ello para evaluar el efecto que esto puede tener sobre la determinación de la densidad mineral se realizaron 10 placas de un mismo hueso y se calculo el coeficiente de variación entre estas 10 placas (tabla 4).

	DO Trabecular	mgCa/cm2 Trabecular	DO Cortical	mgCa/cm2 Cortical
X	0.3038904	19.7890062	0.2810877	24.0576802
SD	0.08758502	3.84822453	0.07875538	2.50361135
CV	0.28821251	0.19446275	0.2801808	0.10406703
E%	28.8212514	19.4462748	28.0180798	10.4067031

Tabla 4. Coeficientes de variación debidos al efecto del revelado

Dado que se observó un error de hasta casi el 30% y con el fin de disminuirlo se realizó la distribución de frecuencias de las pendientes de las regresiones lineales realizados sobre el patrón de Al de todas las radiografías realizadas.

En función de los resultados obtenidos (figura 5) decidimos trabajar solo con las placas que producían pendientes entre $-0,0069$ y $-0,0050$

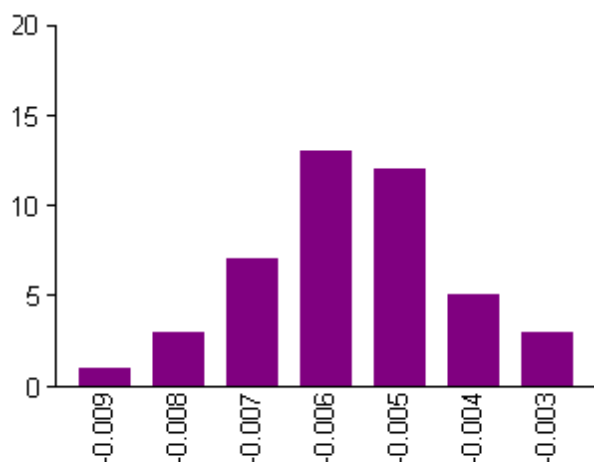


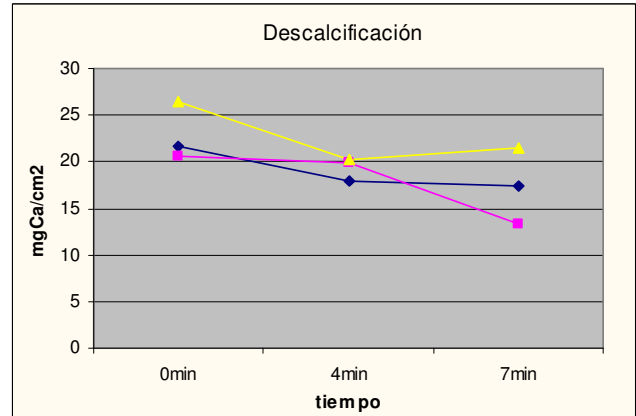
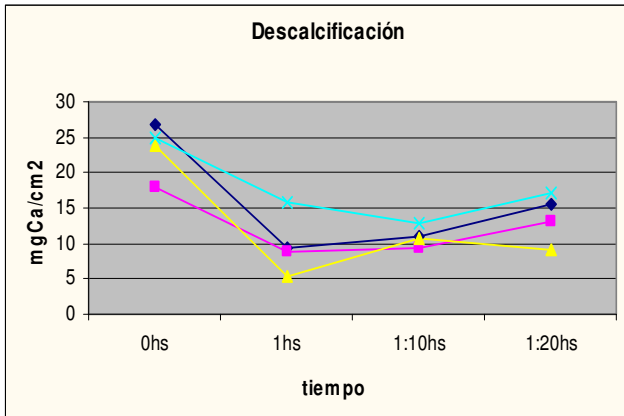
Figura 5. Distribución de frecuencias de las pendientes de las regresiones.

Al calcular nuevamente el coeficiente de variación debido al revelado, observamos una notable disminución del error alcanzándose en los mejores casos un 8 %

Por otro lado, para evaluar la sensibilidad del método realizamos la descalcificación de huesos con HNO₃ durante distintos períodos de tiempo y medimos la

	DO Trabecular	mgCa/cm2 Trabecular	DO Cortical	mgCa/cm2 Cortical
X	0.3734	20.5897	0.3506	24.2565
SD	0.0452	2.0125	0.0344	2.0607
CV	0.1211	0.0977	0.0983	0.0850
E%	12.1146	9.7744	9.8252	8.4953

densidad mineral antes y después de cada paso de descalcificación.



En función de estos resultados podemos concluir que el método es sensible a pequeñas pérdidas de Ca cuando se parte de valores de Ca que corresponden a los valores de contenido mineral óseo observados en animales normales, no así cuando el contenido de Ca se ha reducido notablemente (como muestra el grafico de la izquierda). Nos resta realizar la determinación de los mgCa que se han perdido en los distintos tiempos de descalcificación. Determinación que se hará por el método de absorción atómica sobre alícuotas tomadas de la solución de HNO₃ usada para descalcificar luego de cada período de descalcificación.