



## **Estimación de parámetros farmacocinéticos del fluoruro en la rata a través de valores de fluoruria.**

El fluoruro es un elemento de importancia en la formación del tejido óseo y la salud dental, sin embargo su exceso puede conducir a un cuadro conocido como fluorosis, caracterizado por hueso defectuoso y moteado dental. En casos extremos se asocia a alteraciones graves del funcionamiento del sistema endócrino y la actividad metabólica de las células. El fluoruro ha sido utilizado por su efecto estimulador de la diferenciación y proliferación de osteoblastos, y como un potente agente osteoformador. Se ha empleado ampliamente en el tratamiento de osteoporosis bajo la forma de fluoruro de sodio (NaF) o monofluorofosfato de sodio (MFP). El fluoruro ha sido utilizado como trazador del tejido óseo, siendo de utilidad para medir el proceso de remodelación ósea (RMO). En el Laboratorio se ha desarrollado un modelo matemático para este fin, siendo los resultados obtenidos congruentes con los modelos quirúrgicos utilizados para su validación. Además, las medidas de resorción han coincidido con la medida de deoxipiridinolina, un marcador bioquímico del proceso.

A pesar de lo prometedor de la técnica desarrollada, se han hallado valores de RMO que discrepan de los esperados en algunos animales. Se sospecha que algunos de los parámetros utilizados para el cálculo de la RMO podrían estar sub o sobre estimados a partir de datos plasmáticos. Asimismo, la disponibilidad de muestra de este origen siempre es un problema a nivel de investigación básica.

Se ha planteado la posibilidad de obtener mediciones de los parámetros farmacocinéticos exclusivamente por medidas urinarias. Las ventajas de esta metodología radican en la mayor disponibilidad de muestras tanto en cantidad como en número y, en una mejor precisión de la técnica de medición de flúor, derivada de una mayor concentración del anión y menor cantidad de proteínas, que es una importante interferencia. Además la técnica consta de un número considerablemente menor de pasos que reduce los errores del operador.

**OBJETIVO:** Obtener parámetros farmacocinéticos del fluoruro en la rata a través de mediciones de excreción urinaria de flúor.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizarán ratas Sprague Dawley, machos y hembras de edades comprendidas entre 7 y 21 semanas, las que serán provistas por el bioterio central.

Este trabajo se realizará bajo las normas internacionales aceptadas para el cuidado y tratamiento de animales.

Los experimentos se realizarán bajo anestesia general, y se administrará una dosis de 1  $\mu\text{mol F}/100$  g de peso corporal por vía intravenosa. Se recolectará orina por sondaje vesical y se obtendrán muestras de sangre a partir de la vena de la cola durante 240 minutos. En las muestras de sangre se determinará la concentración de flúor por destilación isotérmica, y en orina por potenciometría directa.

Los valores de flúor en orina y en plasma serán ajustados por las ecuaciones derivadas del modelo matemático para el fluoruro de sodio en la rata mencionado anteriormente. Las constantes obtenidas a partir de datos urinarios se compararán con las obtenidas a partir de datos plasmáticos. Las comparaciones se realizarán con la prueba de Mann Whitney.

Al finalizar el experimento y en los casos que sea necesario se realizará eutanasia.

Detalle de los procesos anteriormente citados:

**Anestesia general:** Se realizará preanestesia por inyección subcutánea (SC) de una mezcla de 1,2 mg Xilazina (XZ)/100 g peso corporal y 3 mg ketamina(K)/100 g de peso corporal. Luego de alcanzado un grado adecuado de narcosis y sedación se inyectarán por vía intramuscular (IM) clorhidrato de lidocaína y 5 minutos después en el mismo sitio se inyectarán 3 mg K /100 de peso corporal.

**Cateterismo vesical:** Una vez que la rata se encuentre bajo los efectos del anestésico. Previo a la realización del cateterismo de infiltrará la zona periuretral con 0.3 ml de lidocaína al 1 %, de forma subcutánea. El mismo se hará utilizando un catéter de teflón de 24 G x  $\frac{3}{4}$ " con punta roma.



Inyección endovenosa de flúor: Se realizará en la vena de la cola. Cuando la rata se encuentre bajo inducción anestésica se procederá a limpiar la zona, a inyectar, con alcohol etílico. Y se inyectará la cantidad de NaF adecuada. Finalmente, se coloca un apósito para proteger el área y evitar la pérdida de sangre.

Muestras de orina: Una vez introducido el catéter en vejiga, se recolecta la orina cada 15 minutos en tubos Eppendorf previamente pesados, durante un tiempo determinado. Luego de recolectada la muestra, por diferencia de peso, se obtiene el volumen de la misma.

Extracción de sangre: Las muestras se obtendrán a partir de un corte en la vena de la cola. El mismo se efectuará con una hoja de bisturí N° 15 paralelo al trayecto de la vena en la porción distal de la cola. Las muestras serán recolectadas en capilares heparinizados a tiempos determinados. Posteriormente se colocará un apósito en la zona de corte. Finalmente, las muestras de sangre se centrifugarán y se obtendrá el plasma a partir del corte del capilar a la altura del buffy-coat.

Eutanasia: Se realizará sometiendo en primer término al animal a anestesia inhalatoria con éter sulfúrico, hasta obtener una profunda anestesia y analgesia. Luego se realizará una inyección intracardiaca de KCl saturado que produce un paro cardiorespiratorio instantáneo.

Medición de fluoruro por potenciometría directa: La medición de la concentración de fluoruro en orina se realizará por potenciometría directa utilizando un electrodo de ión específico ORION 94-09 y un electrodo de referencia de Ag/AgCl conectados a un conversor analógico digital. La determinación se basa en la relación lineal existente entre los mV desarrollados por los electrodos y el logaritmo de la concentración de flúor en las muestras o patrones utilizados. Simultáneamente con las muestras se procesan soluciones patrones de NaF de  $10^{-3}$  M-  $10^{-6}$  M. A las muestras y las soluciones patrón se les adiciona un 10 % de buffer ácido acético/acetato de sodio 2 M para ajustar pH a 5-5.5 y homogeneizar la fuerza iónica de las soluciones. La técnica requiere muestras de orina de 50  $\mu$ l o superiores.

Medición de flúor por destilación isotérmica: La medición de la concentración de flúor plasmático se realizará por potenciometría directa utilizando un electrodo de ión específico ORION 94-09 y un electrodo de referencia de Ag/AgCl conectados a un conversor analógico digital. La determinación se basa en la relación lineal existente entre los mV desarrollados por los electrodos y el logaritmo de la concentración de flúor en las muestras o patrones utilizados. Previo a la determinación potenciométrica el flúor será aislado de las muestras por micro difusión isotérmica, tratando la muestra con ácido sulfúrico 3 M durante 7 días a 60 ° C y recuperando el ácido fluorhídrico desprendido de la muestra sobre NaOH sólido depositado en la tapa de la cámara de destilación. Luego de la destilación isotérmica, la trampa de NaOH se ajusta a pH 5-5.5 con 60 l de ácido acético glacial diluido 1/120. Este procedimiento requiere muestras de plasma o suero de 20-100  $\mu$ l y simultáneamente con las muestras se procesan testigos de NaF de concentraciones  $10^{-3}$  M-  $10^{-6}$  M.

Análisis de los datos: Se medirá la excreción urinaria acumulada de fluoruro a lo largo de 24 horas. Los

valores de fluoruria se ajustarán con la siguiente función 
$$[U] = \frac{k_u \cdot D_o}{V_d \cdot k_e} \cdot (1 - e^{-k_e \cdot t})$$

Donde,  $k_u$ ,  $k_e$  y  $V_d$  son los parámetros a estudiar. Esto se llevará a cabo, utilizando un programa de ajuste de funciones no lineales.

En los mismos animales se estimarán los parámetros  $k_e$ ,  $V_d$  y  $k_u$  a través de datos de fluoremia, utilizando la siguiente función

$$[F] = \frac{D_o}{V_d} e^{-k_e \cdot t}$$

Los valores obtenidos de los parámetros se correlacionarán y se determinará si en ambos casos están estimando los mismos procesos.