

Perfusión de tibia de perro aislada para el estudio del metabolismo mineral

M. Babé, P. Esbrit, M. L. Traba*, C. Castilla** y A. Rapado

Lab. Unidad Metabólica.
Fundación Jiménez Díaz
Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid (España)

(Recibido el 25 de febrero de 1986)

M. BABE, P. ESBRIT, M. L. TRABA, C. CASTILLA and A. RAPADO. *Isolated Perfused Dog Tibia for the Study of Mineral Metabolism*. Rev. esp. Fisiol., 43 (1), 113-118, 1987.

A method for perfusion of isolated canine tibia is described. With this procedure the influence of different albumins on the uptake of tritiated 25-hydroxyvitamin D₃ (³H-25(OH)D₃) by the tibia has been studied. Bovine serum albumin at 1% concentration seems to be optimum for this system. This experimental approach seems to be useful for the study of mineral metabolism.

Key words: Perfusion, Bone, 25(OH)D₃, Albumin.

La perfusión de órganos aislados es una técnica de gran utilidad ya que permite estudiar la integración de diversos procesos metabólicos en un tejido intacto. Las ventajas que presenta este modelo experimental estriban en que se mantiene el órgano en condiciones fisiológicas similares a las que existen *in vivo*, evitando posibles daños ocasionados cuando se trabaja con células aisladas o cortes de tejido *in vitro*. Los sistemas de perfusión también presentan ventajas frente a las técnicas *in vivo*, ya que permiten aislar el órgano de las interacciones producidas por el metabolismo del animal intacto (12).

Aunque hasta ahora, el estudio bioquímico del hueso se ha realizado fundamentalmente en cultivos de tejido óseo (calvaria), o en poblaciones de células aisladas, existen algunos trabajos realizados con perfusión de hueso. Así, MAC INTYRE *et al.* (6), utilizaron una técnica de autoperfusión de tibia de gato que posteriormente fue modificada para permitir la perfusión con un medio semisintético (11). Con esta técnica obtuvieron una disminución de calcio en el efluente sanguíneo del hueso, en respuesta a la calcitonina añadida al medio de perfusión.

El método de perfusión de hueso utilizado por PARSONS y ROBINSON (11) en gato evitaba la perfusión vascular al bombear directamente el medio de perfusión dentro del hueso trabecular. También se ha utilizado la perfusión de cuartos traseros de rata a través de la aorta (3), aunque

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

** Departamento experimentación animal. Fundación Jiménez Díaz. Madrid 28040.

este sistema tiene el inconveniente de la heterogeneidad del tejido perfundido, hueso y músculo esquelético. Otros autores han utilizado la perfusión *in vivo* de pata de perro adulto para estudiar la acción ósea de la hormona paratiroidea y de los metabolitos de la vitamina D (8-10).

En el presente trabajo se describe una modificación de la técnica de perfusión de tibia de perro aislada (8), con la que se estudia la captación de la 25-hidroxivitamina D tritiada (^3H -25(OH) D_3) por la tibia. Debido a la importancia que tiene el que la 25(OH) D_3 se encuentre en su forma libre (no ligada a proteínas), ya que ésta es la forma metabólicamente activa y, por otra parte, a la necesidad de utilizar una macromolécula como agente oncótico en el medio de perfusión, se estudió la influencia de diferentes tipos de albúmina en el medio de perfusión sobre la captación por la tibia de este metabolito marcado con tritio.

Material y Métodos

Reactivos. — Albúmina sérica humana (Behringwerke, AG), albúmina sérica bovina (fracción V, Sigma), albúmina sérica bovina (fracción V, Pentex, Miles). El 25-hidroxi (26(27)-metil- ^3H) colecalciferol (20 Ci/mmol) y el calcio-47 ($> 200 \mu\text{Ci}/\text{mg}$) fueron obtenidos de Radiochemical Center (Amersham, U. K.). La inmunoglobulina E (IgE) humana de mieloma, marcada con I^{125} (8-12 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) fue donada por el Departamento de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz.

Sistema de perfusión. — Consta de cámara de metacrilato termostatizada, bomba de perfusión, bala de carbógeno y conexiones de plástico (figura 1).

La cámara de perfusión, basada en la de MARTIN *et al.* (8), fue diseñada en nuestro laboratorio y construida por M. Belguier (Madrid). Tiene unas dimensio-

nes de $90 \times 40 \times 35$ cm. El control de la temperatura se efectúa mediante circulación de aire caliente impulsado desde el termostato mediante un ventilador. Ambos se regulan mediante un elemento electrónico de control de temperatura situado en la parte superior externa de la cámara. Su interior está dividido en dos partes por una rejilla metálica. La superior contiene: a) una caja de metacrilato con una tapa abatible en cuyo interior van dos soportes inclinados, también de metacrilato, sobre los que se sitúan los dos huesos a perfundir. Estos soportes permiten recoger el perfundido procedente del hueso en el reservorio venoso, situado en el exterior de la cámara, y b) un termómetro adosado a la puerta superior. En la parte inferior de la cámara se encuentra el vaso que contiene el medio de perfusión (reservorio arterial) sobre un agitador magnético. Este vaso tiene una tapa de plástico con orificios por los que se introducen tubos de goma para la entrada o salida del medio de perfusión y para la entrada del carbógeno.

El gas introducido en el medio de perfusión (95% O_2 /5% CO_2) tiene la misión de oxigenar el tejido a perfundir y la de mantener el pH adecuado del medio.

La bomba peristáltica utilizada (Microperpex-2132, LKB, Suecia) permite un flujo variable desde 0,5 a 500 ml/h y tiene la ventaja de ser de doble canal, permitiendo así realizar la perfusión de dos huesos simultáneamente.

El catéter del sistema arterial, de silicona, tiene el diámetro interno de 3 mm y el externo de 5 mm. Va colocado directamente en la tapa del vaso de perfusión (reservorio arterial), pasa a través de la bomba y antes de su conexión con la arteria ósea, se une mediante una válvula de tres pasos a otros dos catéteres, uno que entra directamente a la arteria nutricia del hueso y otro que permite recoger muestras del medio de perfusión antes de su llegada al hueso (efluente arterial). Cuando la válvula se encuentra abierta

permitiendo el paso por los dos catéteres es necesario aumentar la velocidad de la bomba con el fin de mantener constante el flujo que llega al hueso mientras se recogen muestras del efluente arterial.

El catéter de salida de la cámara de perfusión (sistema venoso) es una sonda vesical de plástico de 40 cm de largo que va unida directamente al soporte que mantiene el hueso por el que fluye el perfundido venoso óseo y que permite recoger a su salida muestras venosas para su posterior análisis.

Medio de perfusión. — Consiste en un tampón de Krebs-Henseleit bicarbonato con glucosa 5,6 mM y albúmina bovina 1%. Las concentraciones iónicas finales del medio son (mM): Na^+ : 143,5; K^+ : 5,9; Mg^{2+} : 1,2; Ca^{2+} : 2,5; Cl^- : 125,8; H_2PO_4^- : 1,2; HCO_3^- : 25.

Preparación del animal y obtención de la tibia. — Se han utilizado perros de 15-30 kg de peso, desparasitados interna y externamente y sometidos a una dieta estándar durante 10 días antes de la intervención. El día anterior a la realización del estudio, con objeto de determinar las concentraciones séricas de calcio, magnesio, fósforo y 25(OH)D, bajo anestesia, se les extrajeron 20 ml de sangre. El día del experimento, se colocó al perro en posición decúbito-dorsal sobre la mesa de operaciones y se le anestesió con tiopental sódico (pentotal, 25 mg/kg) por vía i.v., se le heparinizó con 100 U/Kg peso y se le mantuvo con respiración asistida durante toda la intervención, mediante intubación endotraqueal.

En primer lugar, con objeto de controlar la hemorragia que posteriormente se pudiera producir, se ligó el paquete vascular-femoral. A continuación, se separó la tibia por sus articulaciones proximales y distales quedando así libre el conjunto de tibia y peroné, rodeados de músculos, que se diseccionaron lo más rápidamente posible. Posteriormente, se

quitó el peroné con mucho cuidado para localizar la arteria nutricia, que se limpió bien de tejido conectivo, y se procedió a su cateterización. Se perfundió con 5 ml de suero fisiológico, con el fin de comprobar la perfecta canulación y eliminar la mayor cantidad de sangre existente, para evitar la formación de coágulos que pudieran taponar el sistema.

Técnica de perfusión. — Realizada la canulación de la arteria nutricia se colocó la tibia en la cámara y se perfundió, durante 30 min, a un flujo constante de 2 ml/min con el medio de perfusión gaseado continuamente con carbógeno. Este período de tiempo tenía como fin conseguir el equilibrio del sistema.

El efluente que entra en el hueso (efluente arterial) sale a través de toda la superficie ósea y se recoge a la salida (efluente venoso) para ser analizado. Tras el período de equilibrio de 30 min se añadió la sustancia a estudiar y se recogieron muestras simultáneas arteriales y venosas, cada cinco minutos, para su análisis. La captación por el hueso de la sustancia a estudiar se expresó como porcentaje del gradiente arterio-venoso, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ captación} = \frac{A - V}{A} \times 100$$

donde A y V son concentración en muestra arterial y venosa respectivamente.

Captación inespecífica. — Con objeto de estudiar la especificidad de la captación de una sustancia perfundida a través del hueso se realizaron experimentos controles, en los que se hizo circular el medio de perfusión con dicha sustancia por todo el sistema, en ausencia del órgano.

Determinaciones analíticas. — Los niveles séricos de calcio y magnesio totales se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica. El fósforo sérico se

determinó por el método de FISKE y SUBARROW (4). La 25(OH)D se analizó por un método que comprende una extracción 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 (14).

Resultados

Los niveles séricos de calcio, magnesio, fósforo y 25(OH)D de todos los perros utilizados en este estudio se encontraban dentro de la normalidad.

El control de la técnica de perfusión se realizó mediante varios criterios: 1) Se determinaron el pO_2 , pCO_2 y pH del medio con objeto de analizar si el medio de perfusión estaba bien oxigenado, hecho que se confirmó con los resultados obtenidos: $pO_2 = 419,8$ mm Hg; $pCO_2 = 26,82$ mm Hg y $pH = 7,41$.

2) Se perfundió una disolución de azul de bromofenol con el fin de visualizar si la cateterización de la arteria nutricia era correcta y se observó que la disolución del colorante salía por toda la superficie tiñendo el hueso de modo homogéneo.

3) Se estudió la captación por la tibia de

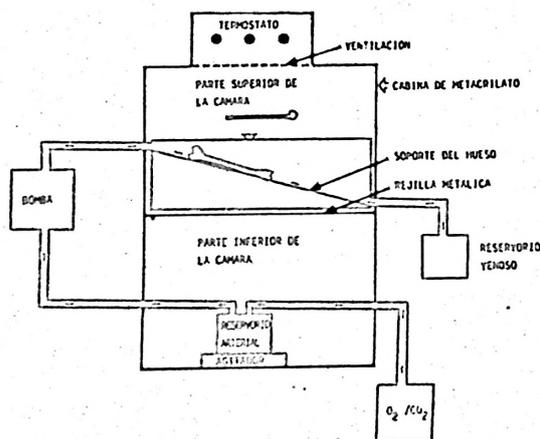


Fig. 1. Diagrama del sistema de perfusión de hueso.

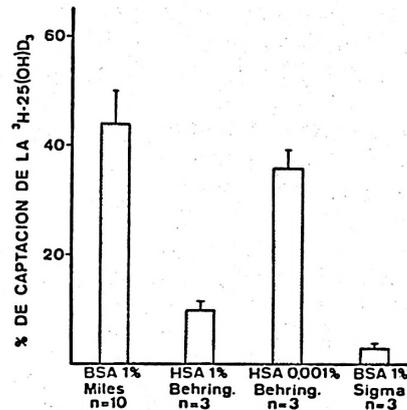


Fig. 2. Porcentaje de unión (específica e inespecífica) de la $^3H-25(OH)D_3$ al hueso y al sistema con diferentes albúminas: BSA (Miles) 1%, HSA (Behringwerke) 1% y 0,001% y BSA (Sigma) 1%. «n» significa el número de experiencias realizadas.

sustancias radioquímicas marcadas, de diferente afinidad por el hueso. Se inyectaron dentro de la línea arterial alrededor de 2.000 dpm de IgE humana de mieloma marcada con I^{125} . En los cinco primeros minutos toda la radiactividad inyectada se recogió en el efluente venoso, lo que indica que la tibia no capta IgE humana. Se inyectaron 60.000 dpm de Ca^{47} ; a los cinco minutos, el hueso había captado un 36% de la radiactividad inyectada, eluyendo un 64% de la misma.

Para conocer el grado de afinidad de la albúmina empleada en el medio de perfusión por la 25(OH)D₃, se realizó una titulación de tres diferentes tipos de albúmina frente a la $^3H-25(OH)D_3$, resultando que sólo con la BSA de Miles se obtenía un pequeño porcentaje de unión a la $^3H-25(OH)D_3$, mientras que con la de Sigma la unión era muy elevada a todas las concentraciones estudiadas y con la HSA de Behringwerke, sólo a la concentración de 0,001% se obtuvo un porcentaje pequeño (tabla I).

Teniendo en cuenta estos resultados se realizaron diferentes experimentos de captación de la $^3H-25(OH)D_3$, añadiendo

Tabla I. Grado de afinidad de la albúmina empleada en el medio de perfusión por la 25-hidroxitivitamina D₃.

Albúmina %	Porcentaje de unión a la ³ H-25(OH)D ₃		
	BSA (Miles)	BSA (Sigma)	HSA (Behringwerke)
1,0	11,0	90,0	86,0
0,500	8,8	89,0	82,0
0,250	5,4	86,0	80,1
0,125	3,1	83,0	79,5
0,001	—	—	10,3

10 μ Ci del metabolito tritiado (2 nM, concentración final) disueltos en 100 μ l de etanol sobre el medio de perfusión preparado con cada una de las albúminas estudiadas a diferentes concentraciones.

La figura 2 muestra la captación, por la tibia, de la ³H-25(OH)D₃ añadida al medio de perfusión con cada una de las diferentes albúminas. La mayor captación del metabolito (43,8 \pm 5,9) se obtuvo con la BSA de Miles al 1% en el medio de perfusión, siendo ligeramente inferior la obtenida con la HSA al 0,001% (35,7 \pm 3,2). Sin embargo, la captación inespecífica (en ausencia de tibias) fue de 28% para la HSA al 0,001% mientras que para la BSA de Miles al 1% fue sólo del 2%. Con la HSA al 1% y la BSA al 1% se obtuvieron captaciones mínimas, de 9,8 \pm 1,5% y 3 \pm 0,9% (n=3) respectivamente. Estos hallazgos, están de acuerdo con la proporción de metabolito libre presente en el medio de perfusión (tabla I).

Discusión

Los valores de pO₂, pCO₂ y pH aquí presentados coinciden con los descritos por otros autores (5, 13) en distintos sistemas. La tibia de perro perfundida aislada no mostró afinidad por sustancias no selectivas del hueso, como la IgE humana. Sin embargo, se obtuvo captación de Ca⁴⁷ probablemente por intercambio

químico con el componente mineral del hueso, indicando que el órgano había sido perfundido y mantenía además su funcionalidad biológica.

Los resultados muestran que la BSA de Miles al 1% resulta ser óptima en estudios de captación de la ³H-25(OH)D₃ por la tibia de perro. El hecho de haber elegido ésta frente a la HSA al 0,001% se debe a que aunque con esta última se producía una captación similar, existía el inconveniente de que no todo el metabolito libre presente en el medio de perfusión alcanzaba el hueso, ya que parte del mismo (28%) se adhería a las paredes del material utilizado (captación inespecífica).

En este estudio, se confirma el hecho ya conocido de que los metabolitos de la vitamina D necesitan estar en forma libre (no ligados a proteínas) para ser captados por el hueso (7). Esto fue observado en estudios *in vitro* sobre cultivo de células de sarcoma óseo en donde se evidenciaba que la captación intracelular de metabolitos de vitamina D se reducía proporcionalmente por la adición de proteína ligadora de la vitamina D (DBP) al medio de cultivo. También se ha demostrado que tanto la captación como el metabolismo de la 25(OH)D₃ en riñón (1, 2) y hueso (10) podrían ser inhibidos por la adición de DBP.

Todos estos resultados enfatizan la importancia de conocer exactamente qué tipo de medio se utiliza en experimentos sobre el efecto de los metabolitos de la vitamina D. OLGAARD *et al.* (10) observaron que varias preparaciones de albúmina (excepto la fracción V, Pentex Miles) estaban contaminadas con DBP. De ahí los diferentes resultados obtenidos en la literatura sobre el efecto de los metabolitos de la vitamina D.

En conclusión, el sistema de perfusión de tibia de perro aislada, utilizando en el medio de perfusión BSA de Miles al 1%, resulta ser un modelo adecuado y útil para estudiar el metabolismo de la vitamina D.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda n.º 1850/82 de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

Resumen

Se describe una técnica de perfusión de tibia de perro aislada con la que se estudia la influencia de diferentes tipos de albúmina en el medio de perfusión sobre la captación, por la tibia, de la $25(\text{OH})\text{D}_3$ tritiada (^3H - $25(\text{OH})\text{D}_3$). Los resultados muestran que, de las albúminas estudiadas (BSA de Miles, BSA de Sigma y HSA de Behringwerke), la BSA de Miles al 1% es la óptima para estudios de captación de este metabolito por la tibia de perro. Este modelo experimental es adecuado y útil para estudios del metabolismo mineral.

Palabras clave: Perfusión, Hueso, $25(\text{OH})\text{D}_3$, Albúmina.

Bibliografía

- Botham, K. M., Tanaka, Y. y De Luca, H. F.: *Biochemistry*, 13, 4961-4966, 1980.
- Bouillon, R. y Van Baelen, H.: *Calcif. Tissue Int.*, 33, 451-453, 1981.
- Calvo, M. S., Fryer, M. J., Laakso, K. J., Nissenson, R. A., Price, P. A., Murray, T. M. y Heath III, H.: *J. Clin. Invest.*, 76, 2349-2354, 1985.
- Fiske, C. H. y Subarrow, Y.: *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400, 1925.
- Maack, T.: *Am. J. Physiol.*, 238, F71-F78, 1980.
- Mac Intyre, I., Parsons, J. A. y Robinson, C. J.: *J. Physiol. London*, 191, 393-405, 1967.
- Manolagas, S. C. y Deftos, L. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 596-602, 1980.
- Martin, K. J., Freitag, J. J., Conrades, M. B., Hruska, K. A., Klahr, S. y Slatopolsky, E.: *J. Clin. Invest.*, 62, 256-261, 1978.
- Nguyen, V. V. y Jowsey, J.: *J. Bone Jt. Surg.*, 52-A, 1041-1049, 1970.
- Olgaard, K., Schwartz, J., Finco, D., Arbe-laez, M. Haddad, J. y Avioli, L., Klahr, S. y Slatopolsky, E.: *J. Clin. Invest.*, 69, 684-690, 1982.
- Parsons, J. A. y Robinson, C. J.: *J. Physiol. London*, 194, 59-60, 1967.
- Ross, B. D.: En «*Perfusion techniques in Biochemistry*». Clarendon Press, Oxford, 1972.
- Satyanarayana, G., Jones, G., Whay Koo, S. y Fraser, D.: *J. Physiol.*, 243, E265-E271, 1982.
- Traba, M. L., Quesada, M. Marín, A., De la Piedra, C., Babé, M. y Navarro, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, 40, 69-76, 1984.