

## Acta Ortopédica Mexicana

Volumen  
Volume 17

Número  
Number 4

Julio-Agosto  
July-August 2003

*Artículo:*

Efecto osteoinductivo de leptina recombinante de rata en un modelo experimental de rata con fractura de tibia y peroné: Estudio piloto

Derechos reservados, Copyright © 2003:  
Sociedad Mexicana de Ortopedia, AC

Otras secciones de  
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

Artículo original

## Efecto osteoinductivo de leptina recombinante de rata en un modelo experimental de rata con fractura de tibia y peroné: Estudio piloto

Rebecca Elizabeth Franco-Boruland,\* Henry Juver Vergara Fernández\*\*

Centro Nacional de Rehabilitación

**RESUMEN.** Existe evidencia sólida de una relación entre la leptina y la regulación del metabolismo óseo. En este estudio exploramos en un modelo experimental creado *ad hoc* la posibilidad de un efecto de la leptina recombinante de rata (l-rr) sobre la consolidación ósea en ratas. Bajo anestesia, se fracturaron quirúrgicamente la tibia y el peroné derechos de ocho ratas Long Evans de 450-500 g de peso corporal (pc). Las fracturas tibiales fueron estabilizadas mediante un clavo de Kirschner (0.035) endomedular. Cuatro ratas recibieron localmente l-rr en la extremidad fracturada (ratas-L): 100 µg/kg pc inmediatamente después de la cirugía y 20 µg/kg pc/día los 15 días subsecuentes; las cuatro ratas control (C) sólo recibieron el vehículo. Contrario a las ratas-C, las 2 ratas-L que sobrevivieron al tratamiento con l-rr, recuperaron su deambulación normal a los 15 días de haber sido fracturadas; en el sitio de incisión su piel había cicatrizado. Todas las ratas fueron sacrificadas el día 22 después de la cirugía. Se diseccionaron los huesos fracturados y se fijaron en glutaraldehído al 2.5%. Tibias y peronés de las ratas-L habían consolidado, no así los de las ratas-C. Todas las ratas presentaron un proceso infeccioso en la extremidad fracturada, aunque las ratas-L mostraron una preservación notable de la superficie articular de la tibia.

**Palabras clave:** ratas, Long Evans, fractura de tibia, modelo experimental.

### Introducción

Originalmente la leptina fue descrita como un producto de los adipocitos que podía actuar sobre el hipotálamo para regular la ingesta de alimentos y el gasto energético.<sup>13</sup> Re-

**SUMMARY.** There is solid evidence for a relation between leptin and the regulation of bone metabolism. Here we have explored in an experimental model *ad hoc* the possibility of an effect of rat recombinant leptin (rr-l) on fracture healing in the rat. Under anesthesia, the right tibia and fibula of eight Long Evans rats of 450-500 g body weight (bw) were surgically fractured. Tibial fractures were stabilized with a centromedullary Kirschner wire (0.035). Four randomly chosen rats received rr-l locally to the fractured member (L-rats): 100 µg/kg bw immediately after surgery and 20 µg/kg bw/day for the following 15 days; four control (C) rats received only the vehicle. Contrary to the C-rats, the 2 L-rats that survived the treatment with rr-l were walking normally 15 days after being fractured; at the incision site their skin was healed. All rats were sacrificed 22 days after surgery. The fractured bones were dissected out and fixed in 2.5% glutaraldehyde. The tibiae and fibulae of the L-rats were consolidated, as opposed to those of the C-rats. All rats suffered an infectious process in the fractured member, although the L-rats showed a notably preserved articular surface of the tibia.

**Key words:** rats, Long Evans, tibial fractures, experimental model.

cientemente se ha encontrado evidencia sólida de una relación entre la leptina y el metabolismo óseo. En los osteoblastos se expresan tanto la leptina<sup>11</sup> como su receptor.<sup>9</sup> Se ha demostrado que la leptina estimula la proliferación osteoblástica<sup>6</sup> y la mineralización ósea<sup>6</sup> y que inhibe la osteoclastogénesis.<sup>6,8</sup>

Recientemente Ducy *et al.*<sup>3</sup> descubrieron que la leptina administrada en los ventrículos cerebrales de ratones obesos *ob/ob* (deficientes en leptina), inhibe la formación de hueso, sin afectar la resorción ósea. Por el contrario, Burguera *et al.*<sup>2</sup> y Blain *et al.*<sup>1</sup> observaron que la administración sistémica de leptina parece tener un efecto osteoprotector en ratas ovariectomizadas y en mujeres climatéricas, aunque Sato y colaboradores<sup>12</sup> han encontrado una relación

\* Jefa del Servicio de Bioquímica-Ortopedia, CNR.

\*\* Residente Graduado de Ortopedia, CNR.

Dirección para correspondencia:  
Dra. Rebecca Elizabeth Franco Bourland. Calz. México-Xochimilco 289,  
Col. Arenal de Guadalupe, Del. Tlalpan 14389, México, DF;  
Tel. 59 99 10 00 Ext. 19508, Fax. 55 73 35 45.

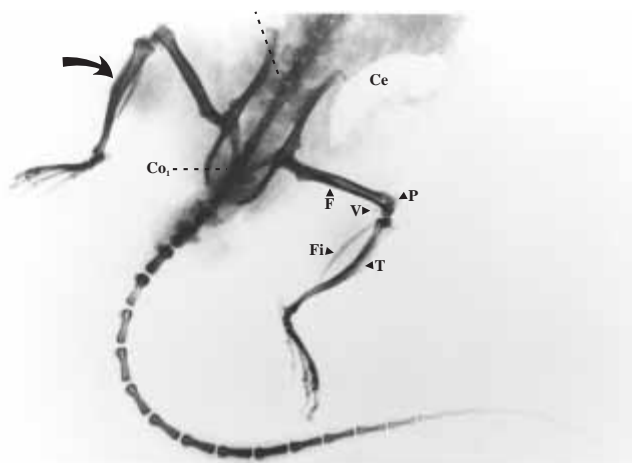
inversa entre la densidad mineral ósea y la leptina sérica en hombres adultos.

Aquí hemos explorado la posibilidad de que la leptina, en particular la leptina recombinante de rata (l-rr), pueda tener un efecto sobre la consolidación ósea de fracturas quirúrgicas de tibia y peroné en la rata.

### Material y métodos

**Animales.** Se emplearon ratas macho de la cepa Long Evans de 450-500 g de peso corporal (pc) criadas en el mismo Centro Nacional de Rehabilitación (CNR), las que fueron mantenidas en una habitación entre 20 y 22°C, con ciclos de luz-obscuridad de 12 h, en jaulas de acrílico individuales con cama de acerrín y alimentadas *ad libitum* con una dieta comercial estandarizada para ratas (Purina 5001) y agua purificada. Su manejo se realizó con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM 062 ZOO 1999 para el uso de animales de laboratorio.

**Cirugía.** Bajo anestesia profunda con ketamina (60 mg/kg pc) y xilacina (12 mg/kg pc), administradas intraperitonealmente, se realizaron quirúrgicamente fracturas expuestas y sencillas de las tibias y los peronés derechos de 8 ratas (Figura 1). El área quirúrgica fue rasurada con una máquina para rasurar (cuchilla No. 40) y desinfectada con una solución de isodine y con un abordaje antero-posterior se expusieron la tibia y el peroné; la tibia fue fracturada con una segueta fina produciendo un trazo transverso; con esta acción simultáneamente se fracturó el peroné. La fractura de la tibia fue estabilizada mediante un alambre (clavo) de Kirschner (0.035), colocado endomedular de manera retrógrada. Al final del procedimiento se suturó la piel con seda



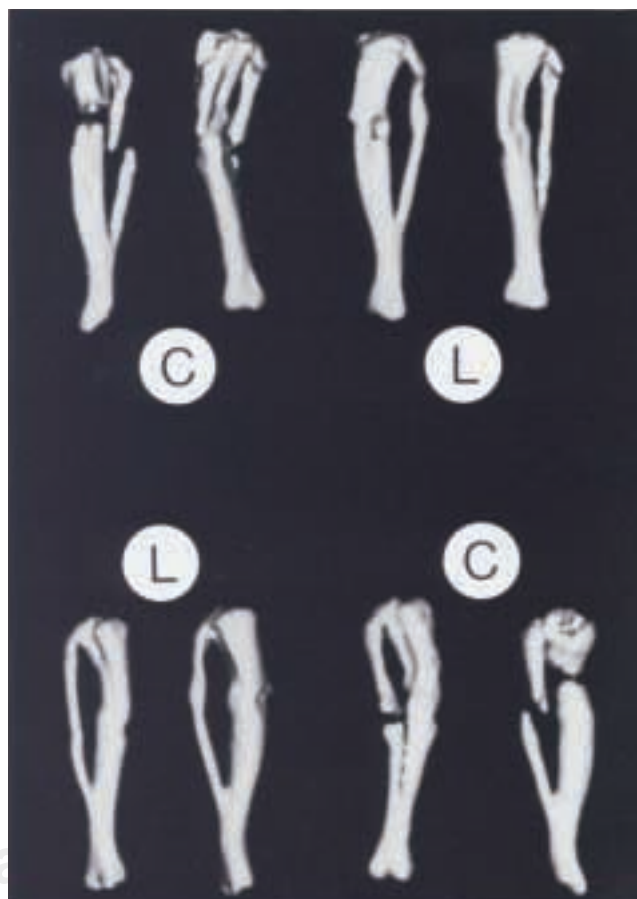
**Figura 1.** Zona de las fracturas quirúrgicas de las tibias derechas. Se indica (flecha) el sitio en la tibia derecha donde fueron fracturadas quirúrgicamente, mediante una segueta fina, todas las ratas. En este procedimiento se fracturó simultáneamente al peroné. T, tibia; Fi, fibula o peroné; V, fabela; P, platela; F, fémur; Co<sub>1</sub>, primera vértebra coccígea. Modificado de: Hebel R, Stromberg MW: Anatomy of the Laboratory Rat. Osteology. Baltimore, The Williams and Wilkins Co., 1976: 1-17.

4-0 y a cada rata operada se le administraron, vía intramuscular, 150,000 U de penicilina de acción prolongada.

**Imagenología.** Inmediatamente después de la cirugía, fueron radiografiadas las ratas para determinar el estado del trazo de fractura y la osteosíntesis, así como el día en que fueron sacrificadas, para determinar el estado de la consolidación ósea de las fracturas.

Las tibias y los peronés fracturados y disecados fueron estudiados por tomografía computada. Se les removió manualmente todo el tejido blando y fueron colocados, enfilados, en 1 kg de gel transparente, en un recipiente transparente de 11 cm de diámetro y 10 cm de altura. Este estudio se realizó en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Servicio de Tomografía Computada y Ultrasonido (cortesía del Dr. J. Alejandro Ávalos-Bracho) en un Tomógrafo Siemens, modelo Multicorte Somatom Volume.

**Tratamiento con leptina rr.** Inmediatamente después de ser fracturadas, a cuatro ratas elegidas en forma aleatoria se les administró directamente en la extremidad fracturada, 100 µg/kg pc de l-rr (R&D Systems, Inc.) en 60 µl de una solución salina amortiguada de fosfatos



**Figura 2.** Tomografía de tibias y peronés fracturados de ratas control (C) y ratas tratadas con leptina recombinante de rata (L). Se muestran dos aspectos, girados 180°, de los mismos huesos. (Imagen: Téc. Radiólogo Sr. Manuel Silva-Alvarado, Servicio de Tomografía Computada y Ultrasonido, INER).

(SSAF), pH 7.2 [ratas-L]; cuatro ratas control, sólo recibieron 60 µl del vehículo [ratas-C]. Durante los 15 días subsecuentes a la cirugía y bajo anestesia ligera con éter, las ratas-L recibieron 20 µg/kg pc/día de l-rr y las ratas-C sólo la SSAF. Todas las ratas fueron sacrificadas a los 22 días de la cirugía mediante una sobredosis de ketamina/xilacina. Se diseccionaron las tibias y los peronés fracturados y se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en una solución 0.2M de fosfatos.

### Resultados

Después de la dosis de 100 µg/kg pc de l-rr sólo sobrevivieron 2 ratas-L. A diferencia de las cuatro ratas-C que murieron. A los 15 días de tratamiento con 20 µg/kg pc/día de l-rr ratas-L que sobrevivieron y recuperaron su ambulación normal.

Todas las ratas mostraron un proceso infeccioso en la extremidad fracturada evidente en el sitio de incisión qui-

rúrgica y en la zona de lisis (sitio de salida del alambre de Kirschner). No obstante y contrario a las ratas-C, a los 15 días de tratamiento con la l-rr, la piel de las ratas-L había cicatrizado completamente.

Al parecer, la aplicación local de l-rr en las extremidades fracturadas de las ratas L aceleró la consolidación ósea de las tibias y los peronés. Como se aprecia en la tomografía de las tibias y peronés de las ratas-C y las ratas-L (Figura 2), a los 22 días posteriores a las fracturas quirúrgicas, las tibias y los peronés de las ratas-L (a las que se les aplicó localmente la l-rr), están consolidadas mientras que los huesos de las ratas-C, que sólo recibieron la SSAF, no lo están. La remoción del alambre de Kirschner se llevó a cabo en ambos grupos de ratas, encontrando que esta acción destruyó la frágil e incipiente consolidación ósea de las ratas C, y en el grupo de ratas L se mantuvo firme el callo de consolidación. Estas observaciones coinciden con la recuperación de la deambulacion de las ratas-L antes de ser sacrificadas.



Figura 3A.

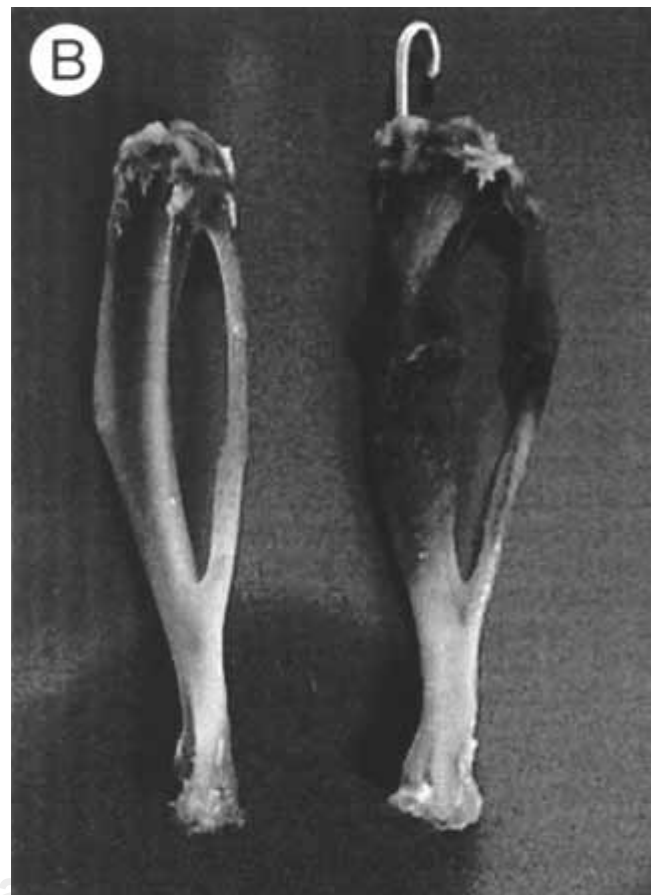


Figura 3B.

**Figura 3.** Fotografías de las tibias y peronés fracturados. En (A) se ilustra el grado de degeneración condral de la tibia fracturada de una rata control que contrasta con la superficie articular mejor preservada en la tibia fracturada de una rata tratada con leptina recombinante de rata mostrada en (B). En ambos casos se ilustran también la tibia y el peroné de la extremidad izquierrda no fracturada de la misma rata. (Fotos: Sr. Martín Laguna-Flores, Servicio de Fotografía, CNR.)

A pesar del proceso infeccioso de las extremidades fracturadas de las ratas-L, la inspección macroscópica de sus tibias fracturadas y consolidadas, reveló una preservación notable de la superficie articular de la tibia (Figura 3B), mientras que las tibias fracturadas y no consolidadas de las ratas-C mostraron una degeneración condral importante como consecuencia de la infección (Figura 3A).

### Discusión

Los resultados de este estudio preliminar sugieren que con el esquema de tratamiento descrito aquí, la aplicación local de l-rr a ratas con una fractura expuesta y sencilla de tibia y peroné aceleró la consolidación ósea. La mejor apariencia de la superficie cartilaginosa articular de la tibia que observamos en las ratas-L comparada con las ratas-C, sugiere que la l-rr además contribuyó a disminuir el proceso de degeneración condral por infección, acorde con su efecto inmunomodulador.<sup>4</sup> Además, la rapidez con la que cicatrizó la piel en el sitio de la incisión quirúrgica de las ratas-L comparada con las ratas-C, pudiera ser reflejo tanto de la acción de la l-rr para controlar la infección<sup>4</sup> como su acción cicatrizante.<sup>5</sup>

Desconocemos cuál de los múltiples factores vinculados al complejo proceso de la consolidación ósea<sup>10</sup> pudieran haber sido inducidos por la l-rr en las ratas-L para acelerar este proceso. Nos queda iniciar los estudios para conocer el efecto de la l-rr sobre la microestructura y la composición del callo óseo, así como el análisis molecular de los callos con microarreglos en colaboración de Hadjiargyrou y colaboradores,<sup>7</sup> que seguramente nos serán de gran utilidad para proponer algún mecanismo de acción de la l-rr en la consolidación ósea.

En conclusión, este estudio piloto sugiere que con el esquema de tratamiento descrito aquí, la leptina-rr acelera la consolidación ósea, disminuye el proceso de degeneración condral por infección y promueve la cicatrización de la piel en ratas con fracturas quirúrgicas expuestas.

### Bibliografía

1. Blain H, Vuillemin A, Guillemin F, Durant R, Hanesse B, De Talence N, Doucet B, Jeandel C: Serum leptin level is a predictor of bone mineral density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(3): 1030-1035.
2. Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Khosla S, Riggs BL, Turner RT: Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology* 2001; 142(8): 3546-3553.
3. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G: Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2000; 100(2): 197-207.
4. Fantuzzi G, Faggioni R: Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68(4): 437-446.
5. Frank S, Stallmeyer B, Kämpfer H, Kolb N, Pfeilschifter J: Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Clin Invest* 2000; 106(4): 501-509.
6. Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE: Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem* 2002; 85(4): 825-836.
7. Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT: Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem* 2002; 277(33): 30177-30182.
8. Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, Gough TJ, Collier GR, Nicholson GC: Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res* 2002; 17(2): 200-209.
9. Lee YJ, Park JH, Ju SK, You KH, Ko JS, Kim HM: Leptin receptor isoform expression in rat osteoblasts and their functional analysis. *FEBS Lett* 2002; 528(1-3): 43-47.
10. Ostrum RF, Chao EYS, Bassett CAL, Brighton CT, Einhorn TA, Lucas TS, Aro HT, Spector M: in *Orthopedic Basic Science* (Simon SR, Ed.), USA. *American Academy of Orthopaedic Surgeons* 1994: 298-304.
11. Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, Gordeladze JO, Drevon CA: Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res* 2001; 16(8): 1426-1433.
12. Sato M, Takeda N, Sarui H, Takami R, Takami K, Hayashi M, Sasaki A, Kawachi S, Yoshino K, Yasuda K: Association between serum leptin concentrations and bone mineral density, and biochemical markers of bone turnover in adult men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(11): 5273-5276.
13. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372(6505): 425-432.