



## ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

# COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON MONOFLUOROFOSFATO DE SODIO O FLUORURO DE SODIO SOBRE EL PROCESO DE REPARACIÓN ÓSEA EN RATAS

Sandra P Mejía Delgado,<sup>1</sup> Alfredo Rigalli<sup>2\*</sup>

1. Centro de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 2. Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

### Resumen

El fluoruro (F) administrado como monofluorofosfato de sodio (MFP) o como fluoruro de sodio (NaF) estimula la proliferación de osteoblastos y el desarrollo óseo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento con NaF y MFP sobre el proceso de reparación de un defecto óseo no crítico en ratas. Se produjo un defecto bilateral y monocortical óseo no crítico de 2 mm de diámetro en la epífisis proximal de la tibia de 18 ratas hembras adultas normales; los animales se dividieron en tres grupos que recibieron diariamente durante 30 días por sonda orogástrica: MFP (80  $\mu$ mol MFP), NaF (80  $\mu$ mol NaF) y control (agua). La fosfatasa alcalina plasmática se incrementó significativamente a lo largo del tratamiento en los grupos NaF y MFP. La DMO de la zona del defecto fue significativamente mayor en el grupo tratado con MFP a los 10 días de tratamiento. El estudio histológico de la zona del defecto indicó que, luego de 30 días de tratamiento, el hueso formado en pre-

sencia de MFP es de estructura laminillar sin la presencia de cartílago comparado con el grupo control. Conclusión: la administración de MFP favoreció la reparación reduciendo el tiempo de mineralización y aumentando la calidad del hueso neoformado.

**Palabras clave:** fluoruro, monofluorofosfato de sodio, defecto óseo no crítico, reparación ósea.

### Summary

#### **COMPARISON OF THE TREATMENTS WITH SODIUM MONOFLUOROPHOSPHATE AND SODIUM FLUORIDE ON BONE REPAIR PROCESS IN RATS**

Fluoride (F) administered as monofluorophosphate (MFP) or sodium fluoride (NaF) has proliferative stimulus on osteoblasts. The aim of this work was to evaluate the effect of the treatment with NaF and MFP on the reparation of a non-critical bone defect in rats. A bilateral

\* Dirección postal: Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas. Santa Fe 3100. C.P. 2000. Rosario. Argentina. Correo electrónico: [arigalli@conicet.gov.ar](mailto:arigalli@conicet.gov.ar)

*and unicortical non-critical bone defect was performed in the proximal epiphysis of the tibia of 18 female rats which were then separated into three groups that received daily treatment for 30 days: MPF (80  $\mu$ mol MFP), NaF (80  $\mu$ mol NaF) and Control. Alkaline phosphatase significantly increased along the treatment in NaF and MFP. Bone mineral density in the defect area was higher in MFP at day 10 of treatment. Histological examination indicated that the new bone formed in the defect area was more organized in MFP compared to control group. We conclude that the treatment with MFP accelerate the process of reparation with better quality of the formed bone.*

**Keywords:** fluoride, sodium monofluorophosphate, non-critical bone defect, bone reparation.

### Introducción

El fluoruro (F) administrado como fluoruro de sodio (NaF) o monofluorofosfato (MFP) tiene efecto estimulador de la formación de tejido óseo.<sup>1,2</sup> Pero el NaF y el MFP tienen farmacocinéticas diferentes<sup>3</sup>. El F es la especie predominante en plasma después de la administración de NaF. En cambio, luego de la administración oral de MFP, además del F, se encuentra en plasma una fracción de flúor ligado a las alfa-macroglobulinas,<sup>4-6</sup> que sería la causa de su doble biodisponibilidad respecto del NaF.

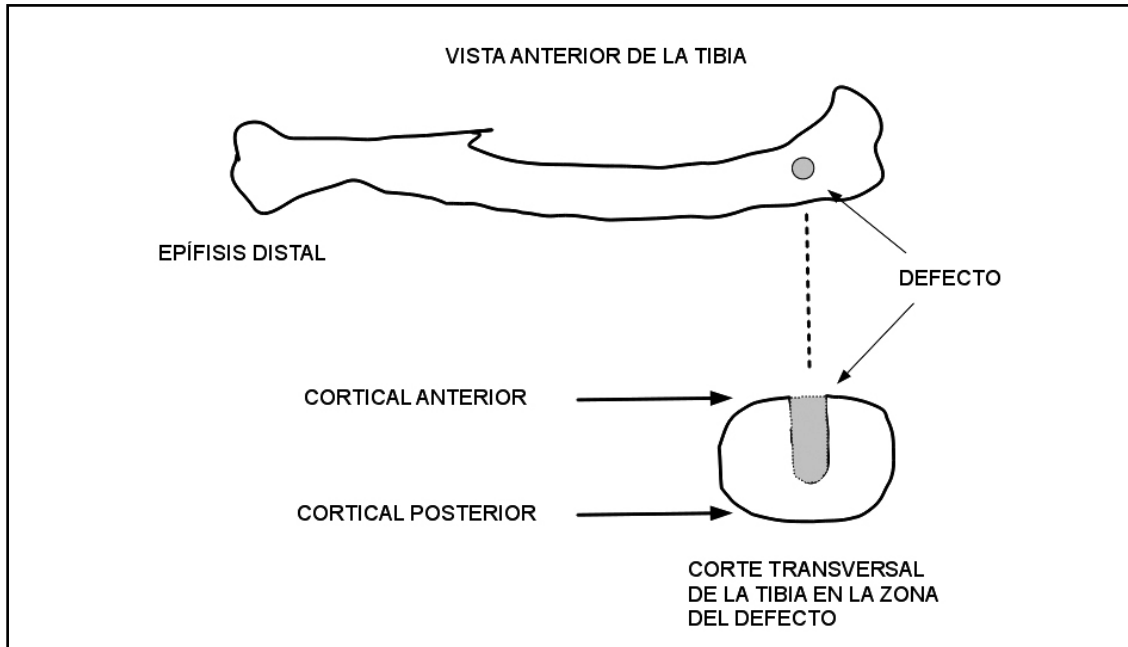
Los defectos óseos producidos por traumatismo o cirugía pueden ser de tipo crítico o no crítico. Los defectos no críticos se reparan sin necesidad de utilizar materiales de relleno. La inmovilidad durante tiempos prolongados es un problema para los individuos y la sociedad. Existen trabajos en modelos animales en los que se han ensayado compuestos bioactivos en el proceso de reparación,<sup>7,8</sup> pero no se halló información respecto de la acción del F sobre el mecanismo de reparación de defectos no críticos. Esta investigación tiene como objetivo determinar el efecto del tratamiento con MFP y NaF sobre

el proceso de reparación ósea y la calidad del hueso formado en tibias de rata con un defecto óseo no crítico.

### Materiales y métodos

Se utilizaron 18 ratas hembras de la línea IIM/FM sublínea "e" de 7 semanas, pesos: 187 $\pm$ 14 g. Los animales fueron tratados de acuerdo con las normas internacionales de cuidado y tratamiento de animales de experimentación.<sup>9</sup> Durante el experimento, las ratas recibieron agua y alimento *ad libitum* y se alojaron en un bioterio con temperatura 23-25 °C con ciclo luz-oscuridad 12h-12h. Se produjo un defecto bilateral y monocortical de 2 mm en la epífisis proximal de la tibia. La cirugía se realizó bajo anestesia general con ketamina y xilazina<sup>10</sup> y se realizó analgesia con diclofenac y antibiocioterapia con ceftriaxona.<sup>11</sup> Para la cirugía se rasuró la zona que se iba a incidir, se desinfectó con yodopovidona, se realizó una incisión longitudinal y se decoló la fascia hasta llegar a exponer el hueso. Se realizó el defecto manualmente para evitar calentamiento con una mecha de 2 mm de diámetro en el hueso cortical y trabecular, pero sin atravesar el hueso cortical opuesto (Figura 1). Finalmente se suturaron músculo y piel.

Los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos de 6 animales cada uno que recibieron tratamiento diario durante 30 días por sonda orogástrica: MFP (80  $\mu$ mol de MFP en 1 ml de MFP 80 mmol/l), NaF (80  $\mu$ mol de NaF en 1 ml de NaF 80 mmol/l) y grupo control (1 ml de agua destilada). Al inicio del experimento y a los 10, 20 y 30 días se obtuvieron muestras de sangre de la vena lateral de la cola para determinaciones bioquímicas (calcemia, fosfatemia, fosfatasa alcalina y fluoremia), se registró el peso corporal y se obtuvieron radiografías de las tibias para medir la densidad mineral ósea (DMO) de la zona del defecto y del hueso circundante. Las radiografías se obtuvieron con un equipo de rayos X odontológico de 70 kV y las densidades minerales se calcularon utilizando una curva de cali-



**Figura 1.** Representación esquemática del defecto óseo. Se muestra una vista anterior de la tibia con la zona del defecto (área gris) y un corte transversal de la tibia en la zona del defecto.

bración obtenida con un patrón de diferentes valores de DMO previamente calibrado.<sup>12</sup> A los 30 días se realizó recolección de orina y materia fecal durante 24 horas y luego se procedió a la eutanasia.<sup>13</sup> Se obtuvieron las tibias en las que se realizó el análisis histológico de la zona del defecto utilizando coloración con hematoxilina y eosina, previa descalcificación e inclusión en parafina.<sup>14</sup> El efecto de los tratamientos sobre el proceso de reparación del defecto y la calidad del hueso formado se evaluó por la DMO y las características histológicas del hueso formado en la zona del defecto.

La fluoruria se midió por potenciometría directa con un electrodo de ion específico ORION 94-09. La medición de la concentración de flúor plasmático se realizó con el mismo electrodo, previo aislamiento del flúor por microdifusión isotérmica.<sup>15</sup>

Se determinó la actividad de la fosfatasa alcalina plasmática (FAL) con un equipo ALP 405 (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina). Las modificaciones de la FAL a lo largo del

tratamiento se evaluaron a través de la regresión lineal de los valores de FAL en función del tiempo para los diferentes grupos. Un valor significativamente diferente de cero de la pendiente se consideró como un cambio significativo en la FAL.

La fosfatemia se cuantificó con un equipo Fosfatemia UV AA (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina). La calcemia se midió con un equipo CaColor AA (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina). La excreción de calcio fecal se midió por espectroscopia de absorción atómica.

Análisis estadístico: los resultados se expresan como media $\pm$ SD. Para el análisis de resultados se utilizó el software R.2.14.0.<sup>16</sup> Las diferencias entre las medias de más de dos grupos se analizaron con análisis de la variancia a un criterio de clasificación (ANOVA) y postest Tukey. El ajuste de datos a lo largo del tiempo se realizó por regresión lineal. Las diferencias se consideraron significativas si  $p < 0,05$ .

## Resultados

Los tratamientos no afectaron el crecimiento de los animales en ninguno de los grupos experimentales. El peso en función del tiempo pudo ser ajustado por una función lineal debido a la duración del experimento y la edad de los animales. El crecimiento se evaluó por la pendiente de la recta de regresión (g/día), el que fue significativamente diferente de cero (regresión lineal,  $p < 0,05$ ) para los tres grupos experimentales, control:  $1,4 \pm 0,2$ ; NaF:  $1,0 \pm 0,2$ ; MFP:  $1,2 \pm 0,3$ , y no fue diferente entre los grupos experimentales, regresión lineal,  $p > 0,05$ ,  $n = 6$  por grupo. El peso corporal (g) alcanzado al día 30 de experimento tampoco fue diferente entre los grupos experimentales, control:  $217 \pm 10$ ; NaF:  $213 \pm 12$ ; MFP:  $228 \pm 4$ , (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

La DMO del hueso circundante al defecto no se modificó a lo largo del tratamiento en ninguno de los grupos experimentales. No hubo diferencias significativas en las pendientes de la regresión lineal de la DMO en función del tiempo ( $\text{g Ca/cm}^2/\text{día}$ ) para los tres grupos experimentales (regresión lineal,  $p > 0,05$ ). Control:  $0,16 \pm 0,12$ ; NaF:  $-0,13 \pm 0,11$ ; MFP:  $0,08 \pm 0,16$ ,  $n = 6$  por grupo.

La DMO ( $\text{g Ca/cm}^2$ ) del hueso formado en la reparación del defecto mostró un aumento significativo en el grupo tratado con MFP respecto del grupo control a los 10 días de tratamiento. Control:  $23,2 \pm 3,5$ ; NaF:  $24,3 \pm 2,5$  y MFP:  $29,2 \pm 2,9^*$  (\* indica diferencia significativa respecto de grupo control, ANOVA a un criterio de clasificación, posttest de Tukey,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$  por grupo). Esta diferencia se redujo a lo largo del tratamiento no siendo significativa a los 20 y 30 días.

La FAL aumentó significativamente a lo largo del tratamiento en los grupos tratados con NaF y con MFP (regresión lineal,  $p < 0,05$ ) (Tabla 1). El grupo control no mostró cambios significativos de la actividad de FAL (regresión lineal,  $p > 0,05$ ).

La excreción fecal de calcio ( $\text{mg/día}$ ) fue significativamente menor en el grupo MFP

**Tabla 1.** Pendiente de la regresión lineal de los valores de fosfatasa alcalina plasmática (FAL) en función del tiempo (U/l.día).

Control	NaF	MFP
$1,14 \pm 1,82$	$3,39 \pm 0,87^*$	$4,01 \pm 1,19^*$

\* Indica diferencias significativas respecto de cero, regresión lineal,  $p < 0,05$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD,  $n = 6$  por grupo.

respecto del grupo control. Control:  $319 \pm 41$ ; NaF  $286 \pm 29$  y MFP:  $245 \pm 17^*$  (\* indica diferencia significativa respecto de grupo control, ANOVA a un criterio de clasificación, posttest de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Considerando que la dieta administrada fue la misma para los tres grupos, estos resultados indicarían una mayor absorción de calcio en el grupo MFP.

La calcemia y la fosfatemia no se modificaron a lo largo del tratamiento en ninguno de los grupos experimentales. Los valores a lo largo del experimento fueron los normales para esta línea de ratas y edad, y no se hallaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (ANOVA a un criterio de clasificación,  $p > 0,05$ , datos no mostrados). La excreción urinaria de fluoruro en 24 horas ( $\mu\text{mol}/24 \text{ h}$ ), el último día de tratamiento, no difirió entre los grupos experimentales. Control:  $2,5 \pm 2,0$ , NaF:  $2,5 \pm 1,0$  y MFP:  $3,4 \pm 0,6$  (ANOVA a un criterio de clasificación,  $p > 0,05$ ).

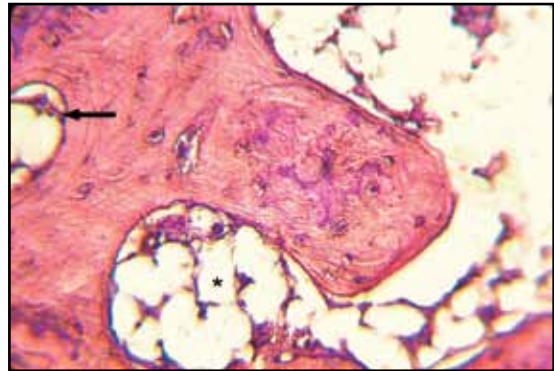
No se observaron diferencias significativas en la fluoremia entre los grupos experimentales al inicio del tratamiento. La concentración de flúor en plasma fue significativamente mayor a los 10 días en los animales tratados con MFP y NaF respecto del grupo control (ANOVA, posttest de Tukey,  $p < 0,05$ ) (Tabla 2). A los 30 días de tratamiento no se observaron diferencias significativas entre las fluoremias de los tres grupos experimentales.



**Tabla 2.** Concentración de flúor en plasma ( $\mu\text{mol/l}$ ) en los tres grupos experimentales a lo largo del tratamiento. Los resultados se muestran como media $\pm$ SD, n=6 por grupo.

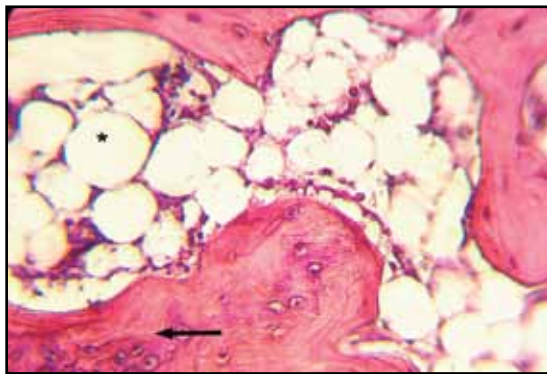
	Control	NaF	MFP
Día 0	32 $\pm$ 21	80 $\pm$ 40	48 $\pm$ 19
Día 10	43 $\pm$ 27	334 $\pm$ 30*	395 $\pm$ 177*
Día 30	207 $\pm$ 147	329 $\pm$ 270	274 $\pm$ 169

\* Indica diferencias significativas respecto del grupo control, ANOVA a un criterio de clasificación, postest de Tukey,  $p < 0,05$ .



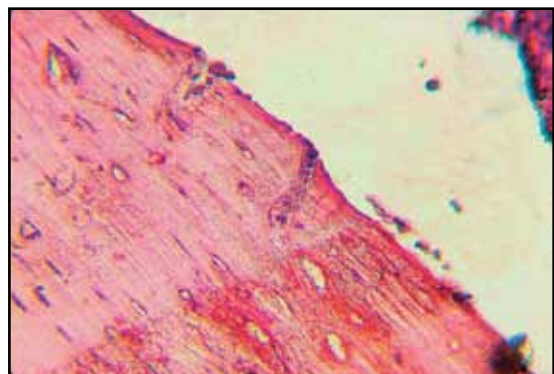
**Figura 3.** Corte histológico de tejido óseo de ratas tratadas con NaF. La flecha marca un sistema de Havers y el asterisco tejido adiposo. 400 $\times$ .

En el análisis histológico del grupo control se observó un tejido óseo con presencia de tejido cartilaginoso, abundante tejido adiposo entre las trabéculas y falta de conexión entre ellas (Figura 2).



**Figura 2.** Corte histológico de tejido óseo de ratas control. La flecha muestra la presencia de cartílago y el asterisco tejido adiposo. 400 $\times$ .

En el grupo tratado con MFP se observaron sistemas haversianos y ausencia de cartílago, tejido óseo con bordes bien establecidos y abundantes osteocitos. El tejido óseo se dispuso de manera organizada con aspecto laminillar (Figura 4).



**Figura 4.** Corte histológico de tejido óseo de ratas tratadas con MFP. 400 $\times$ .

En el grupo tratado con NaF se observó presencia de sistemas de Havers, restos de tejido cartilaginoso, aunque en menor proporción que en el grupo control. Los espacios medulares se hallaron ocupados por tejido adiposo (Figura 3).

## Discusión

El aumento de peso de los animales en los tres grupos tuvo un comportamiento uniforme. Los niveles de fosfatasa alcalina plasmática fueron utilizados como marcador de formación ósea. La fosfatasa alcalina aumentó

a lo largo del tratamiento en los grupos que recibieron MFP y NaF. El incremento más marcado a lo largo del tiempo en el grupo tratado con MFP se relacionaría con una mayor actividad osteoblástica, con el aumento de DMO observado a los 10 días y con la mejor arquitectura ósea observada en el examen microscópico de los cortes histológicos.

Coincidentemente con la acción osteoformadora del MFP se registró un aumento de la DMO a los 10 días en el grupo MFP, significativamente mayor que en el grupo control. El aumento de la DMO está indicando una mayor incorporación de calcio en la matriz ósea neoformada. Dado que todos los grupos experimentales recibieron la misma dieta, se sugiere el siguiente mecanismo de acción: la mayor incorporación de calcio al hueso podría haber producido un déficit del catión a nivel del líquido extracelular, generando un aumento en la liberación de parathormona (PTH) y aumento de la síntesis de  $1,25(\text{OH})_2$  vitamina  $\text{D}_3$ . Este último metabolito habría actuado a nivel intestinal aumentando la absorción de calcio. La menor excreción fecal de calcio observada en el grupo tratado con MFP está en concordancia con el razonamiento anteriormente realizado. Los niveles constantes de la calcemia y la fosfatemia a lo largo del tratamiento estarían indicando una integridad de los mecanismos involucrados en el mantenimiento del metabolismo fosfocálcico. La ausencia de modificaciones de la DMO del hueso no afectado por el defecto óseo estaría indicando que los tratamientos con MFP o NaF no produjeron cambios importantes en la mineralización en otras zonas del esqueleto. La constancia de los valores de la fosfatemia a lo largo del tratamiento también está indicando un mecanismo homeostático conservado aun en presencia de tratamientos que tienen ciertos efectos sobre el metabolismo del fosfato.<sup>17</sup> Los resultados obtenidos muestran que, con las dosis utilizadas, este efecto sería despreciable.

La fluoremia de los grupos tratados con NaF

y MFP fue significativamente mayor que la del grupo control a los 10 días del tratamiento. El valor mayor aunque no significativo en el grupo tratado con MFP se relacionaría con una mayor biodisponibilidad de fluoruro obtenida a partir del MFP con respecto al NaF, como consecuencia de la absorción del MFP a nivel gástrico y la unión a las alfa-macroglobulinas.<sup>3,6</sup> Contrariamente a lo observado a los 10 días, no se registraron diferencias significativas en los valores de fluoremia luego de 30 días de tratamiento. La disminución en la fluoremia aun cuando se está administrando NaF o MFP se debería al estímulo osteogénico con sales que contienen F, al aumento de la síntesis de matriz ósea y su calcificación, fenómeno durante el cual no solo se incorporan calcio y fosfato sino también F. En estas circunstancias, la fluoremia de los animales tratados puede ser incluso menor que en el grupo control.<sup>18</sup> Se ha demostrado que cuando existe una buena respuesta al tratamiento, la fluoremia disminuye marcadamente. La fluoruria medida en los tres grupos experimentales fue acorde con los valores de fluoremia hallados al final del tratamiento. El aumento de la fluoremia a los 30 días observado en los animales control se debe a la acumulación ocasionada por la ingesta de fluoruro proveniente del alimento. El alimento utilizado contiene menos de  $1 \mu\text{mol/g}$  de flúor total. Aun con tan bajo contenido de flúor, este puede llegar a constituir hasta un 20% de la dosis recibida en los grupos tratados. Estos resultados indican que, de utilizarse dietas libres de flúor, los resultados podrían ser más marcados incluso entre los grupos tratados y el grupo control. La obtención de dietas con contenidos de fluoruro menores de  $1 \mu\text{mol/g}$  es prácticamente imposible.

Es conocido que uno de los efectos adversos de la administración de NaF es la resistencia a la insulina<sup>19,20</sup> y la falla en su secreción.<sup>21</sup> Estos efectos adversos se observan cuando la fluoremia es elevada y se normalizan cuando la fluoremia alcanza valores normales. Se-



ría necesario evaluar el efecto negativo del fluoruro sobre la respuesta insulínica para la utilización de NaF en la reparación de defectos no críticos. En el caso del MFP no existe este efecto adverso con las dosis utilizadas en este trabajo.<sup>22</sup> Los resultados hallados indican que la respuesta osteogénica inducida por el flúor, produjo descenso de la fluoremia a valores que no difieren de los hallados en el grupo control.

En estudios futuros se evaluarán las propiedades biomecánicas del hueso neoformado en la zona del defecto. Los resultados histológicos sugieren que el comportamiento biome-

cánico sería superior en los grupos tratados con NaF y MFP con respecto al grupo control.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Hilda S. Moreno por su asistencia técnica. El trabajo fue financiado con un subsidio del CONICET PIP 0462.

(Recibido: febrero de 2013.

Aceptado: abril de 2013)

### Referencias

1. Brun L, Pera L, Rigalli A. Bone morphometry and differences in bone fluorine containing compounds in rats treated with NaF and MFP. *Biomed Pharmacother* 2010; 64: 1-6.
2. Lau KH, 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.
3. Rigalli A, Cabrerizo M, Beinlich A, Puche RC. Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. *Arzneimittelforschung* 1994; 44: 651-5.
4. Pera L, Brun LRL, Rigalli A, Puche RC. Identificación de proteínas derivadas de la alfa-2-macroglobulina en el hueso de ratas tratadas con monofluorofosfato de sodio. Rol de estas proteínas en la biodisponibilidad de flúor. *Rev Med Rosario* 2003; 69: 36-43.
5. Rigalli A, Morosano M, Puche RC. Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or sodium monofluorophosphate to human volunteers. *Arzneimittelforschung* 1996;46:531-3.
6. Rigalli A, Esteban L, Pera L, Puche RC. Binding of monofluorophosphate to alpha-2-macroglobulin and C3. *Calcif Tissue Int* 1997; 60: 86-9.
7. Armstrong JK, Han B, Kuwahara K, et al. The effect of three hemostatic agents on early bone healing in an animal model. *BMC Surg* 2010; 17:10:37.
8. Jawad MU, Fritton KE, Ma T, et al. Effects of sclerostin antibody on healing of a non-critical size femoral bone defect. *J Orthop Res* 2013; 31: 155-63.
9. Canadian Council on Animal Care Guidelines. Guide to the care and use of experimental animal. 2nd ed. 1998.
10. De Candia F, Rigalli A, Di Loreto V. Anesthesia and Analgesia. In: Rigalli A, Di Loreto V (eds). *Experimental surgical models in the laboratory rat*. Boca Ratón, USA: CRC Press. Taylor & Francis Group, 2009, p. 21-30.
11. Di Loreto V, Rigalli A. Antibiotics. In: Rigalli A, Di Loreto V (eds). *Experimental surgical models in the laboratory rat*. Boca Ratón, USA: CRC Press. Taylor & Francis Group, 2009, p. 33.
12. Moreno H, Lombarte M, Di Loreto V. Bones and Bone Tissue. In: Rigalli A, Di Loreto V (eds). *Experimental surgical models in the laboratory rat*. Boca Ratón, USA: CRC Press. Taylor & Francis Group, 2009, p. 229-32.
13. Rigalli A. Euthanasia. In: Rigalli A, Di Loreto V (eds). *Experimental surgical models in the*

- laboratory rat.. Boca Ratón, USA: CRC Press. Taylor & Francis Group, 2009, p. 31.
14. Brance ML, Brun LR. Histological procedures. In: Rigalli A, Di Loreto V (eds). *Experimental surgical models in the laboratory rat*. Boca Ratón, USA: CRC Press. Taylor & Francis Group, 2009, p. 221-7.
  15. Rigalli A, Pera LI, Di Loreto V, Brun LR. Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. Rosario, Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de Rosario, 2007.
  16. R Development Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2001. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
  17. Di Loreto V, Rigalli A, Puche RC. Effect of sodium fluoride administration to rats on bone phosphorous content and phosphatemia. *Arzneimittelforschung* 2006; 56: 760-6.
  18. Rigalli A, Ballina JC, Puche RC. Bone mass increase and glucose tolerance in rats chronically treated with sodium fluoride. *Bone Min* 1992; 16: 101-8.
  19. Menoyo I, Rigalli A, Puche RC. Effect of fluoride on the secretion of insulin in the rat. *Arzneimittelforschung*. 2005; 55: 455-60.
  20. Menoyo I, Puche RC, Rigalli A. Fluoride-induced resistance to insulin in the rat. *Fluoride* 2008; 41: 260-9.
  21. Rigalli A, Ballina JC, Roveri E, Puche RC. Inhibitory effect of fluoride on the secretion of insulin. *Calcif Tissue Int* 1990; 46: 433-8.
  22. Rigalli A, Alloatti R, Menoyo I, Puche RC. Comparative study of the effect of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate on glucose homeostasis in the rat. *Arzneimittelforschung* 1995; 45: 289-92.