

RESUM

TESI DEL TREBALL DE DOCTORAT SOBRE INTOXICACIÓ MALÒNICA I LA SEVA REPERCUSSIÓ EN EL REMODELAMENT OSSI DEL CONILL. (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)

Presentat per Xavier Miquel i Padró

Igualada gener del 2000

La HIPÒTESI sostinguda en aquesta experiència va sorgir de la coneixença de la participació de l'àcid cítric en la solubilització de la hidroxiapatita, component majoritari de les sals òssies.

Admesa l'anterior exposició es pot argüir que augmentant el nivell d'àcid cítric a la sang, el material cristal·lí de l'os sofrirà les modificacions pròpies de la solubilització atribuïda a dit àcid.

Essent l'àcid cítric element copiós de l'os i també, l'intermediari més abundant del cicle tricarboxílic, dada aquesta coincidència es va creure aquí era el lloc idoni per actuar.

Com a garant de la interrupció del cicle tricarboxílic, fou triat l'àcid malònic inhibidor competitiu de la deshidrogenasa succínica, enzim que regula el pas de l'àcid succínic a fumàric i se li atribueix el control del cicle de KREBS. Si es donés el condicionament pressentit, l'augment d'àcid cítric desmineralitzaria l'os, trastornant-lo,

INTRODUCCIÓ. En una experiència basada en l'efecte causat per l'àcid malònic sobre l'os viu, és inqüestionable el coneixement d'aquest, malgrat i que molts fets del seu comportament vaguen per l'embull. També és crucial no passar de llarg, que els resultats obtinguts en l'animal complet pequen dels inconvenients de l'estadística biològica, i que mai entota acció inductiva s'obté un enllestiment total, ans sempre queden uns escorcolls a fer que són el feix de la crítica necessària.

L'os és un teixit d'estructura dura que fa de bastiment al cos. Degut a la seva composició orgànica, matriu i inorgànica, mineral, en íntima relació amb la sang i altres i altres sistemes funcionals, fa que al llarg de la seva vida mantingui un impetuós metabolisme. La fracció inorgànica està constituïda per hidroxiapatita, carbonats, citrats, sodi, potassi, magnesi i miral amorf. L'ideal del cristall d'hidroxiapatita és imaginari, pels seus defectes de cristal·lització

S'ha de tenir en molt en compte, a l'hora de treure conclusions experimentals que l'edat de l'os mineral i l'edat del animal no són sinònims. El calci a l'os està distribuït en tres fraccions: iònica, cristal·lina i lligat a proteïnes, i les tres estan en equilibri, a l'extrem que el trasbals de qualsevol d'elles, afecta íntimament a les altres mortificant l'estructura química i morfològica de l'os. Segons KERVRAN, el calci dels animals i plantes té tres orígens:

$K39+H1=40$, $Mg24+O16=40$ i $Si28+C12=40$.

La taxa mitjana de formació òssia en el mastodont era idèntica a la del home. En la zona externa del cristall hi ha la corona hidratant ionitzada on es mouen el Ca, PO₄, CO₃, Mg, F i el citrat,

La formació, reabsorció i remodelament de l'os va a càrrec de dues cèl·lules: l'osteoblast i l'osteoclast. L'edat de l'os i la seva reactivitat química queden determinades pel contingut d'aigua. Com que l'aigua és un dipolo permanent això acaba de complicar la lectura experimental de la cristal·lització de la hidroxiapatita. L'os a nivell microscòpic mostra dues formes: cortical i trabecular i com a organització estructural: lamel·lar i plexiforme. La gran capacitat del citrat per a quelar el calci deixa especular la seva implicació en la

ossificació. Les citrat sintases isolades dels mitocondris de fetge de rata i de la llimona són inhibides per l'ATP. L'augment de calci a l'os després de l'administració de PTH va precedir d'un increment de citrat. La relació entre vit D i citrat ha estat establerta. El citrat és transportat a través de la membrana mitocondrial en intercanvi amb el malat a un per un. El mitocondri és capaç d'acumular calci. Si augmenta la funció paratiroidea augmenta l'àcid cítric a la sang. Les preparacions que ordinàriament són von KOSSA negatives en presència d'àcid cítric es tornen positives. La idea del citrat-like-substància que actua dissolent les sals d'os és molt vella (GREENWALT, 1926).

La succinideshidrogenasa conté 4 àtoms de Fe, 4 de sulfurs inorgànics i FAD, és un exemple de proteïna fèrrica no hèmica., i aquest enzim, a diferència dels altres del cicle tricarbòxilic és part integrant de la membrana interna del mitocondri i està present a totes les cèl.lules aeròbiques.

L'àcid cítric lligat dèbilment a l'os ho fa per forces de van der WAALS, el cítric lligat fort ho està en forma de sals càlciques.

L'àcid malònic inhibeix a la succinodeshidrogenasa gràcies a una analogia estructural: COOH-CH₂-COOH (malònic), COOH-CH₂-CH₂-COOH (succínic).

El fosfocitrat inhibeix la vitro-nucleació del cristall d'apatita, i la seva estructura (P-O-P) és similar a la del bifosfonat (P-C-P) i del pirofosfat (P-O-P), i tots in vitro inhibeixen la formació del cristall d'hidroxiapatita. L'àcid cítric a baixa concentració intensifica la calcificació, mentre que a alta evita el procés. L'àcid cítric es pot observar, no solament en espècimens d'os fresc, sinó també en ossos enterrats centenes d'anys i exposats, com és natural, als factors de descomposició.

L'osteoblast és d'origen mesenquimal, l'osteoclast hematopoietic.

MALGRAT I LA MULTIPLICITAT DE FUNCIONS ENCOMANADES AL CITRAT, ÉS SORPRENENT LA POCA INFORMACIÓ ÚTIL SOBRE EL SEU FER.(SRERE, 1968).

DELIMITACIÓ DEL TEMA. Quan s'intenta escrutar el metabolisme ossi ens trobem amb una seriosa desavinença que entrebanca la raó del que es busca, i és que: segons un procés de síntesi proteica comú a tots els teixits orgànics s'elabora una matriu col.làgena no pas diferent, i que per a fer-se os es mineralitza intensament, sense explicació coherent. I totes les proves hagudes participen tant de la formalitat virtual com de l'exactitud de presagi. Per ser tants els criteris referits a l'ossificació ha esdevingut obligatori delimitar el contingut, la direcció i el sentit de la prova.

PUNTS DE PARTIDA. El malonat inhibeix la deshidrogena succínica en viu (KREBS,1938). La succinodeshidrogenasa controla el metabolisme del cicle tricarbòxilic (SCHAFFER,1963). Les cel.lules de l'os posseïxen tot el funcionament del cicle de KREBS (FULLMER,1964). En la reabsorció òssia hi ha un augment local d'àcid cítric (LEKAN,1960). El 99% del total del calci i el 90% del citrat del cos estan a l'os (DICKENS,1941). La PTH acumula àcid cítric a la superfície de l'os i el dissol per quelació (NEUMAN,1958). En les solucions d'àcid cítric 5M a 37° C, l'àcid penetra al monocristall paral·lelament a l'eix c amb una rapidesa de 60 nM/seg.(JONGEBLOED, van den BERG i ARENDS,1974).

MATERIAL I MÈTODE. L'animal triat per a l'experiència: conill domèstic (*Oryctolagus Cuniculus*). 300 conills, en temps llarg, successivament han estat repartits en lots de 6 i, cadascun de la mateixa ventrada. Vida separada en gàbies de 0.5 mc. No s'ha fet cas del sexe. A dos terços de cada grup se'ls ha injectat a la vena marginal de l'orella 3.306 mM de malonat dissòdic dissolts en 10 cc d'aigua bidestil·lada a pH 7.2. Recollida diària d'orina: mesurada i analitzada. Cada 6 dies anàlisi hemàtic i dosatges. Les preparacions d'os per a lectura microscòpica obtingudes per raspats.

ASSAIG I

Grup de 5 conills 1-2-3 intoxicats i 4-5 control.
El pic d'augment de l'àcid cítric en el sèrum dels conills intoxicats es donà al 18^o dia de tractament, coincidint amb la baixada de les fosfatases alcalines. Parangonats els perfils de les proteïnes plasmàtiques d'intoxicats i no, cap modificació significativa. Disminució de pes i augment de secreció d'orina en els conills intoxicats. Analítica normal. Calcemia mitjana dels conills intoxicats 11.85 mg dl, la dels control 12.97 mg dl. Acumulació d'eosinòfils a la melsa del conill:1. Major creixement dels ossos llargs intoxicats. A l'administració de 99 Tc, major captació òssia dels conills intoxicats. La microscopia de les figures 2-T0-inx i 3-T1-inx, obtingudes per raspat presenten una morfologia periostal aberrativa. Les 4-T0-con i la 5-T1-con. no.

ASSAIG II

Grup de 6 conills A-B-C-D intoxicats i E-F control. L'alça d'àcid cítric al sèrum dels conills intoxicats fou en planell des del dia 12-18, dies coincidents amb la baixada de les fosfatases alcalines. Àc. cítric dels controls: normal. Proteïnes hemàtiques: percentatge dintre dels marges admesos. Ca-inx: 15.0 mg dl; Ca-con: 12.6 mg dl. P,K,Na: normals. Hemograma correcte. Visceres: degeneració grassa en el fetge del D i abundants elements joves a la melsa del E. Menys pes dels intoxicats respecte controls, com també augment d'orina, normal. Clara diferència de llargada del fèmur i la tibia dels conills tractats. Microscopia de les figures obtingudes per raspat: B-T1-inx i C-T0-inx, morfologia periostal esgarriada. Les E-T1-con i F-T0-con, normals.

ASSAIG III

Grup de 4 conills I - III intoxicats i IV - V control. Àcid cítric alçat al sèrum dels conills intoxicats des del dia 12 al 18. Les fosfatases alcalines abaixades seguint el vèrtex del àcid cítric. En els conills control cítric normal. Les proteïnes hemàtiques dels intoxicats, en ordre. Ca-inx: 14.2 mg dl. Ca-con: 11.5 mg dl, altres elements iònics, normals. Evident minva del pes dels intoxicats, i augment de la quantitat d'orina, d'analítica correcta, en aquests. Més llargs els ossos llargs dels animals tractats. Microscopia de les figures obtingudes per raspat: I-To-inx i III-T1-inx abundants vacuoles a l'os lamel·lar. Les IV-T0-con i VI-T1-con, exentes.

ASSAIG IV

Grup de 5 conills 39-40-41 intoxicats i 42-44 control. Àcid cítric al sèrum punt àlgid en el dia 18 i, el devalament de les fosfatases alcalines s'anticipa al màxim de l'àcid cítric. En els conills control citrèmia normal. El percentatge de les proteïnes hemàtiques respecta els límits tolerats. Ca inx: 14.9 mg dl; Ca-con: 12.2 mg dl. P, K, Na: normals. Menor pes dels conills intoxicats que els control. Abundant increment de la quantitat d'orina, en els conills intoxicats d'analítica normal. Els hùmers dels intoxicats més llargs que els de control. Microscopia de les figures per raspat: 39-T1-inx i 41-Per-inx repetició desdibuixada periostal. Les 44-T1-inx i 42-Per-con, normals.

ASSAIG V

Grup de 4 conills 230-231 intoxicats 232-233 control. Àcid cítric sèric en dos cims l'un el dia 6 i l'altre el 18. Les fosfatases alcalines en descens marcat fins el dia 18. àcid cítric intactes, normal. Quantitat i qualitat de les proteïnes sèriques, en regla. Ca-inx: 15.4 mg dl; Ca-con: 12.5 mg dl. L'orina, d'analítica normal dels conills intoxicats sobrepassa abundantment la quantitat de la dels control. Les anàlisis de femta dels 231 i 132: sang negativa. Més llargs els fèmurs i túbies dels conills intoxicats. Microscopia de les figures 230-T0-inx i 231-FO-inx desordre reticular periostal. Les 232-T0-con i 233-FO-con, normals.

ASSAIG VI

Grup de 5 conills 273-274-275 intoxicats i 276-277 control. El vèrtex de l'àcid cítric sèric dels conills intoxicats al dia 12. Punt més baix de les fosfatases alcalines abans de la puja del cítric. Normal l'àcid cítric dels conills control. Proteïnèmia normal en els conills intoxicats. Ca-inx: 15.3 mg dl; Ca-con: 13.8 mg dl. Els conills tractats han pesat menys que els control. Augment patent de la quantitat d'orina, analítica normal, respecte a la dels conills control. Els mitocondris de cor dels conills intoxicats no han sofert alteració, i els seus ossos llargs han crescut més. Microscopia de les figures 273-T2-inx i 274-T0-inx: excés de vacuoles i desfiguració endostal. Les 277-T2-con i 276-T0-con: imatges normals.

DISCUSSIÓ. Si el ió citrat no pot entrar al reticle cristal·lí de la HAp, perquè és més gros que el tamany del cristall ossi, i el 90% d'aquest citrat està a l'ossada (TAYLOR, 1959 - BRECEVIC, 1979), que hi fa ?.

Si diverses malalties infeccioses, metabòliques o genètiques i àdhuc la ingravitació, tenen una tendència específica a fer víctima l'os com una premonició de la seva actuació de conjunt (Un dels grans problemes de la pèrdua d'os és la seva universalitat, GARN, 1967) - (La heterogeneïtat confusa de moltes malalties metabòliques de l'os prové d'haver-hi qui-sap-els camins per a arribar a un resultat comú, BURR, 1989), no és propici pensar que aquesta actuació de conjunt que tendeix a la convergència de l'índole dels trastorns ossis provocats per les situacions citades, sigui regida, més endins, per un constituent - l'àcid cítric - que orienti la finalitat coincident dada la seva omnipresència a l'os ?.

I a més, per què no, sabent que la majoria de substàncies de custodien la formació i la remodelació de l'os, directament o indirectament, demostren tenir un fort atraïment per l'àcid cítric que es palesa movent la seva quantia a l'organisme ?.

Si apleguem les tres interrogacions es pot córrer el risc de suposar que l'àcid cítric, ja que hi és i per no perdre peculiaritat, davant de la impossibilitat d'entrar a la intimitat de l'os opti per romandre al seu embolcall d'hidratació fent de conductor diferenciat que tria els ions que han d'entrar o sortir del cristall.

Ajuda a aquesta suggerència el que el cristall tingui intersticis habituals que deixen pas i lloc als materials d'intercanvi.

S'han consultat 147 llibres del tema i s'han llegit 7.221 separates referents a l'os.

CONCLUSIONS.

En els animals tractats s'evidencia:

- a) Un augment significatiu de l'àcid cítric sèric.
- b) Que les fosfatases alcalines disminueixen proporcionalment a la puja de l'àcid cítric.
- c) Que l'anatomia estadística de les viscères fetge, ronyó, melsa, cor i pulmó no presenta cap alteració significativa.
- d) Que l'anàlisi hemàtic, tret de les variacions de l'àcid cítric i de les fosfatases alcalines està dins dels marges tolerats.
- e) Que no hi ha desdibuixament dels mitocondris.
- f) Que a l'administració de 0.8 milicuris de ⁹⁹Tc/Kg hi ha una major captació òssia en els animals intoxicats.
- g) Un creixement superior, en llargada, dels ossos llongs.
- h) Un remodelament periostal aberrant.
- i) La massa òssia lamel·lar en franca remoció.

It seems: Que la inhibició malònica respecte a la seva repercussió en el remodelament ossi ha seguit un curs, amb tots els alligonaments a fer-hi i les correccions necessàries, d'aproximació " lineal " al resultat buscat.

SUMMARY

DOCTORATE THESIS ABOUT MALONIC INTOXICATION AND ITS EFFECT ON THE OSSEOUS REMODELATION OF THE RABBIT. (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)

Presented by Xavier Miquel i Padró

Igualada, January 2000

The HYPOTHESIS, which has been put forward in this experiment, first appeared from the knowledge that the citric acid takes part in the solubilisation of the hydroxyapatite, a major component of the osseous salts.

From this idea, one can deduce that with an increase of the citric acid's level contained in the blood, the crystalline material of the bone will suffer the typical changes that take part in the solubilisation of the citric acid.

Taking into account that the citric acid is a copious element of the bone, as well as the more abundant intermediate of the tricarboxylic cycle, it was thought that this was the best place to start.

For its capacity to interrupt the tricarboxylic cycle, the malonic acid was chosen because it competitively inhibits the succinic dehydrogenase, an enzyme that regulates the change of the succinic acid into fumaric acid and that it is thought to control the KREBS cycle. If this is true, the increase of the citric acid demineralises the bone and it causes a disorder on it.

INTRODUCTION. If we want to experiment on the effect produced by the malonic acid on the living bone, we must know about it, although many facts of its behaviour are still unknown. We also have to remember that the results obtained in the entire animal can have some of the biological statistics' disadvantages and that in inductive acts we cannot reach complete results and there will always be some investigations left which will belong to the necessary critiques.

The bone is a hard tissue, which covers the body. Because of its organic, generative and inorganic and mineral composition and the fact that it is related to blood and other functional systems, this allows it to have an impetuous metabolism. The organic part has hydroxyapatite, carbonate, citrate, soda, potassium, magnesium and amorphous crystal. Because of its defects of crystallisation, the ideal of the hydroxyapatite crystal is imaginary.

When it comes to the conclusions of this experiment, it is really important to take into account that the age of the mineral bone and that of the animal are not the same. The calcium of the bone is divided into three fractions: the ionic fraction, the crystalline fraction and the fraction linked to proteins, and the three of them are in equilibrium, to the extent that if something affects one of them, it will also affect the other two, damaging the chemical and morphological structure of the bone. According to KERVRAN, the calcium of animals and plants has three origins: $K_{39}+H_{1}=40$, $Mg_{24}+O_{16}=40$ and $Si_{28}+C_{12}=40$.

The minimum level of osseous formation in the mastodon was identical as the one of men. In the external area of the crystal there is the ionated hydrating crown where the Ca, PO₄, CO₃, Mg, F and citrate move.

The formation, reabsorption and remodeling of the bone are made by two cells: the osteoblast and the osteoclast. The age of the bone and its chemical reactivity are

determined by the amount of water. Because the water is a permanent dipole, this complicates the experimental reading of the hydroxyapatite's crystallisation. Seen with the microscope, the bone shows two different shapes, cortical and trabecular, and as far as its structural organization is concerned, it can be lamellar and plexiform. The important capacity of the citrate to chelate the calcium allows us to speculate about its implication in the ossification. The isolated citrate synthases of the mitochondrion in the liver of a rat and of lemon are inhibited by the ATP. The increase of calcium in the bone after the administration of PTH comes before an increase of citrate. The relationship between vitamin D and citrate has already been established. The citrate is carried by the mitochondrial membrane as an exchange with the malate, one to one. The mitochondrion is able to accumulate calcium. If the parathyroidal function increases, then the citric acid of blood increases too. When there is citric acid, the preparations that are normally von Kossa negative become positive. The idea of the citrate-like-substance, which acts dissolving the salts of the bone, is an old one (GREENWALT, 1926).

The succinate dehydrogenase has 4 atoms of Fe, 4 of inorganic sulphur and FAD, which is an example of non-haemic ferric protein, and this enzyme, differently as what happens with the other ones of the tricarboxylic cycle, is an integrating part of the internal membrane of the mitochondrion and it is a part of all the aerobic cells.

The citric acid, weakly linked to the bone, is linked by van der Waals forces; the strongly linked citric is linked in the shape of calcium salts.

The malonic acid inhibits the succinate dehydrogenase thanks to a structural analogy: $\text{COOH-CH}_2\text{-COOH}$ (malonic), $\text{COOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ (succinic).

The phosphocitrate inhibits the vitronucleation of the apatite crystal and its structure (P-O-P) is similar to the one of the biphosphonate (P-C-P) and the pyrophosphate, and all of them inhibit in vitro the formation of the hydroapatite crystal. The citric acid at a low concentration intensifies the calcification, whereas at a high concentration it prevents the process. The citric acid can be observed not only in specimen with a living bone, but also in bones that have been buried for centuries and have been exposed, naturally, at the factors of decomposition.

The origin of the osteoblast is mesenchymal and the one of the osteoclast is haematopoietic.

IN SPITE OF THE MULTIPLICITY OF FUNCTIONS GIVEN TO THE CITRATE, IT IS SURPRISING THAT THERE EXISTS SO FEW INFORMATION ABOUT ITS ACTIVITY. (SRERE, 1968).

DELIMITATION OF THE ISSUE. When we try to examine the osseous metabolism we find a serious disadvantage which disturbs what we are looking for, and this disadvantage is as follows: in a process of a proteinic synthesis, which is the same for all the organic tissues, the same collagenous matrix is elaborated. This matrix is intensively mineralised in order to become bone, without any coherent explanation. All the evidences about it confirm both the virtual formality and the accuracy of the portent. Because there are so many views about the ossification, it is compulsory to delimit the contents, the objective and the sense of the experiment.

STARTING POINTS. The malonate inhibits the succinate dehydrogenase alive. (KREBS, 1938). The succinate dehydrogenase controls the tricarboxylic cycle's metabolism (SCHAFFER, 1963). The cells of the bone have the entire functioning of the KREBS cycle (FULLMER, 1964). In the osseous reabsorption there is a local increase of citric acid (LEKAN, 1960). A 99% of the total calcium and a 90% of the

citrate of the body are in the bone (DICKENS, 1941). The PTH accumulates citric acid in the surface of the bone and dissolves it by chelation (NEUMAN, 1958). In the solutions of citric acid 5M at 37° C, the acid enters into the monocystal parallel to axe c at a rapidity of 60 nM/sec. (JONGEBLOED, van den BERG and ARENDS, 1974).

MATERIAL AND METHOD. The animal chosen for this experiment is the domestic rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*). 300 rabbits, in a long period of time, have been successively divided into groups of 6 and, each of them of the same litter. Separate life in cages of 0.5 cm. Sex has been ignored. 2/3 of each group have been injected at the marginal vein of the ear 3606 mM of dissodic malonate dissolved in 10cc of bidestillate water at a pH of 7.2. The urine has been collected, measured and analysed every day. Every 6 days an haematic analysis and dosages have been made. The osseous preparations in order to make a microscopic analysis have been obtained by scraping.

EXPERIMENT I

Group of 5 rabbits, 1-2-3 intoxicated and 4-5 control. A bit of increase of the citric acid in the serum of the intoxicated rabbits appeared the 18th day of treatment, and it coincided with a decrease of the alkaline phosphatases. When the profiles of the plasmatic proteins of both the intoxicated rabbits and the controls are compared, no significant change is seen. Loss of weight and increase of urine secretion in the intoxicated rabbits. Normal analysis. Average of calcemia in the intoxicated rabbits 11,85 mg dl, and in the controls 12,97 mg dl.

Accumulation of eosinophiles in the spleen of the rabbit 1.

Major increase of the long bones in the intoxicated.

With the administration of 99 Tc, more osseous captation in the intoxicated rabbits.

The microscopic analysis of figures 2-TO-inx and 3-T1-inx, obtained by scraping present an aberrative periostal morphology, which is not the case of 4-TO-con and 5-T1-con.

EXPERIMENT II

Group of 6 rabbits A-B-C-D intoxicated and E-F controls. The increase of the citric acid in the serum of the intoxicated rabbits showed up from the 12th until the 18th day, and these days coincide with the decrease of the alkaline phosphatases.

Citric acid of the controls: normal. Haematic proteins: percentage in the admitted margins.

Ca-inx: 15.0 mg dl; Ca-con: 12.6 mg dl. P, K, Na: normal. Correct hemograme. Viscera:

Fat degeneration in the liver of D and many young elements in the spleen of E. Loss of weight in the intoxicated related to the controls, as well as a normal increase of urine.

Clear difference in the length of the femur and the tibia of the treated rabbits.

Microscopic analysis of the figures obtained by scraping: B-T1-inx and C-TO inx, periostal morphology in disorder. E-T1-con and F-TO-con, normal.

EXPERIMENT III

Group of 4 rabbits I – III intoxicated and IV – V controls. Citric acid increased in the serum of the intoxicated rabbits from the 12th until the 18th day. The alkaline phosphatases decreased following the increase of the citric acid. In the controls, normal citric acid. The haematic proteins of the intoxicated, in order. Ca-inx: 14,2 mg dl. Ca-

con: 11,5 mg dl, and other ionic elements, normal. Clear loss of weight of the intoxicated and increase of the urine quantity, which produced a normal analysis. The treated animals showed longer bones.

Microscopic analysis of the figures obtained by scraping: I-To-inx, III-T1-inx abundant vacuoles in the lamellar bone. IV-TO-con and V-T1-con, exempt.

EXPERIMENT IV

Group of 5 rabbits 39-40-41 intoxicated and 42-44 controls. The citric acid in the serum is found at a culminating point the 18th day and the decrease of the alkaline phosphatases takes place before the increase of the citric acid. In the rabbits which are controls, normal citremia. The percentage of the haematic proteins respects the tolerated limits. Ca inx: 14.9 mg dl; Ca-con: 12.2 mg dl. P, K, Na: normal. The intoxicated rabbits have lower weight than the controls. Great increase in the quantity of urine, which shows a normal analysis. The humerus of the intoxicated rabbits are longer than the ones of the controls.

Microscopic analysis of the figures obtained by scraping: 39-T1-inx and 41-Per-inx unclear periosteal repetition. 44-T1-inx and 42-Per-con, normal.

EXPERIMENT V

Group of 4 rabbits 230-231 intoxicated and 232-233 controls. The seric citric acid shows two culminating points, one the 6th day and the other the 18th day. The alkaline phosphatases clearly decrease until the 18th day. Untouched citric acid, normal. The quantity and quality of the seric proteins, in order. Ca-inx: 15.4 mg dl; Ca-con: 12.5 mg dl. The urine of the intoxicated rabbits exceeds the one of the controls, but the analysis is normal. The excrement analysis of the 231 and 232: negative blood. The femurs and tibias of the intoxicated rabbits are longer.

The microscopic analysis of the figures 230-TO-inx and 231-FO-inx show reticular periosteal disorder. 232-TO-con and 233-FO-con are normal.

EXPERIMENT VI

Group of 5 rabbits 273-274-275 intoxicated and 276-277 controls. The culminating point of the seric citric acid showed up the 12th day. The lowest point of the alkaline phosphatases shows up before the increase of the citric. The citric acid of the controls is normal. Normal proteinemia in the intoxicated rabbits.

Ca-inx: 15.3 mg dl; Ca-con: 13.8 mg dl. The treated rabbits have lower weight than the controls. Compared to the controls, there is a clear increase of the quantity of urine in the intoxicated rabbits, but it shows a normal analysis.

The mitochondrions of the intoxicated rabbits' heart have not suffered any alterations, and their longer bones have grown up more.

Microscopic analysis of figures 273-T2-inx and 274-TO-inx: excess of vacuoles and endosteal deformation. 277-T2-con and 276-TO-con: normal images.

DISCUSSION. If the citrate ion cannot enter into the crystalline reticulum of the Hap, because it is bigger than the osseous crystal, and the 90 % of this citrate is in the bones (TAYLOR, 1959 – BRECEVIC, 1979), what is it doing?

If several infectious, metabolic and genetic illnesses as well as the agravity have an specific tendency to affect the bone as a premonition of its global action, is it not propitious to think that this global action, which tends to gather the nature of the osseous disorders provoked by the already mentioned situations, is governed inside by a constituent –the citric acid— which orientates the coincident objective because of its omnipresence in the bone? (One of the big problems of the loss of the bone is its universality, GARN, 1967) – (The confused heterogeneousness of many metabolic illnesses of the bone comes from the millions of ways that can lead to a common result. BURR, 1989).

So, why not, if we know that the majority of substances which help to the formation and remodeling of the bone show, directly or indirectly, that they are strongly attracted by the citric acid, as we can see by changing its quantity in the organism?

If we group these three questions we can run the risk of supposing that the citric acid, as it is there and so that it does not lose its peculiarity, when it cannot get in the bone choses to stay at its hydration cover being a differentiated guide by choosing the ions which have to go in or out of the crystal?

The fact that the crystal has normal interstices which let the way to the exchange material helps to this suggestion.

147 books and 7221 offprints related to the bone have been looked up and read.

CONCLUSIONS.

In the treated animals the following points can be observed:

- a) A significant increase of the seric citric acid.
- b) The alkaline phosphatases decrease proportionally to the increase of the citric acid.
- c) The statistical anatomy of the viscera, liver, kidney, spleen, heart and lung does not present a significant change.
- d) The haematic analysis, in spite of some variations of the citric acid and the alkaline phosphatases, shows a tolerated result.
- e) The mithocondrions do not become blurred.
- f) With the administration of 0.8 milicuris of $^{99}\text{Tc}/\text{Kg}$ there is a larger osseous captation in the intoxicated animals.
- g) A greater lengthening of the longer bones.
- h) An aberrant periosteal remodeling.
- i) The lamellar osseous mass shows a clear removal.

It seems that: as far as its effect on the osseous remodeling, taking into account all the instructions and the necessary corrections, the malonic inhibition has followed a process that can be described as a linear approach to the expected result.