



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD**

TESIS DOCTORAL
**INFLUENCIA DE LA VITAMINA D EN LA
CONSOLIDACIÓN DE FRACTURAS EN
RATAS ANCIANAS**

**PRESENTADA POR:
ALBERTO D. DELGADO MARTÍNEZ**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. LUIS MUNUERA MARTÍNEZ
DRA. DÑA. M^a EUGENIA MARTÍNEZ GÓMEZ**

JAÉN, 15 DE DICIEMBRE DE 1995

ISBN 84-8439-017-9



INFLUENCIA DE LA VITAMINA D EN LA CONSOLIDACIÓN DE FRACTURAS EN RATAS ANCIANAS

Delgado Martínez

Alberto D.

I.S.B.N 84-8439-017-9

Centro Facultad de Medicina

Departamento Cirugía





Nombre y apellidos del autor

Apellidos **DELGADO MARTÍNEZ**

Nombre **ALBERTO D.**

Título de la Tesis Doctoral

INFLUENCIA DE LA VITAMINA D EN LA CONSOLIDACIÓN DE FRACTURAS EN RATAS ANCIANAS

Fecha de lectura

15 DE DICIEMBRE DE 1995

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura

Centro **Facultad de Medicina**

Departamento **Cirugía**

Composición del Tribunal / Dirección de la tesis

Dirección de la Tesis **Dr. D. Luís Munuera Martínez y Dra. D^a M^a Eugenia Martínez Gómez**

Presidente/a del Tribunal **Dr. D. Hipólito Durán Sacristán**

Vocales

Dr. D. Julio Fuentes Losa

Dr. D. Aurelio Rapado Errazti

Dr. D. Antonio López Alonso

Secretario/a **Dr. D. Antonio Gómez Pan**

Calificación obtenida

APTO CUM LAUDE POR UNANIMIDAD

Resumen

Para conocer el efecto de la Vitamina D sobre la consolidación de las fracturas, se diseñó un modelo experimental en rata Wistar hembra de 18 meses de edad.

55 ratas iniciaron el estudio, dividiéndose aleatoriamente en dos grupos: uno, en el que se indujo un déficit dietético de Vitamina D durante 6 semanas, y otro, control, sin déficit. Tras este periodo, se realizó una fractura experimental en el tercio medio de ambos fémures. En ese momento se subdividieron ambos grupos en dos: uno en los que se realizó una suplementación con Calcidiol durante la consolidación de la fractura, y otro en el que no (control). Tras 5 semanas de consolidación, se sacrificaron los animales, extrayéndose los fémures y las tibias. Se obtuvieron muestras de sangre al inicio del estudio, 2 días antes de la fractura, y al sacrificio, determinándose los niveles séricos de Calcidiol, Calcitriol y PTH.

Se realizó estudio histológico sobre 16 callos de fractura, midiéndose la anchura máxima media de los ribetes de osteoide, así como la proporción de los distintos tipos de tejido (óseo, cartilaginoso, fibroso) en el callo. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos.

Se aplicó la densiometría a 57 fémures y 69 tibias. No se apreciaron diferencias en la densidad ósea del callo en función de la suplementación o el déficit de Vitamina D. La deficiencia de Vitamina D produjo una pérdida de masa ósea del callo en función de la suplementación o el déficit de Vitamina D. La deficiencia de Vitamina D produjo una pérdida de masa ósea en la cabeza del fémur, así como en las epífisis de la tibia. No se apreciaron diferencias en cuanto a la masa ósea del hueso sano en función de la suplementación con 25-

OH-Vitamina D mejoró la densidad ósea del hueso sano y del callo de fractura correlaciono con los niveles de Calcidiol al inicio de la experimentación.

También se realizó ensayo de torsión a baja velocidad de los fémures y las tibias. La suplementación con 25-OH-Vitamina D mejoró de forma significativa la resistencia mecánica del hueso fracturado. Sin embargo, la deficiencia en este elemento no empeoró dicha consolidación respecto a las ratas normales. La resistencia mecánica del callo de fractura pareció depender en parte de los niveles de Calcitriol y PTH previos a la experimentación. La resistencia mecánica del hueso intacto no pareció alterarse ni con la suplementación ni con el déficit de Vitamina D, producido experimentalmente durante 5 y 11 semanas, respectivamente. La resistencia mecánica del hueso intacto parece depender, en parte, de los niveles de Calcidiol y Calcitriol al inicio del estudio.

INFLUENCIA DE LA VITAMINA D
EN LA CONSOLIDACIÓN DE FRACTURAS
EN RATAS ANCIANAS

ALBERTO D. DELGADO MARTÍNEZ

DIRECTORES

Esta Tesis doctoral fue dirigida por el **Profesor D. Luis Munuera Martínez**, Catedrático de Traumatología de la Universidad Autónoma de Madrid, y Jefe del Departamento de Traumatología del Hospital "La Paz", y codirigida por **Dra. María Eugenia Martínez Gómez**, facultativa del servicio de bioquímica del Hospital "La Paz" de Madrid.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Presidente:

* **Prof. D. Hipólito Durán Sacristán**. Catedrático de Cirugía. Universidad Complutense de Madrid.

Vocales:

* **Prof. D. Julio Fuentes Losa**, Catedrático de Ingeniería Mecánica de la Universidad Nacional de Educación a distancia (UNED).

* **Prof. D. Aurelio Rapado Errazti**, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

* **Prof. D. Antonio López Alonso**, Catedrático de Traumatología de la Universidad de Alcalá de Henares.

* **Dr. D. Antonio Gómez Pan**, subdirector de investigación del hospital "La Paz".

LECTURA

La lectura y defensa pública tuvo lugar en el salón de grados de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid el Viernes día 15 de Diciembre de 1995, a las 13.00 horas.

La calificación obtenida fue de Apto cum laude por unanimidad.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

1. Delgado-Martínez, AD; Carrascal, MT; Martínez, ME; Rodríguez-Avial, M; Munuera, L. (1998): "Effect of 25-OH-vitamin D on fracture healing in elderly rats". Journal of Orthopaedic Research, 16:650-653.
2. Delgado-Martínez, AD; Munuera, L. (1999): Effect of 25-OH-vitamin D on fracture healing in elderly rats [reply-letter] Journal of Orthopaedic Research, 17:795.

INFLUENCIA DE LA VITAMINA D
EN LA CONSOLIDACION DE FRACTURAS
EN RATAS ANCIANAS

Alberto D. Delgado Martínez

Prof. D. Luis Munuera Martínez, Catedrático del Departamento de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid, y Jefe del Departamento de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital "la Paz", y D^a. María Eugenia Martínez Gómez, doctora en farmacia, adjunta del servicio de Bioquímica Clínica del Hospital "la Paz", CERTIFICAN:

Que D. Alberto D. Delgado Martínez ha realizado, bajo su dirección, el trabajo titulado "Influencia de la vitamina D en la consolidación de fracturas en ratas ancianas", que presenta como tesis doctoral para la obtención del grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Madrid, a 6 de Noviembre de 1995

Fdo:

Prof. Dr. Luis Munuera

Dra. M^a Eugenia Martínez

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, al Prof. D. Luis Munuera, sin cuya ayuda y empuje inicial hubiera sido imposible la realización de este trabajo. Su constante apoyo fue fundamental para el buen término de la obra. Sus enseñanzas de metodología y lógica fueron claves en este trabajo.

A la Dra. M^a Eugenia Martínez, gran conocedora de los entresijos de la vitamina D, cuyos sabios consejos y dirección me ayudaron a no cometer más de un error, y por su gran ayuda en el diseño experimental.

Al Dr. Enrique de Miguel, jefe del servicio de cirugía experimental del hospital "la Paz", por su constante estímulo para la terminación de esta obra. A Ignacio Alvarez, veterinario del mismo servicio, por sus sabias recomendaciones en el manejo de las ratas. Y, en general, a todo el personal del servicio de cirugía experimental, por su constante apoyo. En particular a M^a Dolores y a Ernesto, que tantas tardes pasaron conmigo y mis ratas.

A D^a M^a Teresa Carrascal, D. Mariano Rodríguez-Avial y Mariano Molero, de la Universidad Nacional de educación a distancia (UNED), sin cuya colaboración y decidido apoyo hubiera sido imposible la realización de la prueba mecánica.

Al Dr. Manuel Díaz-Curiel y a Jesús Calero, de la Fundación Jiménez-Díaz, por su colaboración imprescindible para la ejecución de las densitometrías, así como por sus recomendaciones sobre el manuscrito final.

Al Dr. Fernando López-Barea, del servicio de anatomía patológica del hospital "la Paz", por su colaboración en la realización y diseño de las pruebas histológicas, así como al Dr. Santamaría, del departamento de morfología de la UAM, por su colaboración en la realización de la planimetría.

A Antonio García, por su inestimable ayuda en los momentos iniciales de este trabajo, así como en el soporte informático para la escritura de esta obra.

A Paloma Bustos y María Eros, técnicos del servicio de bioquímica clínica, por su

colaboración en el análisis de las muestras de sangre.

A mi mujer, M^a Dolores, por su infinita comprensión cuidando por mí a nuestra hija, Cristina (algo bastante agotador, por cierto), durante las largas horas que pasé trabajando en esta tesis.

A mi familia

Mis padres y hermano,

Mi mujer y mi hija

INDICE

	<u>Página</u>
<u>INTRODUCCION</u>	4
A) Aspectos Básicos	
1.- Metabolismo del Calcio	5
1.1.- La vitamina D.....	6
1.2.- Otras hormonas: PTH, Calcitonina	8
2.- Biología celular del hueso	10
2.1.- Estructura y composición.....	10
2.2.- Remodelamiento óseo.....	11
3.- Aspectos biomecánicos básicos del hueso.....	13
B) Osteoporosis	
1.- Concepto. Importancia. Tipos.....	17
2.- Histopatología de la osteoporosis involutiva.....	20
3.- Densitometría	21
4.- Fracturas osteoporóticas y características de las caídas.....	22
5.- Osteoporosis y osteomalacia	22
6.- Osteoporosis senil y vitamina D	23
7.- Tratamiento y prevención.....	25
8.- La rata como modelo para el estudio de la osteoporosis	29
C) Fracturas	
1.- Consolidación de las fracturas	31
1.1.- Fenómenos que modifican la consolidación	35
2.- Métodos de valoración del callo:	38
2.1.- Biomecánicos.....	38
2.2.- Histológicos	40
2.3.- Densitométricos	42
2.4.- Otros.....	43
3.- Vitamina D y consolidación de fracturas.....	45
<u>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</u>	47

	<u>Página</u>
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	50
1°.- Animales de experimentación y grupos	51
2°.- Fractura experimental	54
3°.- Sacrificio y conservación	56
4°.- Análisis bioquímico	56
5°.- Histología	57
6°.- Densitometría	59
7°.- Prueba mecánica	60
8°.- Métodos de análisis estadístico	61
9°.- Fotos	63
<u>RESULTADOS</u>	68
1°.- En relación con la puesta a punto del modelo experimental	70
a) pauta de suplementación de calcidiol	
b) reproducibilidad del método de torsión	
2°.- Trazo de fractura obtenido	71
3°.- Análisis bioquímico	71
4°.- Histología	79
5°.- Densitometría	84
6°.- Prueba mecánica	93
<u>DISCUSION</u>	99
1°.- Sobre la técnica experimental:	
1.1.- Animales de experimentación y grupos	100
1.2.- Fractura experimental	104
1.3.- Conservación de los huesos	106

	<u>Página</u>
2°.- Bioquímica:	
2.1.- Comparaciones por grupos: 25-OH-D; 1,25 (OH) ₂ -D; PTH.....	107
2.2.- Correlaciones entre las 3 medidas.....	110
3°.- Histología:	
3.1.- Método histomorfométrico y planimétrico	110
3.2.- Resultados de la medición del osteoide	111
3.3.- Resultados planimetría	112
4°.- Densitometría:	
4.1.- Método densitométrico.....	114
4.2.- Fémures: comparaciones por grupos	115
4.3.- Tibias: comparaciones por grupos	116
4.4.- Correlación en la densitometría fémures-tibias y por zonas.....	117
4.5.- Correlación de tibias y fémures con los resultados bioquímicos	118
5°.- Prueba mecánica:	
5.1.- Método de torsión.....	119
5.2.- Fémures: comparaciones por grupos	122
5.3.- Tibias: comparaciones por grupos	125
5.4.- Correlación fémures-tibias (par)	125
5.5.- Correlación de la resistencia de las tibias con la bioquímica	126
5.6.- Correlación de la resistencia de los fémures con la bioquímica.....	127
5.7.- Correlación resistencia mecánica-densitometría en fémures y tibias.....	130
<u>CONCLUSIONES</u>	132
<u>RESUMEN</u>	135
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	138

INTRODUCCION

A) ASPECTOS BASICOS

A.1) Metabolismo del calcio

El calcio es el catión divalente más abundante en el organismo, representando un 2% del peso corporal, aproximadamente unos 1000 gramos¹²⁸. Se distribuye en varios compartimentos. En el compartimento óseo se encuentra el 99% del calcio del organismo, en forma de hidroxapatita¹²⁵.

La importancia biológica del calcio deriva de que las sales cálcicas proporcionan la integridad estructural del esqueleto, al ser el principal componente mineral del hueso. Sin embargo, también juega un papel crítico en otros procesos bioquímicos, tales como la excitabilidad neuromuscular, la coagulación sanguínea, la permeabilidad de la membrana celular o el desencadenamiento de reacciones enzimáticas¹²⁵. La relevancia de todas estas funciones requiere que las concentraciones intra y extracelulares se mantengan dentro de unos márgenes muy estrictos, lo que se consigue mediante un control intracelular⁹³ y hormonal¹²⁵.

El calcio sérico se encuentra de 3 formas diferentes: iónica o libre (50%), unido a proteínas, sobre todo albúmina (40%), o unida a aniones (10%)¹²⁸. La fracción iónica es la única con acción biológica.

En el intestino, el calcio se absorbe por dos mecanismos: a) un transporte activo saturable dependiente de la vitamina D, localizado fundamentalmente en duodeno y yeyuno, que predomina cuando la ingesta cálcica es baja; b) transporte difusible no saturable, sobre todo en íleon, que predomina cuando la ingesta es elevada¹²⁵. El principal regulador de la absorción intestinal de calcio es el calcitriol (1,25 (OH)₂ vitamina D).¹²⁵

En el hueso se encuentra la reserva de calcio del organismo. Los procesos de resorción y neoformación ósea implican un intercambio continuo de calcio, cifrados en 2000-4000 mg/día¹²⁵. La acción de las hormonas calciotrópicas a nivel óseo es compleja y no se ha dilucidado por completo la secuencia de estas acciones. Así, la PTH produce aumento de la

resorción ósea, pero sólo tiene receptores a nivel de los osteoblastos²¹⁰. La calcitonina tiene acción inhibitoria sobre los osteoclastos³⁹, y el calcitriol presenta receptores en los osteoblastos, aumentando su actividad, pero también estimula la diferenciación de los osteoclastos¹⁶³.

El riñón es la vía principal de eliminación del calcio¹²⁵. Esta se regula por tres mecanismos²¹¹: filtración glomerular, reabsorción en el túbulo proximal y reabsorción en el túbulo distal. La reabsorción en zonas proximales de la nefrona no están bajo control hormonal, pero sí las distales¹⁴⁰. A este nivel, la PTH aumenta la reabsorción tubular de calcio³.

A.1.1) La vitamina D

La forma fisiológica activa de la vitamina D es la 1,25 (OH)₂ D₃²⁶. En el hombre, la vitamina D proviene de dos fuentes: la alimentaria (vitaminas D₂ y D₃) y la cutánea (vitamina D₃)¹²⁵, donde se sintetiza a partir de precursores (dehidrocolesterol⁹³) como respuesta a la exposición a la luz ultravioleta^{84,87}. Cuando la exposición solar es baja, especialmente en zonas urbanas, las necesidades de vitamina D del organismo dependen de la absorción intestinal de vitamina D contenida en los alimentos¹²⁵.

Una vez sintetizada o absorbida, la vitamina D es ligada a una proteína de alta afinidad y transportada hasta el hígado, donde es hidroxilada en el carbono 25⁸⁴. La 25 (OH) vitamina D o calcidiol es el metabolito de la vitamina D más abundante en sangre, siendo su vida media de aproximadamente 15 días^{18,125}. Su síntesis hepática depende fundamentalmente de la disponibilidad de vitamina D, y así la administración de grandes dosis de vitamina D da lugar a una elevación progresiva de los niveles circulantes de 25 (OH) vitamina D¹⁸. Por lo tanto, los niveles plasmáticos de 25 (OH) vitamina D son el mejor reflejo de las reservas de vitamina D del organismo^{18,125}.

Posteriormente, la 25 (OH) vitamina D es transportada al riñón, donde se hidroxilará de nuevo, bien en el carbono 1, dando lugar a la 1,25 (OH)₂ D o calcitriol (verdadera hormona), o en el carbono 24, dando lugar a la 24,25 (OH)₂ vitamina D, compuesto de significado biológico incierto^{45,125}. El calcitriol inhibe la actividad de la 25 hidroxilasa hepática, por lo que la

administración de éste descende los niveles de calcidiol^{84,125}.

La síntesis de calcitriol (1-alfa hidroxilasa renal) está estimulada por varios factores^{45,84}, siendo los principales la PTH, la hipofosforemia, la ingesta baja de calcio y fósforo, y, por último, los propios niveles séricos de calcidiol (a más sustrato, más síntesis) y de calcitriol (cuanto más bajos, más síntesis)^{83,84,125}. En adultos, la actividad de la 1-alfa hidroxilasa renal y la síntesis de calcitriol está fuertemente regulada por el producto final de la reacción, el calcitriol⁷⁸. Así, la administración de vitamina D o de calcidiol prácticamente no modifica los niveles séricos de calcitriol. El calcitriol, por otro lado, no sólo inhibe la actividad 1-alfa hidroxilasa renal, sino que también estimula a la 24 hidroxilasa renal^{78,125}.

La acción fundamental de la vitamina D, tanto en el hombre como en la rata⁸⁴, consiste en la homeostasis del calcio¹²⁵, aunque también se le ha implicado en otras acciones biológicas todavía mal definidas, como las de factor de diferenciación celular¹ e inmunorregulador²⁰⁴.

En el intestino es donde el calcitriol efectúa su acción más importante: estimula la absorción activa de calcio¹²⁹ por parte de las células epiteliales, aumentando la absorción en los segmentos proximales del intestino, y reclutando además para dicha función a segmentos intestinales distales. Además, el calcitriol es el mediador de la absorción intestinal de calcio inducida por la PTH¹²⁵.

En el riñón, la vitamina D favorece indirectamente la excreción urinaria de calcio al aumentar la carga filtrada de calcio¹²⁵.

En el hueso, el calcitriol contribuye a su crecimiento y mineralización¹¹⁹, al favorecer la absorción intestinal de calcio y fósforo e inhibir la síntesis de PTH. Los osteoblastos poseen receptores para el calcitriol, aumentando éste la actividad osteoblástica y la síntesis de proteínas de estas células¹²⁵. El calcitriol posee también actividad resorptiva ósea¹¹⁷, pero no por estimulación directa de los osteoclastos (ya que éstos no tienen receptores) sino porque inducen la diferenciación y proliferación de los precursores de los osteoclastos¹⁷⁶.

A.1.2) Otras hormonas: PTH, Calcitonina

Aunque muchas hormonas aparte de la vitamina D pueden estar implicadas en el metabolismo fosfocálcico, para la PTH y la calcitonina, ésta constituye su principal función, por lo que se las denomina, junto con la vitamina D, hormonas calciotropas¹²⁵.

PTH

La paratohormona (PTH) es una hormona peptídica de 84 aminoácidos, segregada por las glándulas paratiroides¹⁸². El principal regulador de la síntesis y secreción de PTH es la concentración plasmática de calcio^{10,190}. La hipocalcemia estimula la secreción de PTH, mientras que la hipercalcemia la inhibe. La relación entre las concentraciones plasmáticas de PTH y calcio es de tipo sigmoideo, de forma que dentro de unos límites muy estrechos de concentración de calcio (9-10 mg/dl) es donde se produce la mayor variación en los niveles de PTH²⁷.

Una vez secretado¹⁹⁰, el péptido es escindido periféricamente, en el hígado, en 2 fragmentos. El fragmento N-terminal (34 aminoácidos) es el que posee actividad biológica, y, además, es el que tiene vida media más corta, por lo que sus niveles séricos son inferiores.

Las acciones de la PTH son: en el riñón, aumenta la excreción de fósforo, sodio, bicarbonato y aminoácidos, disminuyendo la eliminación de calcio y magnesio⁶². Asimismo, estimula la síntesis de calcitriol a partir de su precursor, el calcidiol¹⁹⁵ (1-alfa hidroxilasa). También produce un aumento en la reabsorción tubular de calcio, pero esto está contrarrestado por el incremento en la carga filtrada de calcio que se produce al aumentar la calcemia¹²⁵.

A nivel óseo⁶², se ha comprobado que tras la administración de PTH se produce una movilización del calcio óseo. Esta respuesta rápida no se acompaña de liberación de hidroxiprolina ósea, indicando que hay una liberación del contenido mineral del hueso pero sin destrucción de la matriz¹²⁵. Sin embargo, tras la administración prolongada (superior a 12 horas) sí se produce la disolución de la matriz ósea (aumenta la liberación de hidroxiprolina). Las bases

celulares de este proceso más lento parecen estar en la formación de nuevos osteoclastos¹²⁵. Por otro lado, y debido al acoplamiento existente en el proceso de remodelación ósea entre los procesos formadores y destructores de hueso, esta inducción en la formación de nuevos osteoclastos producirá, a largo plazo, un incremento en la función osteoblástica¹⁹⁷. La PTH, pues, tiene un efecto doble a nivel óseo según las dosis y duración de su administración⁶². Dosis elevadas estimulan la resorción ósea y la liberación de calcio, inhibiendo la formación de la matriz ósea y la mineralización del hueso. En contraste, el tratamiento crónico con dosis bajas favorece la formación de hueso¹²⁵. La importancia fisiológica del efecto anabólico de la PTH se encuentra en investigación.

Estudios sobre receptores específicos de PTH en células óseas han permitido establecer que el osteoblasto es la principal célula diana de la PTH⁶², y que algún producto resultante de esta acción hormonal sobre los osteoblastos podría funcionar como mensajero local que modificaría la actividad osteoclástica^{62,125,174}. El resultado de estos eventos es la elevación de la actividad osteoclástica.

Calcitonina

Es un polipéptido de 32 aminoácidos sintetizado en las células parafoliculares del tiroides⁴⁹. El estímulo primario de la síntesis y secreción es el aumento de calcio iónico, siendo la tasa de secreción de calcitonina una función directa de la concentración de calcio cuando éste supera los 9 mg/dl¹²⁵. La vida media de la calcitonina humana es de 10 minutos. El principal lugar de aclaramiento y metabolismo es el riñón¹²⁵.

A nivel óseo, inhibe la resorción osteoclástica⁴⁶, tanto de la matriz ósea como de la fase mineral del hueso, demostrado por una disminución de los niveles séricos de calcio y la excreción de hidroxiprolina. La disminución del calcio sérico por efecto de la calcitonina depende principalmente de la tasa de resorción ósea preexistente¹²⁵, a mayor resorción, mayor efecto (pacientes jóvenes, Paget, hiperparatiroidismo primario, etc.).

Sin embargo, la exposición crónica a la calcitonina produce un descenso de la actividad

osteoblástica, debido al acoplamiento del remodelamiento óseo¹²⁵. También se produce a la larga una autorregulación de los receptores de calcitonina, perdiéndose su efecto hipocalcemiante.

A nivel renal, produce un aumento transitorio de la excreción de calcio, que posteriormente se normaliza por el descenso de la calcemia.

A.2) **Biología celular del hueso**

A.2.1) Estructura y composición

El hueso, como los otros tejidos musculoesqueléticos, consta de células de origen mesenquimal dentro de una abundante matriz extracelular²⁹. Las células óseas (osteoblasto, osteocito) proceden de células mesenquimales indiferenciadas, que son capaces, bajo estímulos adecuados, de diferenciarse a osteoblastos, condroblastos o fibroblastos¹²⁴. Estas células indiferenciadas se localizan fundamentalmente en el tejido conectivo perivascular, la capa interna del periostio y la médula ósea, aunque también pueden hallarse en otras zonas⁷⁵.

Las células que hallamos en el hueso son⁷⁵: a) Osteoblastos: son capaces de producir el colágeno que forma la matriz desmineralizada del hueso (osteóide), así como promover su mineralización; b) Osteocitos: cuando el osteoblasto se rodea totalmente de osteóide, se convierte en el osteocito, responsable del mantenimiento del hueso a través del intercambio de iones entre la matriz ósea y el espacio extracelular; c) Osteoclastos: son células derivadas del sistema mononuclear fagocítico, y principales responsables de la resorción de hueso.

La matriz extracelular está compuesta (entre otros) por dos elementos muy importantes: uno es fibroso, el colágeno. Es del tipo I sobre todo⁷⁵, y es el que proporciona al hueso su resistencia a la tracción²⁸. El otro es el componente mineral, formado por hidroxapatita⁷⁵, y proporciona la resistencia a la compresión²⁸.

El tejido óseo se clasifica, según la organización de sus fibras de colágeno, en maduro (o laminillar) e inmaduro⁷⁵. En el tejido inmaduro, las fibras de colágeno se disponen de forma

irregular, mientras que en el maduro lo hacen en forma de hojas ordenadas. Debido a esta desorientación de las fibras en el tejido inmaduro, éste es menos rígido y más deformable que el maduro²⁸. El tejido inmaduro aparece en zonas de crecimiento óseo rápido, como el hueso primitivo del embrión, el callo de fractura, el triángulo de Codman y el hueso tumoral⁷⁵. El tejido maduro se forma en zonas de crecimiento más lento, como en el remodelamiento óseo adulto²⁸.

Según la organización microscópica y macroscópica, el tejido óseo se divide en compacto (o cortical) y esponjoso. El primero es un hueso denso con una mínima cantidad de tejido blando interpuesto. El esponjoso está compuesto de láminas y espículas de hueso con gran cantidad de partes blandas (médula ósea) en los espacios entre ellas⁷⁵.

A.2.2) El remodelamiento óseo.

El tejido óseo es uno de los más dinámicos del organismo, estando sometido a continua regeneración¹⁸³. Este proceso se conoce como remodelamiento^{75,93,154}. Al volumen de hueso preexistente que es cambiado por hueso nuevo por unidad de tiempo se denomina recambio óseo o turnover¹⁸³.

El remodelamiento óseo incluye una serie de fases consecutivas: 1) Iniciación. Consiste en la generación de un impulso que altera el estado de una superficie ósea, reduciendo su umbral para la activación¹⁵⁴. 2) Activación. Implica la provocación de las respuestas celulares más precoces al estímulo desencadenante¹⁵⁴. En general, se desconoce por qué la activación tiene lugar en una localización especial y en un momento determinado¹⁵². 3) Resorción. En esta fase se produce la eliminación de la matriz mineral y orgánica, mediada por osteoclastos^{154,183}. Se forman unas cavidades, llamadas lagunas de Howship en el hueso trabecular y cono penetrante en el hueso cortical^{75,152}. 4) Inversión. Implica la finalización de los procesos resortivos y preparación del sistema osteoblástico¹⁵⁴. Este acoplamiento entre la resorción-formación parece ser intrínseco al hueso, sometido a regulación local y automático, de forma que una vez iniciada la activación, el proceso se completa totalmente¹⁵². 5) Formación. Se produce la reparación osteoblástica de la cavidad de resorción¹⁵⁴. Los osteoblastos presentan, en

general, una morfología más gruesa, debido a un mayor grado de actividad en esta fase¹⁸³. Primero se realiza la síntesis de la matriz ósea no mineralizada u osteoide¹⁸³, y posteriormente se lleva a cabo la mineralización de esta matriz¹⁵².

Los elementos operativos de este sistema son fundamentalmente las células óseas (osteoblastos y osteoclastos), pero también participan las células del compartimento medular óseo y sistema regulador inmune, que actúan no sólo como progenitores de la célula ósea, sino también como reguladores del proceso de remodelación¹⁵⁴. Al conjunto de células que actúan en coordinación para completar un ciclo de remodelación se le da el nombre de unidad de remodelado óseo^{93,152,183}.

La duración media de un ciclo de remodelación constituye una unidad de tiempo natural del esqueleto, ya que expresa el tiempo mínimo necesario para establecer una respuesta evidente a cualquier cambio en el índice de activación o en la función de la célula diferenciada¹⁵². La duración media en el hombre de este ciclo es de 4 meses¹⁸³, mientras que en la rata es de 24 días¹⁰⁸.

El acoplamiento entre la resorción y formación es el que mantiene la masa ósea constante¹⁵⁴. La reducción gradual, progresiva de masa ósea en la vejez, es la suma de ligeras pérdidas a corto plazo en numerosos puntos de remodelación¹⁵². Esta pérdida progresiva es un fenómeno universal de la biología humana, produciéndose independientemente del sexo, raza, ocupación, actividad física, hábitos dietéticos, desarrollo económico, localización geográfica o época histórica. Se pierde hueso a partir de las superficies endósticas en contacto con la médula ósea, ya que la superficie perióstica sigue ganando hueso lentamente, a lo largo de toda la vida¹⁵². El resultado global de ambos procesos es un aumento del diámetro óseo en la vejez¹³². Este fenómeno también se ha comprobado en ratas¹⁰⁸.

El máximo de masa ósea adulta se alcanza a la edad de 35-40 años para el hueso cortical, y probablemente antes para el hueso trabecular¹³². Además, este máximo de masa ósea es alrededor de un 25-30% superior en hombres respecto a las mujeres¹⁵². Después de terminar el crecimiento, no existe ningún mecanismo para la estimulación "de novo" de la formación de

hueso laminillar sin un episodio precedente de resorción ósea¹⁵². En la rata, el pico máximo se alcanza a los 12 meses^{108,181}.

A.3) Aspectos biomecánicos básicos del hueso

Cuando se aplica una carga a un objeto de geometría uniforme, se desarrollan una serie de tensiones en el interior del material. La tensión (Stress) se suele expresar como fuerza (F) por unidad de superficie (A)(F/A), para evitar la variación de este parámetro en función del tamaño de la muestra. La tensión puede ser perpendicular a la sección de la muestra, definiéndose entonces como tensión normal¹³². La tensión normal puede producirse a tracción o compresión. Cuando esta tensión no es perpendicular sino paralela a la sección de la muestra, se denomina tensión cizallante o cortante²⁰⁵, y se produce cuando una parte de la muestra tiende a deslizarse sobre la otra. La tensión se expresa, en el sistema internacional de medidas, en Pascales (N/m²)²⁰⁵.

Como consecuencia de la fuerza que se aplica a la muestra, ésta se deforma. La deformación (Strain) se expresa como el porcentaje de cambio de longitud de la muestra tras someterla a una tensión dada. Las unidades que emplea son el % o el tanto por uno. Cuando un material se deforma en longitud, también cambia su anchura. La relación entre la deformidad en longitud respecto a la deformidad en anchura se denomina módulo de Poisson²⁰⁵. Un módulo de Poisson de 0.45 significa que una deformación de un 1% en longitud, producirá una deformación de un 0.45% en anchura.

La relación entre la tensión aplicada a una muestra y la deformación resultante, produce la llamada curva tensión-deformación (Figura 1).

La curva se puede dividir en dos regiones: la primera, de deformación elástica, y la segunda, de deformación plástica, separadas por el llamado punto de transición (yield point). En la zona elástica, el hueso se comporta como un muelle: la deformación se incrementa de forma lineal al aumentar la fuerza, y, al cesar ésta, el hueso recupera su

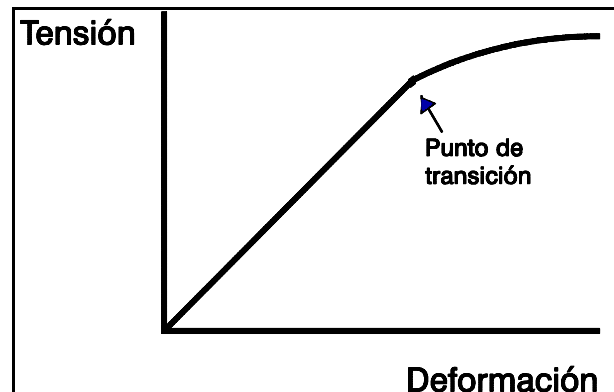


Figura 1

forma original. De todas formas, este es el comportamiento ideal del hueso, pero en realidad, éste nunca se comporta como un muelle perfecto. Hay efectos viscosos durante la deformación, por la existencia de fluidos en la matriz ósea, que hacen que cierta energía se pierda, con lo que la pieza no vuelve totalmente a su forma original. De todas formas, es una aproximación válida²⁰⁵. La pendiente (tangente del ángulo) de la curva en esta zona elástica representa la rigidez de la estructura, y se denomina módulo elástico o de Young.

Tras esta zona elástica se produce la transición en un punto donde se empieza a producir un daño estructural permanente al hueso⁹³, comenzando en este momento la zona plástica. Cuando se experimenta con hueso, este punto de transición pocas veces está claramente definido²⁰⁵. En esta zona plástica, la deformación producida en el hueso ya no se recupera tras cesar la fuerza. La deformación producida en esta zona es una medida de la ductilidad del material (cuanto menos dúctil, más quebradizo)²⁰⁵. Al final de la zona plástica se llega a la tensión de rotura, donde el hueso se fractura²⁰⁵. La tensión máxima soportada coincide con la tensión de rotura cuando se experimenta con hueso²⁰⁵.

El área debajo de la curva es una medida de la cantidad de energía necesaria para producir la fractura. Se denomina energía absorbida, y a mayor valor, más resistencia presenta el hueso a fracturarse. Se sabe que a medida que aumenta la edad, disminuye la energía necesaria para fracturar al hueso³³.

Es importante destacar la diferencia entre la resistencia del tejido óseo, que es

independiente del tamaño de la muestra, y de la fuerza requerida para romper un hueso determinado, que depende no sólo de la resistencia del tejido óseo, sino también de su forma y tamaño²⁰⁵.

Se ha demostrado que la tensión de rotura de un hueso depende fundamentalmente del contenido mineral de éste, mientras que la rigidez (pendiente de la zona elástica de la curva) depende fundamentalmente del colágeno del hueso³¹.

Cuando el hueso es cargado repetidamente en la zona elástica de la curva, sus características mecánicas se deterioran con el tiempo. Este fenómeno se denomina fatiga, y se atribuye a la presencia de microfracturas que se van acumulando. Sin embargo, el hueso es una estructura viva, que puede ir reparando estas microfracturas, si se le proporciona el tiempo necesario²⁰⁵.

El hueso presenta mayor resistencia a la fuerza aplicada en determinadas direcciones respecto a otras, por lo que se dice que el hueso es un material anisótropo^{132,205}. Por eso siempre se debe especificar la dirección en que se aplicó la carga, así como el tipo de carga (compresión, tracción o cizalla). Así, para una carga longitudinal, el hueso cortical es más duro (absorbe más energía antes de romperse) bajo fuerzas de tracción que de compresión.

Se dice que el hueso presenta un comportamiento viscoelástico porque sus propiedades mecánicas dependen de la velocidad de la deformación, así como de la duración de las cargas aplicadas⁹³. Se ha indicado que el agua del hueso fluye a través de la estructura cuando el hueso es sometido a cargas. Este flujo es viscoso, con lo que se disipa una pequeña cantidad de energía¹⁰⁴. Cuando el hueso se seca, el componente viscoso desaparece, y se comporta de forma perfectamente elástica¹⁵³. Esta pequeña cantidad de energía absorbida (componente viscoso) varía proporcionalmente según la velocidad a la que es aplicada la carga, de forma que las propiedades mecánicas varían según las velocidades a las que se desarrolle el ensayo. Si la velocidad del ensayo se incrementa en una magnitud dada, la resistencia del hueso se incrementará proporcionalmente³⁴. Por esta razón, la velocidad del ensayo debe ser muy controlada.

Se han investigado muchos parámetros del hueso (densidad ósea aparente, peso de las cenizas, histología, colágeno, etc.) para saber si a partir de ellos se podrían deducir sus características mecánicas. Esto ha resultado difícil de demostrar, ya que los rangos de fuerza aplicados al hueso son muy pequeños⁹³. Sí se ha demostrado que la densidad ósea aparente y la arquitectura del hueso son los factores que mejor correlacionan con las propiedades mecánicas del mismo (módulo de elasticidad y tensión de rotura)⁹³.

Con la edad se van deteriorando las características mecánicas del hueso. Se ha indicado una disminución del 7% en la energía necesaria para la fractura por década de envejecimiento⁹³. Esto se atribuye a la disminución de la densidad ósea aparente, así como al deterioro de la microarquitectura ósea⁹³.

B) OSTEOPOROSIS

B.1.1) Concepto

La osteoporosis puede ser definida de formas diferentes según la aproximación que se haga al problema. Desde un punto de vista genérico, se trata de la disminución de la masa ósea de un individuo por debajo de la que correspondería a la de individuos de igual sexo y edad⁴⁷, lo que nos permite distinguir lo que es la patología de la pérdida "fisiológica" de hueso con la edad. Si aceptamos un enfoque más clínico, podemos definirla como una pérdida generalizada de masa ósea que produce una fragilidad de los huesos del esqueleto, que se fracturan ante traumatismos banales⁴⁶. Desde una visión fisiopatológica entendemos la osteoporosis como una pérdida cuantitativa de hueso, sin alteración en su composición. Esta definición nos permite distinguirla de la osteomalacia^{46,47}. Una definición más pragmática es aquella que la entiende como el nivel de masa ósea en el cual el tratamiento produce más beneficio que el no tratamiento¹⁸⁶.

Todas estas dificultades definitorias se ponen de manifiesto a la hora de emitir el diagnóstico de osteoporosis ante un paciente concreto. La clínica suele ser inespecífica, y los métodos de radiología simple son muy poco sensibles. El laboratorio sólo sirve para excluir enfermedades que pueden manifestarse con osteoporosis, tales como el mieloma o el hiperparatiroidismo primario. La biopsia ósea, un método muy útil, es invasivo y no está justificada su aplicación indiscriminada⁴⁷. Sin embargo, con el advenimiento de las técnicas densitométricas, podemos medir la cantidad de hueso de una forma sencilla, lo que ha facilitado enormemente el diagnóstico^{46,47}.

Desde el punto de vista poblacional, el diagnóstico es más simple, en tanto que globaliza resultados y no compromete con la toma de decisiones ante un paciente concreto. Así, los estudios densitométricos o de prevalencia e incidencia de fracturas osteoporóticas son métodos válidos para aproximarse a una cuantificación del síndrome respecto a una población⁴⁷.

En 1993 tuvo lugar una conferencia internacional donde se consensó una definición

para la osteoporosis: "es una enfermedad sistémica del esqueleto caracterizada por escasa masa ósea y deterioro microarquitectónico del tejido óseo, con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y de su susceptibilidad a la fractura"¹⁵⁵.

B.1.2) **Importancia**

La osteoporosis es uno de los principales factores de riesgo en la génesis de fracturas, provocando una importante morbilidad y mortalidad, con un gran impacto sociosanitario.

Como datos generales, se estima que el 70% de todas las fracturas por encima de los 45 años se asocian a osteoporosis, aunque no sea ésta la única circunstancia implicada⁴⁶. En los Estados Unidos, se calcula que predispone a la producción de unas 500.000 fracturas de columna, 250.000 de cadera y 240.000 de muñeca anuales¹⁵⁵, costando a la nación más de 10 millones de dólares anuales.

La fractura de cadera es la más devastadora manifestación de la osteoporosis. Entre un 5 y un 20% de las personas que la padecen fallecen al cabo de un año, y más de un 50% de las que sobreviven quedarán incapacitadas, muchas de ellas permanentemente^{107,155}. Además, recientemente se ha indicado¹⁶ que la existencia de osteoporosis implica un peor pronóstico en cuanto al tratamiento de la fractura de cadera, con un mayor índice de fallo del implante en fracturas inestables de cadera.

Puesto que las personas de edad avanzada son las que padecen mayor riesgo de fracturas osteoporóticas, el envejecimiento progresivo de la población mundial predice un aumento importante del peso global de la osteoporosis. Sólomente la mayor esperanza de vida podría aumentar tres veces más la incidencia mundial de fracturas en los próximos 60 años¹⁵⁵.

B.1.3) **Tipos**

La osteoporosis se cataloga como primaria o secundaria, según la presencia o no de enfermedades con relación conocida con la osteoporosis. Aunque esta primera aproximación es

útil, puede resultar engañosa, ya que sugiere la existencia de dos tipos de osteoporosis excluyentes entre sí, y esto no es cierto¹³¹.

La osteoporosis secundaria puede estar relacionada con una larga lista de enfermedades, tales como el hipercortisonismo, hipogonadismo, hipertiroidismo, diabetes mellitus, hiperparatiroidismo, fármacos anticonvulsivantes, gastrectomía, síndromes de malabsorción, artritis reumatoide, enfermedades del tejido conjuntivo, enfermedades neurológicas crónicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o procesos malignos^{46,131}.

La osteoporosis primaria se suele dividir en dos grupos: idiopática e involutiva. La idiopática incluye formas poco frecuentes de osteoporosis primaria encontradas en niños y adultos jóvenes. La involutiva es la forma más habitual, iniciándose en la edad media de la vida y haciéndose más frecuente a mayor edad.

Riggs y Melton¹⁷⁰ caracterizaron dos tipos fundamentales de osteoporosis involutiva:

a) Tipo I, o postmenopáusica: afecta a mujeres, entre los 15-20 años tras la menopausia. La fractura vertebral es la principal manifestación clínica, pero también son frecuentes las fracturas de Colles en la muñeca, así como la pérdida de piezas dentarias por pérdida de hueso alveolar en la mandíbula. Estos tres huesos contienen una gran cantidad de hueso trabecular, y en estos pacientes, la pérdida de hueso trabecular es tres veces mayor que en personas normales¹⁷⁸. Se ha propuesto que esta pérdida ósea debido al déficit estrogénico provocaría una disminución de la secreción de PTH, lo que conduce a una disminución de la producción de calcitriol⁶⁸. Esto hace disminuir la absorción de calcio y se potencia la pérdida ósea. En este tipo de osteoporosis hay un aumento de la actividad ósea (osteoporosis acelerada o de alto remodelado)⁴⁶. La predilección por el sexo femenino y la proximidad a la menopausia sugieren que el déficit estrogénico es el agente etiológico fundamental. De todas formas, sólo un subgrupo relativamente pequeño de mujeres postmenopáusicas presentan esta forma de osteoporosis¹⁷⁰.

b) Tipo II, o senil: se refiere a la osteoporosis que aparece en varones y mujeres de 75 o

más años de edad. Se manifiesta fundamentalmente por fracturas de cadera y fracturas vertebrales en cuña (compresión anterior), si bien pueden producirse también fracturas en el húmero proximal, tibia proximal y pelvis¹³¹. Este tipo de osteoporosis se caracteriza por la existencia de pérdidas proporcionales, tanto de hueso trabecular como cortical. En su fisiopatología parecen implicados un descenso de la formación de hueso por envejecimiento celular, así como una alteración del metabolismo de la vitamina D que implica una disminución de la absorción de calcio, con hiperparatiroidismo secundario, que potencia la pérdida ósea^{131,186}. Es un tipo de osteoporosis de bajo remodelado⁴⁶. La masa ósea en estos pacientes ancianos es inferior a la esperada por tres factores: a) la masa ósea alcanzada durante el crecimiento y el desarrollo es inferior a la normal^{46,47}; b) pérdida acelerada de masa ósea¹³¹; c) factores adicionales de tipo médico, iatrogénico o ambiental que aceleran la pérdida de masa ósea^{47,93}.

Los dos tipos de osteoporosis están, pues, asociados a una baja absorción de calcio. Sin embargo, los mecanismos que lo producen son distintos. En el tipo I, los mecanismos que producen la pérdida de hueso conducen indirectamente a una disminución de la absorción de calcio. En estos pacientes, la administración de calcio tendría poco efecto beneficioso directo. En el tipo II, sin embargo, la disminución de masa ósea es el resultado directo de la disminución en la absorción de calcio. En este caso, se puede esperar que aumentando la absorción de calcio se revierta el problema¹⁸⁶.

B.2) Histopatología de la osteoporosis involutiva

La histología de la osteoporosis se basa en la cuantificación de la masa ósea. Se considera patológico cuando el volumen trabecular es inferior en dos desviaciones estándar o más a la media de individuos sanos de la misma edad y sexo⁴⁷. Sin embargo, esta definición no contempla las alteraciones en la arquitectura y recambio óseos, que también contribuyen, desde un punto de vista histológico, a la aparición de fracturas⁴⁷.

a) *Arquitectura*: En la osteoporosis, en cada ciclo de remodelado el volumen de hueso reabsorbido supera al de hueso formado^{47,152}.

A nivel trabecular, este balance óseo negativo es consecuencia de que: a) aumenta el volumen de hueso reabsorbido, con lo que las trabéculas se perforan y disminuyen en número, alterando la resistencia mecánica del hueso; b) disminuye el volumen de hueso formado. La disminución del volumen trabecular se correlaciona con la aparición de fracturas vertebrales. El número de trabéculas disminuye¹⁵². Las que quedan pueden ser de mayor grosor, bien porque son menos susceptibles a la destrucción, o bien porque aumentan las sollicitaciones mecánicas sobre las mismas y aumentan de grosor⁴⁷.

A nivel cortical, los osteoclastos excavan la vertiente interna, que no puede ser rellenada por hueso, con lo que esta zona va adquiriendo características de hueso trabecular (trabeculación de la cortical)¹⁵². A su vez, aumenta la porosidad general de la cortical. Este aumento de porosidad, junto con la disminución del tejido óseo cortical se correlacionan con la aparición de fracturas de cuello femoral⁴⁷.

b) *Recambio*: En la mujer, durante la menopausia, el recambio óseo está aumentado, y luego, con la edad, disminuye progresivamente (osteoporosis menopáusica y senil). Al disminuir el recambio, el tejido óseo, al no renovarse, acumula fatiga mecánica y, por consiguiente, es más frágil⁴⁷.

B.3) Densitometría

Uno de los avances más decisivos en los últimos años en el campo de la osteoporosis ha sido la introducción de la técnica de densitometría para la cuantificación del contenido mineral óseo⁴⁶.

La radiología simple es útil en la evaluación de la osteopenia, pero es muy poco preciso, ya que se necesita un descenso del 30% de la masa ósea para ser detectada^{46,93}.

Se han usado varios tipos de técnicas: a) densitometría fotónica simple, basada en la absorción de un haz fotónico; b) densitometría dual fotónica, basada en la absorción diferencial

de dos haces fotónicos de distinta energía; c) densitometría con rayos X de doble energía, similar a la anterior, pero con rayos X; d) tomografía axial computerizada cuantitativa. Actualmente, el método más usado es la densitometría con rayos X de doble energía, por su sencillez, fiabilidad y baja radiación para el paciente^{46,48,93,155}.

El valor predictivo del riesgo de fractura es el aspecto más conflictivo de estas técnicas, ya que hay una importante superposición entre las poblaciones con riesgo de fractura y los controles sanos en sus niveles de densidad mineral ósea⁴⁸. Aunque se considere que hay una importante relación entre la densidad mineral ósea y el riesgo de fractura, no es el único factor implicado^{48,186}.

B.4) Fracturas osteoporóticas y características de las caídas

Un factor muy importante, y que a menudo se olvida en la prevención de las fracturas osteoporóticas, es el hecho de la caída que produce la fractura. Se ha demostrado¹⁵⁷ que una modificación de 30° en la dirección de la energía aplicada a la cabeza del fémur hace que la carga máxima que éste es capaz de soportar varíe hasta en un 24%. Esta variación en la carga que es capaz de resistir la cabeza del fémur es similar a la que se produce, a un ángulo de carga dado, tras una disminución de un 16% de la densidad mineral ósea, equivalente a 23 años de pérdida de masa ósea.

Además, también se ha indicado que el traumatismo directo (caída estando de pie) sobre la cadera aumenta el riesgo de fractura hasta 20 veces, respecto a caídas en las que el traumatismo no ocurre de forma directa sobre este punto⁷⁹. La existencia de un tejido adiposo abundante en la zona de la cadera puede absorber parte de la energía de la caída, aumentando la energía necesaria para fracturar la cadera^{79,173}.

Con todo esto se confirma la gran importancia de las características del traumatismo, y no sólo de la densidad mineral ósea, en la génesis de las fracturas osteoporóticas.

B.5) Osteoporosis y osteomalacia

La osteomalacia consiste en una alteración de la mineralización de la matriz ósea (osteóide)⁹³ en el adulto, independientemente de la causa. Una de ellas es la deficiencia de vitamina D.

La diferencia fundamental con la osteoporosis, es que en ésta, no hay alteraciones en la mineralización del hueso. La única forma cierta de diferenciar ambas enfermedades es la biopsia ósea tras el marcaje en dos tiempos con tetraciclinas⁹³, demostrando un exceso de osteóide no mineralizado, así como una disminución de la velocidad de mineralización¹⁷⁵ en el caso de la osteomalacia.

B.6) Osteoporosis senil y vitamina D

Está ampliamente demostrado que los niveles de 25-OH-vitamina D disminuyen en más de un 50% con la edad^{14,49,68,71,80,88,100,146,148}, incluso en países más septentrionales (con mayor irradiación solar), como España^{161,162}. Esta disminución es más marcada en pacientes crónicos, ingresados en hospitales^{71,161}. Sin embargo, en algún estudio no se encuentra esta disminución con la edad¹⁸⁹, y esto parece debido a que en este estudio se midieron personas ancianas escrupulosamente sanas. Los mecanismos implicados en la disminución de la vitamina D con la edad podrían ser:

a) disminución de la ingesta dietética. Por lo general, las personas de edad no consumen la ración diaria recomendada de vitamina D⁴⁹.

b) disminución de la absorción de vitamina D. Se ha comprobado, mediante el uso de vitamina D marcada, una mayor absorción de la misma en personas jóvenes¹⁵.

c) disminución de la hidroxilación en el carbono 25 hepática. No está claro si efectivamente se produce una disminución de la actividad de la 25 hidroxilasa hepática o si, por el contrario, su actividad se encuentra aumentada debido al déficit relativo de su substrato, la vitamina D, en el anciano⁴⁹.

d) aumento del aclaramiento metabólico. Pero la vida media de la vitamina D marcada es similar en jóvenes y ancianos¹⁵, por lo que no parece un factor importante.

e) menor síntesis de vitamina D epidérmica. La exposición solar es menor en pacientes

ancianos que en jóvenes¹⁴², y aún menor en pacientes ingresados en hospitales⁴⁹. Se ha sugerido, también, que la síntesis dérmica está disminuida en la senectud¹¹⁶.

f) disminución de la proteína fijadora de vitamina D. Esta disminución puede ser la causa de modificaciones de los niveles de calcitriol en el embarazo (aumento) o en la cirrosis hepática (disminución). Sin embargo, las concentraciones de proteína fijadora de vitamina D no experimentan variación con la edad, por lo que no parece un factor significativo⁶⁵.

Se ha demostrado, además, que existe correlación entre los niveles de 25-OH-vitamina D y los valores de masa ósea en ancianos^{100,127}.

Los niveles de calcitriol (1-25-OH₂ vit.D) también parecen disminuir con la edad^{49,68,203}. Esto parece debido a una disminución de la actividad 1-hidroxilasa renal^{11,203}, disminución que es más marcada en pacientes con osteoporosis¹⁹⁴. Como consecuencia de esta disminución de calcitriol, también disminuye la absorción de calcio con la edad⁴⁹. Sin embargo, esta disminución del calcitriol con la edad no ha sido confirmada en todos los estudios¹⁶¹.

También se ha indicado una menor respuesta celular al calcitriol en la osteoporosis¹⁰¹ (pacientes con fracturas vertebrales), respecto a controles de la misma edad y sexo.

Con la edad, aumenta a su vez la PTH^{11,58,100,106,115,161} aumento que es mayor a menor nivel de 25-OH-vitamina D¹⁰⁰.

Se ha demostrado que los pacientes seniles con fractura de cadera, presentan unos niveles de vitamina D menores que controles sin fractura, de la misma edad y sexo^{105,209}. En 1993, realizamos en el hospital "La Paz" este estudio¹²⁶, encontrando diferencias estadísticamente significativas en los niveles de 25-OH-vitamina D entre pacientes seniles con fractura de cadera y pacientes seniles sin fractura. La PTH se encontró elevada en ambos grupos, sin diferencias valorables. Baker¹³, en Inglaterra, encontró resultados similares. Sin embargo, Hordon⁸⁸ no encontró disminución en la 25-OH-vitamina D en pacientes con fractura de cadera respecto a controles. Quizá este resultado dependa de que los controles sanos se seleccionaron en el medio hospitalario, donde los niveles de vitamina D son muy bajos.

Sin embargo, no siempre se ha demostrado existencia histológica de osteomalacia. En un total de 57 fracturas de fémur analizadas histológicamente en Barcelona⁴⁷, no se encontraron signos de osteomalacia en ningún caso. En Israel, sobre 95 pacientes con fractura de fémur, en ninguno se encontró evidencia histológica de osteomalacia⁵⁷. Otros autores la encuentran en un 12¹⁴⁵-30%⁹⁰ de pacientes con fractura de cadera.

No existe unanimidad en la literatura respecto a la existencia¹²⁶ o no^{88,115} de una disminución del calcitriol en pacientes con fractura de cadera respecto a controles de la misma edad.

La PTH se encuentra elevada en un 51.3% de pacientes con fractura de cadera³⁶, pero no hay diferencia con pacientes de la misma edad y sexo^{58,115,126}.

Por otro lado, la vitamina D tiene un efecto demostrado sobre el músculo²⁰, de forma que, cuando hay un déficit, hay debilidad muscular y mayor propensión a las caídas, lo cual puede ser reversible con el tratamiento¹³⁴. Esto hace que se produzcan un mayor número de fracturas en pacientes con déficit de vitamina D, independientemente de sus efectos a nivel óseo.

B.7) Tratamiento y prevención de la osteoporosis

Son numerosas los métodos usados en el tratamiento y prevención de la osteoporosis. Entre ellos, destacamos:

a) **Calcio**: En la fase inicial del tratamiento, los suplementos de calcio inhiben probablemente la resorción del hueso sin afectar a la formación ósea, bien disminuyendo la actividad osteoclástica o bien disminuyendo los niveles de PTH^{46,150}. Por ello mejoran el balance cálcico, pero esta mejoría persiste solamente durante un periodo de 3-6 meses⁷⁰. Posteriormente, se produce un descenso en la formación ósea, que reequilibra la resorción y formación ósea, pero disminuyendo la velocidad de remodelado. Esta disminución del

"turnover" tiende a reducir al mínimo cualquier desequilibrio entre resorción y formación, dando lugar a un balance cálcico cero o ligeramente negativo.

Se ha demostrado que un aumento en la ingesta de calcio disminuye el riesgo de fractura de cadera^{86,92}, aunque en menor proporción que otros medicamentos⁹². Se ha sugerido que se requiere una ingesta mínima diaria de 1000 a 1500 mg/día^{70,80,150,155}.

Shapira¹⁸⁸, en un estudio experimental en ratas, indicó que la ingesta de suplementos de calcio durante toda la vida de éstas, aumentaba la masa ósea del esqueleto axial.

b) **Estrógenos:** El tratamiento con estrógenos durante varios meses reduce la resorción de hueso, y tiende a aumentar pasajeramente el balance cálcico, que es compensado más adelante por una disminución de la formación de hueso^{70,82}. Son los agentes de elección en la prevención de la pérdida ósea postmenopáusica, puesto que son el único tratamiento que, sin lugar a dudas, reduce la tasa de fracturas¹⁵⁵. Se ha demostrado una menor tasa de fracturas vertebrales usando estrógenos y calcio que sólo calcio¹⁶⁹, así como una disminución en la tasa de fractura de cadera⁹².

El riesgo de cancer de mama¹⁸⁶ limita su uso, aunque este riesgo no haya sido todavía claramente establecido^{30,155,186}. También tiene un importante efecto protector frente a enfermedades cardiovasculares^{30,155}.

c) **Análogos de la vitamina D:** Son agentes capaces de aumentar la absorción de calcio y mejorar el balance cálcico⁷⁰. Además, parece ser que estimulan el "turnover" óseo.

Orimo¹⁴⁷, en un estudio reciente, randomizado y doble ciego, ha constatado un aumento de la masa ósea y una disminución en la incidencia de fracturas en un año con el uso de 1-alfa hidroxivitamina D y calcio, con tan sólo un 2,5% de hipercalcemias.

También se ha corroborado una disminución de la tasa de fracturas con el uso de calcidiol y calcio. Chapuy^{40,41}, en 1992, comprobó en ancianos que tras 18 meses de

tratamiento, el número de fracturas de cadera era un 43% menor, y el del resto de fracturas no vertebrales un 32% menor que en controles, disminuyendo también la PTH y aumentando la masa ósea un 2,7% (frente a un descenso del 4,6% en controles). En otro estudio⁸¹, se constató una disminución del 22 al 16% en el grupo tratado con una inyección anual de calcidiol (150000 U.I.), en un periodo de 3,5 años. Estos estudios enfatizan el hecho de que muchos pacientes ancianos tienen un déficit subclínico de vitamina D¹⁵⁰.

Sin embargo, dosis mayores de vitamina D pueden ser contraproducentes. Nordin¹⁴³ demostró que la dosis de 50.000 U.I. dos veces por semana durante 2 años producía una mayor incidencia de fracturas, y una disminución de la masa ósea.

Actualmente se recomienda la administración de 800 U.I./día de calcidiol a pacientes ancianos que no reciben una adecuada exposición solar^{80,186}.

Estudios usando suplementos de 24,25 (OH)₂ vitamina D en pacientes normales¹⁷² u osteoporóticos¹⁶⁴ no han demostrado efecto beneficioso.

El uso de calcitriol ha proporcionado resultados muy irregulares en la literatura, con trabajos a favor^{69,200} y en contra^{44,91} de su beneficio en la disminución de la tasa de fracturas y aumento de la masa ósea. Para explicar estas diferencias entre autores, se han invocado las diferencias en las dosis o la distinta muestra de población¹⁵⁰, por lo que es difícil sacar conclusiones ciertas sobre el efecto del calcitriol en la osteoporosis. Sin embargo, sí se ha demostrado que el calcitriol tiene efectos adversos serios, tales como hipercalcemia o nefrocalcinosis, cuando se administra a una dosis demasiado alta¹⁵⁰. Por ello, la dosis debe ajustarse siempre individualmente, en función de los niveles plasmáticos de calcio¹⁸.

En estudios experimentales en ratas^{187,188}, se ha postulado que la suplementación de vitamina D durante toda la vida de la rata aumenta la masa ósea de la columna vertebral. Además, la suplementación de metabolitos de la vitamina D es capaz de prevenir la pérdida ósea que se produce tras la ovariectomía experimental en ratas^{55,59}.

d) **Calcitonina:** Su uso se basa en su capacidad de disminuir la actividad osteoclástica⁴³. Existen varios tipos de calcitonina de uso clínico: de origen porcino, de salmón, humana o semisintética de anguila, con acción similar, pero con diferencias en cuanto a dosis, efecto analgésico o hipocalcemiante.

La acción antirresortiva de la calcitonina se basa en la presencia de receptores específicos en los osteoclastos⁴⁶. La efectividad disminuye a lo largo del tiempo, al perderse progresivamente la respuesta de los receptores, y también porque pueden aparecer anticuerpos anticalcitonina. Por eso se recomiendan pautas de tratamiento intermitentes^{43,46}.

La calcitonina contrarresta el efecto de la PTH y del calcitriol, que producen una aceleración de la resorción ósea^{46,56}. Se ha demostrado que la calcitonina, junto al calcio, disminuyen la tasa de fractura de cadera en ancianos⁹².

e) **Otros:**

e.1) *Difosfonatos:* Son análogos del pirofosfato endógeno, poseedores de una elevada afinidad de fijación para los cristales de hidroxiapatita⁴³. Se han usado fundamentalmente en la enfermedad de Paget, hipercalcemia en procesos malignos y osificación heterotópica. Actúan mediante una inhibición de la remodelación, y, sobre todo, de la resorción ósea¹⁸⁶, bloqueando la producción de cristales de hidroxiapatita, por un mecanismo aún poco claro^{46,43}. La complicación potencial más preocupante es la producción de un defecto de mineralización determinante de osteomalacia que podría conducir a un mayor riesgo de fractura⁴³. Todavía está por definir la posología más útil y los beneficios de este medicamento en la osteoporosis.

e.2) *Esteroides anabolizantes:* Son derivados sintéticos de la testosterona, desarrollados en un intento de separar los efectos anabólicos de los virilizantes⁴³. Se ha demostrado que aumentan la masa ósea y disminuyen la tasa de fracturas^{43,46}. Su mecanismo de acción derivaría de una estimulación directa de la formación de hueso, así como de una disminución en la excreción de calcio, con el consiguiente aumento de la calcemia, disminución de la PTH y de la resorción ósea⁴⁶. Sin embargo, tienen importantes efectos adversos, tales como trastornos

hepáticos, efectos virilizantes o alteración del lipidograma, lo que limita su uso en la clínica⁴⁶.

e.3) *PTH*: Se ha demostrado que su administración a dosis bajas, aumenta la formación ósea^{43,46,196}, así como la síntesis de calcitriol y la absorción intestinal de calcio⁴⁶. Los problemas que plantea⁴³ son la necesidad de inyección parenteral, un aparente efecto negativo sobre la masa ósea cortical¹⁷¹, y un margen relativamente estrecho en su posología.

e.4) *Hormona de crecimiento*: Recientemente se ha indicado que esta hormona, o su precursor (GHRH) tienen un potente efecto formativo, aumentando la masa ósea en personas mayores de 60 años^{46,177}. En ratas ancianas, se ha demostrado que estimula la absorción intestinal de calcio⁶³. Aún está en fase experimental.

e.5) *Flúor*: Estimula la formación ósea, y produce un aumento neto de la masa ósea⁴⁶. Sin embargo, el hueso formado está compuesto de cristales de fluorapatita, mecánicamente peor que el normal⁴⁶. Aunque se ha postulado que reduce las tasas de fractura vertebral, algunos estudios han detectado un aumento de las tasas de fractura de fémur, lo que limita su uso en clínica^{11,46}.

F) **Actividad física**: El ejercicio físico moderado reduce la pérdida de masa ósea. Se ha demostrado que las mujeres postmenopáusicas que caminan más de un milla al día, tienen mayor masa ósea que las que no¹⁰².

B.8) La rata como modelo para el estudio de la osteoporosis

La Food and Drug Administration (FDA) americana ha establecido algunas recomendaciones sobre el desarrollo de modelos animales para el estudio de la osteoporosis⁶⁰. Destaca la recomendación de usar animales que pierden hueso tras la ovariectomía (en el estudio de la osteoporosis postmenopáusica), así como la medición de la densidad ósea, marcadores bioquímicos óseos y la resistencia ósea mediante estudios biomecánicos. Se pretende usar aquel modelo animal más parecido al hombre⁹⁷.

La rata ha sido muy usada para conseguir información sobre el esqueleto humano adulto. Para el estudio de la osteoporosis, son mejores las hembras, ya que se cierran antes los cartílagos de crecimiento (a los 6-9 meses en la hembra, hasta los 30 meses en el macho)⁹⁸. El pico máximo de masa ósea, medida por densitometría, ocurre a los 10⁹⁷-12¹⁸¹ meses de edad. Desde este pico, la masa ósea vertebral desciende progresivamente¹⁸¹. El pico coincide con el nivel máximo de 17-estradiol en las hembras, bajando posteriormente estos niveles¹⁸¹. La tibia pierde aún más masa ósea con la edad¹⁹². La esperanza de vida de la rata tipo Wistar es de 24 meses⁹⁷.

Sin embargo, la rata, como todos los demás animales, no presenta fracturas asociadas al desarrollo de osteopenia⁹⁷. Esto puede ser estimado de forma indirecta midiendo la resistencia mecánica de los huesos intactos.

Por todas estas similitudes al hombre, la rata parece un buen animal para el estudio de la osteoporosis^{97,192}, mejor que cualquier otro⁹⁷. Además, es fácil de manejar y sus determinaciones bioquímicas en sangre están muy bien desarrolladas.

C) FRACTURAS

C.1) Consolidación de las fracturas

El proceso de reparación de una fractura se puede dividir en cuatro etapas consecutivas¹⁴⁹, que se pueden superponer entre sí en diferentes zonas del callo⁶⁴. Son:

1º.- Inflamación: Comienza inmediatamente tras la fractura. Se lesionan vasos, células óseas, matriz ósea y tejidos blandos, produciéndose un hematoma en la zona, así como la necrosis de los extremos fracturarios^{28,130,149}. Esta necrosis afecta a más cantidad de tejido en el hueso cortical, por la distribución vascular con pocas anastomosis en esta zona⁷⁶.

Las células muertas, así como plaquetas, liberan mediadores de la inflamación que producen una vasodilatación y exudación del plasma. Aparecen en la zona polimorfonucleares neutrófilos, monocitos y macrófagos^{130,149}.

El hematoma se organiza, produciéndose un coágulo de fibrina que facilita la migración de las células reparadoras de la lesión. Si en este momento se elimina artificialmente el hematoma, se puede dificultar la consolidación, al bloquearse esta migración⁷³. Se liberan factores de crecimiento (se detallan más adelante) que median la migración y proliferación celular, así como la síntesis de matriz^{89,130}. En esta fase, el ambiente en la zona de fractura es ácido²⁸, lo que impide el funcionamiento adecuado de la fosfatasa alcalina y la mineralización precoz.

2º.- Callo blando: Esta fase comprende el periodo desde que el dolor y la hinchazón ceden hasta que los extremos óseos están unidos por tejido fibroso o cartilaginoso que hace que ya no se muevan uno respecto del otro¹⁴⁹. Esta fase comienza hacia el final de la segunda semana en el hombre⁶⁴.

Células mesenquimales pluripotenciales forman el tejido fibroso, cartílago y hueso en el foco. Estas células pueden proceder de^{89,130,149,158}: a) células endoteliales del canal medular; b)

capa interna del periostio; c) inducción osteogénica de células de partes blandas adyacentes.

El hueso más precoz aparece en los bordes del periostio, a partir de las células de la capa interna del mismo^{28,76,130,149}. En la zona externa del callo se forma cartílago, lo que se supone es debido a la baja tensión de oxígeno en dicha zona^{76,89,130}. La cantidad de cartílago formado también depende de la movilidad entre los fragmentos, formándose más cartílago a mayor movilidad¹³⁰.

3º.- Callo duro: El proceso reparativo continúa hasta que el callo se convierte totalmente en tejido óseo inmaduro, entre 1-4 meses tras la fractura⁶⁴. El hueso se forma por: a) osificación endondral, a partir del cartílago formado en la fase anterior; b) osificación membranosa, directamente a partir de las células mesenquimales de la capa interna del periostio^{89,158,208}.

La mineralización del callo ocurre en una secuencia definida: las células sintetizan matriz con una alta concentración de colágeno tipo I, y luego favorecen las condiciones locales para el depósito de cristales de hidroxapatita entre estas fibras²⁸. Así, las células deben eliminar los factores locales que inhiben la mineralización en la matriz fibrocartilaginosa, tales como las altas concentraciones de glicosaminoglicanos⁵⁰. Esto lo realizan los condrocitos secretando proteoglicanasas neutras que degradan estas moléculas, y también disminuyendo la acidez del medio. Después, los condrocitos y osteoblastos depositan complejos de calcio y fosfato por medio de la liberación de vesículas²⁴. Estas vesículas llevan no sólo mineral, sino también proteasas neutras (degradan más glicosaminoglicanos) y fosfatasa alcalina, que hidroliza el ATP y otras moléculas ricas en fosfato para facilitar la precipitación del calcio con éste. La calcificación va ocurriendo desde los extremos del callo hacia el centro y fuera, formando una especie de V en el corte longitudinal⁷⁶, que poco a poco se va convirtiendo en una V de ángulo más agudo, hasta desaparecer. Durante todo el proceso de consolidación, el contenido mineral del callo va aumentando progresivamente¹⁴⁹.

La recuperación de la fuerza y rigidez del hueso parecen más relacionados con la cantidad de nuevo hueso que une los fragmentos, que con la cantidad total de callo¹⁴⁹. Cuando la fractura se sintetiza de forma rígida, se produce la llamada consolidación ósea primaria o

directa, sin formación de callo visible, donde se pasa directamente de la fase de inflamación a la de remodelación^{35,139}.

4º.- Remodelación ósea: durante esta última fase, el hueso inmaduro se va convirtiendo en hueso laminillar maduro, y se reconstruye el canal medular. Esta fase puede durar años^{28,149}. En el hueso esponjoso, se va produciendo la aposición y sustitución en superficie del tejido óseo¹³⁰. En el hueso cortical, los osteoblastos labran un túnel por el que se forma un vaso que a su vez trae a los osteoblastos que van depositando hueso laminillar y formando una nueva osteona¹³⁰. En esta fase también se acaban de sustituir los extremos de hueso muerto por tejido cortical sano⁷⁶. En estudios histológicos se ha comprobado que la remodelación del hueso del callo perióstico comienza antes de que se produzca la unión de la fractura⁷.

Los fenómenos vasculares que ocurren durante todo el periodo de consolidación de la fractura varían con el tiempo. Inicialmente, el flujo sanguíneo disminuye por la lesión de vasos en el foco de fractura. Entre unas horas y pocos días, va aumentando el flujo hasta alcanzar un máximo a las dos semanas, volviendo paulatinamente a la normalidad a las 12 semanas. No se ha definido con precisión el estímulo responsable de la invasión vascular²⁸.

Estos cambios en el flujo vascular se acompañan de cambios en la presión de oxígeno en el callo. Así, la pO_2 es muy baja en el hematoma, y es máxima cuando se ha formado el tejido fibroso. De todas formas, a pesar del gran crecimiento de capilares en el callo, la proliferación celular es tal que las células permanecen durante la mayor parte del tiempo en un estado de hipoxia relativa^{22,35}. Este estado hipóxico puede ser favorable para la formación ósea, ya que in vitro el crecimiento óseo ocurre mejor con baja pO_2 ¹⁴⁹.

Normalmente, en un hueso largo, la cortical ósea está irrigada por vasos situados en la médula ósea, siendo el flujo sanguíneo centrífugo. Tras una fractura, se desarrolla rápidamente una vascularización extraósea derivada de los tejidos blandos periféricos, cuya función principal es irrigar el callo externo¹⁶⁶. En los últimos estadios del proceso se vuelve a desarrollar la circulación medular y cede la predominancia de la vascularización periférica.

Existen diversas sustancias, denominadas globalmente como factores de crecimiento, que parecen tener un papel importante en la consolidación de las fracturas. Algunas de las más importantes son:

a) IGF-II (factor de crecimiento similar a la insulina, tipo II)^{137,149}. Es un polipéptido de 67 aminoácidos. En cultivos celulares, estimula la proliferación de células óseas y la producción de colágeno de forma dosis-dependiente. La producen las células óseas, y tanto la PTH¹¹⁴ como la 1,25 (OH)₂ vitamina D₃¹¹³ estimulan su producción.

b) IGF-I (factor de crecimiento similar a la insulina, tipo I)¹³⁷. Es un polipéptido de 70 aminoácidos. También se ha comprobado que estimula la proliferación de células óseas en cultivo, de forma dosis-dependiente. El 17-β-estradiol y la PTH¹¹⁴ estimulan su producción. La sintetizan las células óseas, pero en una proporción 50-100 veces menor que la IGF-II en el hombre, aunque en la rata se invierte esta proporción¹³⁷.

c) TGF-β (factor transformador del crecimiento, tipo β)^{137,149}. Se encuentra en el hematoma fracturario a las 24 horas de la fractura¹⁵¹. Se encuentra en plaquetas, células mesenquimales, osteoblastos y condrocitos. Induce la síntesis de colágeno¹⁴⁹ por células mesenquimales y osteoblastos, así como la proliferación de células mesenquimales indiferenciadas¹⁵¹. Puede ser el responsable de la regulación de la formación de cartílago y hueso en el callo¹⁴⁹, ya que se ha observado que disminuye la expresión de los genes específicos de los condrocitos y aumenta la expresión de los específicos de los osteoblastos¹⁵¹.

d) PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas). Su principal función es quimiotáctica¹⁴⁹: atrae células inflamatorias al foco de fractura, pero también induce la proliferación de células mesenquimales^{137,151}. Es liberada de plaquetas y monocitos en las fases precoces de la consolidación y puede jugar un papel importante en la iniciación de la consolidación¹⁴⁹.

e) BMP (Proteína morfogenética ósea)^{137,149}. Es una glicoproteína de bajo peso molecular que puede inducir la formación de hueso en localización ectópica⁹⁶. Se han

diferenciado 3 tipos: BMP-1, 2A y 3¹³⁷. La BMP-3 también se conoce como osteogenina^{137,149}, y es muy potente para inducir la diferenciación del tejido mesenquimal extraesquelético en hueso. Actualmente se están describiendo más tipos de BMPs⁵².

El desarrollo de todo el proceso de consolidación es muy dependiente del grado de estabilidad que presenten los extremos fracturarios durante todo el proceso reparativo^{35,149}. La naturaleza de la respuesta celular depende directamente de este grado de estabilidad. Si son muy estables, se formará muy poco cartílago y se pasará casi directamente de la fase inflamatoria a la de callo duro. Si no lo son, se formará un gran callo blando para estabilizar los fragmentos. Este paso previo es necesario porque el tejido que va apareciendo a medida que avanza la consolidación es capaz de tolerar una menor deformación sin romperse.

Para un grado de movilidad dado, la deformación en el callo es inversamente proporcional a la distancia entre los extremos fracturarios. Por esto, si el espacio es pequeño, pequeños movimientos de los extremos pueden producir una deformación tan alta que impida al tejido de granulación formarse. Cuando esto ocurre, pequeñas secciones de los extremos del hueso pueden reabsorberse, haciendo el espacio mayor y reduciendo la deformación por unidad de callo formado.

2.1.- Fenómenos que modifican la consolidación

Las variables más importantes que se ha comprobado que modifican el curso normal de la consolidación las podemos agrupar en:

A) Factores locales:

- Gravedad de la lesión: En lesiones graves, se produce un gran desplazamiento de los extremos fracturarios, así como una lesión importante de partes blandas. Estos dos factores retardan la consolidación, probablemente porque el gran daño tisular aumenta el volumen de tejido necrótico y el hematoma, así como también lesiona el riego sanguíneo local, con lo que

disminuye la migración de células mesenquimales y la invasión vascular del callo¹⁶⁷. En lesiones menos graves, queda un manguito de tejidos blandos que son una fuente de células mesenquimales viables, así como una especie de férula interna que contribuye a la inmovilización de los fragmentos¹⁶⁸.

- Fracturas abiertas: La consolidación se retarda debido a la importante lesión de partes blandas, así como al gran desplazamiento que suelen presentar los fragmentos, aumentado a veces por la pérdida de hueso²⁸. Además, las fracturas abiertas pueden infectarse¹⁴⁹, lo que bloquea el proceso de consolidación.

- Infección: Retrasa o bloquea la consolidación porque deriva muchas células hacia la tarea de eliminar la infección. Además, ésta produce la necrosis de tejidos sanos, edema y trombosis de los vasos sanguíneos, lo que favorece el retardo⁶.

- Fracturas intraarticulares: Pueden retrasar la consolidación, ya que el líquido sinovial contiene colagenasas que pueden degradar la matriz del callo blando¹⁰³.

- Fracturas segmentarias: En estos casos, suele asociarse una gran lesión de partes blandas, con lo que se compromete la vascularización del fragmento intermedio²⁸. El hecho de ser una fractura segmentaria por sí sólo no parece retrasar la consolidación²⁰⁷.

- El riego sanguíneo deficitario, bien debido a la lesión inicial, o por la anatomía particular de algunos huesos, retrasa la consolidación²⁸.

- Tipo de hueso fracturado (esponjoso o cortical): El hueso esponjoso consolida más rápidamente que el cortical, posiblemente debido a que en el hueso esponjoso existe una mayor superficie de hueso por unidad de volumen, lo que crea muchos puntos de contacto ricos en células y vasos²⁹.

- Fracturas patológicas: Ocurren sobre un hueso debilitado por alguna enfermedad general (osteoporosis, osteomalacia, hiperparatiroidismo, etc.) o local (tumores, quistes óseos,

infecciones, etc.)²⁸. Puede retrasarse la consolidación o incluso no hacerlo si no se soluciona la enfermedad de base.

B) Factores generales (sistémicos):

- Edad: Las fracturas en niños consolidan más rápidamente que en adultos⁶⁴, tanto más cuanto más pequeño. Esto puede ser debido a que las células de personas más jóvenes pueden diferenciarse más rápidamente²⁰¹, o a que a ser el periostio de los niños más grueso, participa más en la consolidación²⁸. También se ha demostrado un retraso en la consolidación a mayor edad, en estudios experimentales en ratas^{12,54}.

- Factores hormonales: Muchas hormonas, aparte de la vitamina D (que se detalla más adelante) alteran la consolidación. Los corticoides retrasan la consolidación, probablemente inhibiendo la diferenciación de las células mesenquimales a osteoblastos¹⁹¹, y disminuyendo la síntesis de matriz orgánica³⁷. La hormona del crecimiento, la hormona tiroidea, calcitonina, insulina y esteroides anabolizantes estimulan la consolidación de fracturas en estudios experimentales²⁸.

- Lesiones neurológicas: Se ha demostrado experimentalmente que la denervación retrasa la consolidación de fracturas¹⁶⁵. Esto puede ser debido a que disminuye las fuerzas compresivas en el callo (ver más adelante) o a que inhibe el efecto de los factores de crecimiento que requieren ser activados por neurotransmisores²⁸.

- Nutrición: Se ha demostrado en ratas que una disminución del aporte de proteínas y/o minerales retarda la consolidación^{51,149}, pero un aporte excesivo no la acelera más allá de lo normal^{51,95}.

C) Factores derivados del tratamiento:

- Aposición de los extremos fracturarios: Al disminuir el hueco entre los extremos, disminuye el volumen de tejido necesario para la consolidación, con lo que ésta se acelera²⁸. Por

ello, una buena reducción de la fractura mejora la consolidación⁵, siempre y cuando se mantengan estables los extremos fracturarios.

- Carga del callo: Determinadas fuerzas compresivas en el callo en el momento adecuado estimulan la formación y mineralización del tejido óseo, mejorando la resistencia mecánica del mismo^{74,180}, quizá por efecto piezoeléctrico¹⁷.

- Campos eléctricos: En condiciones experimentales, los campos eléctricos pueden modificar la proliferación celular y síntesis de sustancias²⁸. Los campos eléctricos no aceleran la consolidación ósea normal, pero parece que sí pueden estimular la consolidación en algunos casos de pseudoartrosis o retardos de consolidación^{23,25}.

- Estabilización de la fractura: Facilita la consolidación al impedir la rotura continua del tejido del callo²⁸.

C.2) Métodos de valoración del callo

Los agrupamos en:

C.2.1) Biomecánicos

Los principales tipos de sobrecarga experimentados por los huesos del organismo son de 4 tipos: compresión, tracción, flexión y torsión. Tanto los huesos como el callo de fractura pueden ser ensayados de estas formas. Las pruebas de tracción tienen una utilidad limitada, debido a la necesidad de huesos relativamente largos para poder ser ensayados²⁰⁵. Las técnicas de compresión son menos exactas que las realizadas en tracción, por lo que prácticamente no se usan. Los dos tipos de ensayo más usados son los de flexión (bending) y torsión.

Los ensayos de flexión han sido muy usados para medir las propiedades mecánicas de los huesos de pequeños roedores²⁰⁵. Se puede producir la flexión en 3 puntos, concentrando la

fuerza en un punto central, o en 4 puntos, con lo que la fuerza se distribuye entre los 2 puntos centrales⁹³. Cuando se ensaya en flexión, se considera que la distancia entre los dos puntos de apoyo más separados debe ser mayor que 16 veces el grosor de la muestra. Si es menor, la mayoría del desplazamiento inducido al aplicar la fuerza será debido a fuerzas cizallantes, y no la flexión²⁰⁵. En ratas, esta proporción no se puede conseguir, pero se considera que la distancia entre los dos puntos de apoyo más separados debe ser mayor que 15 mm. en ratas hembras para garantizar que el 85-90% de la deformación del hueso es debida a flexión²⁰⁵.

En los ensayos de flexión, la configuración en 3 puntos tiene la ventaja de la sencillez, pero también el inconveniente de crear mucha tensión cortante cerca de la zona media del hueso. La configuración en 4 puntos produce fuerzas puras de flexión entre los dos apoyos centrales, pero requiere que la presión ejercida en estos dos apoyos sea igual, lo que no es tan fácil cuando se trabaja con huesos de morfología irregular²⁰⁵.

Los ensayos de torsión miden el comportamiento mecánico del hueso o callo bajo tensiones cortantes, producidas en la sección transversal por el momento torsor inducido. Al torcer un hueso, la tensión cortante producida varía desde cero en el eje de giro hasta un nivel máximo en la superficie²⁰⁵. Para ensayar un hueso, se embuten los extremos del mismo en unos cabezales, y se hace girar un cabezal sobre el otro²⁰⁵. En los ensayos de torsión se calculan⁵⁴:

- 1.- Par torsor máximo (en Nm) soportado por la pieza antes de fracturarse.
- 2.- Deformación (en grados) soportada por la pieza en el momento de la fractura. Ambos parámetros se expresan en una gráfica fuerza deformación, similar a la de la figura 1.
- 3.- Módulo de elasticidad en torsión²⁰⁵. Es una medida de la resistencia del material a las deformaciones cortantes (rigidez), expresada por la pendiente de la curva en la zona elástica.
- 4.- Energía absorbida (en Julios), representada por el área bajo la curva.

En los estudios experimentales sobre consolidación, se aprecia que estos 4 parámetros van aumentando progresivamente a medida que avanza la consolidación, ya desde la primera semana^{12,53}.

Se considera que una prueba mecánica para un hueso debe³²: 1) Producir fracturas

similares a las que se observan en la clínica; 2) La carga aplicada debe repartirse homogéneamente por todo el material, de forma que identifique las zonas débiles. Este punto es de especial transcendencia cuando lo que evaluamos es la consolidación de una fractura; 3) Depender lo menos posible de la geometría del hueso, en particular de la longitud del hueso; 4) La carga debe aplicarse de forma controlada y reproducible; 5) El aparato de medición debe ser relativamente sencillo y fácil de ajustar.

De todas las pruebas mencionadas, la que mejor satisface todos los puntos es la torsión, por lo que se considera la prueba de elección³². Mediante ensayos de torsión, se han definido, desde el punto de vista biomecánico, cuatro estadios en la consolidación de fracturas²¹⁰. Son: I.- Al ensayar la pieza con el callo, la fractura se produce por el mismo sitio de la fractura original, con baja rigidez; II.- Fractura en el mismo lugar, pero con alta rigidez; III.- Fractura parcialmente sobre el mismo lugar y sobre zona intacta, con alta rigidez; IV.- Fractura totalmente sobre hueso intacto, con alta rigidez.

C.2.2) Histológicos

La histomorfometría consiste en el análisis histológico cuantitativo de los diferentes elementos que integran el tejido óseo (células y tejido intercelular)¹⁸⁵. Los recuentos y mediciones realizados directamente en cortes histológicos sin descalcificar y teñidos con métodos convencionales, permiten obtener una serie de datos, llamados parámetros estáticos. Los parámetros dinámicos se obtienen a partir de muestras en las cuales se han realizado marcajes con tetraciclinas, las cuales introducen el factor tiempo en dichas mediciones¹⁸⁵. Existen varios métodos para realizar las mediciones: manuales, automáticos y semiautomáticos, en función del grado de ayuda que proporciona el ordenador. El método con mejor relación coste/eficacia es el semiautomático¹⁸⁵.

Existen infinidad de parámetros que se pueden medir sobre el hueso. Los únicos que han sido usados en el estudio del callo de fractura son⁷:

1.- Superficie relativa de osteoide: Es la relación entre la superficie de tejido óseo

trabecular nuevo cubierto por osteoide partido por la superficie total de tejido óseo trabecular multiplicado por 100.

2.- Superficie relativa de reabsorción: Es la relación entre la superficie de tejido óseo trabecular nuevo cubierto de osteoclastos partido por la superficie total de tejido óseo trabecular multiplicado por 100.

3.- Número relativo de osteoclastos: Es el número de osteoclastos partido por la superficie total de tejido óseo trabecular en mm, multiplicado por 100 (se expresa en nº/100mm).

4.- Superficie quiescente: Es un parámetro secundario derivado de los anteriores, igual a $100 - (\text{Superf. relat. de osteoide} + \text{Superf. relat. de reabsorción})$. Se expresa en %.

En el único estudio disponible de histomorfometría en el callo de fractura, realizado sobre fracturas en tibias de ratas⁷, se observó: a) La superficie relativa de osteoide tendía a incrementarse desde las dos hasta las seis semanas de consolidación, no siendo las diferencias estadísticamente significativas. b) La superficie relativa de reabsorción tendía también a incrementarse a medida que pasaba el tiempo, no siendo las diferencias estadísticamente significativas. c) El número relativo de osteoclastos iba disminuyendo progresivamente a medida que transcurría la consolidación, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). d) La superficie quiescente tendía a disminuir progresivamente, no siendo las diferencias estadísticamente significativas.

Todas estas mediciones son muy difíciles de realizar sobre el tejido óseo del callo, siendo escasa la información que proporcionan sobre el estadio de la consolidación.

Mediante histomorfometría se podría comprobar la existencia o no de osteomalacia en el tejido óseo del callo de fractura. La forma más eficaz de diagnosticar la osteomalacia en el tejido óseo es demostrar una prolongación en el tiempo medio de retardo de la mineralización¹⁸⁴, un parámetro dinámico que precisa del uso de marcajes con tetraciclinas. Una forma indirecta consiste en demostrar un aumento del espesor de los ribetes de osteoide¹⁸⁴. Nunca se ha usado este parámetro en la valoración del callo de fractura.

Se ha postulado que el análisis cuantitativo de las proporciones de tejido fibroso, cartílago y hueso en el callo permite la comparación entre callos formados bajo diferentes condiciones experimentales^{112,193}.

Hiltunen⁸⁵ encontró en el callo de fracturas de tibia de ratón que el pico máximo de tejido mesenquimal se producía al 7º día, mientras que el de cartílago al 9º día, disminuyendo después progresivamente. La cantidad de hueso (medido en cortes longitudinales, en mm²) iba aumentando progresivamente a medida que avanzaba la consolidación. Lindgren¹¹² clasificó los callos de las fracturas experimentales que producía en ratas (todas con el mismo tiempo de evolución) como completamente consolidados, incompletamente, y no-unión, en función del predominio de un tipo de tejido sobre otro. Key⁹⁵ realizó fracturas experimentales en fémures de ratas sometidas a diferentes dietas, y consideró que la similitud histológica de los callos al corte era una prueba de la semejanza de la consolidación entre los distintos grupos.

Sin embargo, este análisis cuantitativo tiene el inconveniente de que se realiza sobre un corte del callo, que puede o no ser representativo del resto⁸, y, además, no tiene en cuenta la existencia de puentes óseos entre los extremos fracturarios, que es el factor más importante en la recuperación de la resistencia mecánica⁴².

C.2.3) Densitométricos

Se basan en la cuantificación del contenido mineral óseo del callo^{46,121}. Se ha demostrado en fracturas experimentales en metatarsianos de rata¹⁵⁹, que el contenido mineral del callo va aumentando a medida que avanza la consolidación, mostrando un incremento brusco que coincide con la mayor recuperación de la resistencia mecánica del hueso. De todas las técnicas disponibles, las 3 más prometedoras son:

1.- Tomografía axial computerizada cuantitativa. Mide la densidad mineral ósea con un error del 0.2 al 4%¹²¹. Markel¹²² aplicó esta técnica para el estudio del callo de fractura, encontrando una fuerte correlación entre las mediciones de densidad ósea realizadas en callos de

tibias de perro y los parámetros resultantes del ensayo biomecánico a torsión a baja velocidad (15°/min.). Todavía se necesitan más estudios que confirmen la utilidad de esta técnica.

2.- Densitometría fotónica simple. La tasa de error de la técnica es menor del 4%¹²¹. Finsen⁶¹ encontró un aumento del 28% del contenido mineral óseo aparente en el callo de 20 pacientes con fractura de diáfisis tibial. Aro⁹ examinó el callo de fractura de tibias de ratas mediante densitometría fotónica simple de alta precisión, encontrando una muy alta correlación ($r > 0.8$) entre el contenido mineral óseo medido, el peso de las cenizas del callo y la dureza del callo medida mediante test de indentación.

3.- Densitometría con rayos X de doble energía (DEXA). La tasa de error es del 0.4-1.1%¹²¹. Markel¹²³ midió el contenido mineral óseo con DEXA en el callo de tibias de perros, encontrando una alta correlación ($r^2 > 0.5$) entre estos valores medidos en la zona externa del callo y la rigidez y par torsor máximo de dichas tibias ensayadas a torsión a baja velocidad. Sin embargo, este mismo autor¹²³ encontró mayor correlación cuando medía la densidad ósea mediante densitometría fotónica simple. Esto lo atribuyó a la baja resolución del aparato de DEXA empleado en este estudio. Por eso, este autor cree que el DEXA puede ser más útil que la densitometría fotónica simple, al desarrollarse aparatos más precisos y ser más sencillos de usar.

C.2.4) Otros

Otros métodos usados en la evaluación del callo de fractura son:

1.- Frecuencia de resonancia e impedancia: Se aplica un impacto de fuerza conocida al hueso en consolidación, y se registra la vibración producida en el otro extremo¹⁷⁹. Durante la consolidación, la frecuencia de resonancia va aumentando hasta ser similar a la del hueso sin fractura¹¹². Esta técnica presenta mucha variabilidad según la colocación de los sensores, partes blandas periféricas, etc., lo que hace que actualmente sea una técnica poco usada.

2.- Ultrasonidos: Se basan en la medición de la velocidad del sonido al pasar por el callo

de fractura¹²¹. Sin embargo, la gran variabilidad de los resultados debido a la conducción por partes blandas (con mucho menor coeficiente de atenuación) hacen a la técnica poco reproducible.

3.- Indentación: Consiste en medir la resistencia del callo a la indentación. Presenta una gran variabilidad como técnica para medir las características mecánicas globales^{4,111}, aunque puede ser útil para orientarnos sobre las características mecánicas de algunas zonas particulares del callo¹²³.

C.3) Vitamina D y consolidación de fracturas

Se ha demostrado una aceleración del proceso de consolidación en ratas tras la administración de 1,25 (OH)₂ vitamina D₃^{19,112}. Lindgren¹¹², usando ratas macho adultas tipo Holzman, realizó una fractura experimental en el 1/3 medio del fémur. Encontró que los parámetros biomecánicos del callo medidos a flexión (bending) tras 4 semanas de consolidación eran significativamente superiores en el grupo tratado con 1,25 (OH)₂ vitamina D₃ respecto a los controles. Blahos¹⁹ también realizó fracturas experimentales en fémures de ratas Wistar de 3 meses de edad. Comprobó un aumento del peso seco de los fémures fracturados que habían recibido suplementos de 1,25 (OH)₂ vitamina D₃, a partir de la segunda semana de consolidación.

Sin embargo, este efecto no se ha demostrado tras la administración de vitamina D. Einhorn⁵¹ realizó fracturas experimentales en fémures de ratas macho adultas tipo Sprague-Dawley. Tras 5 semanas de consolidación, no encontró diferencias en los parámetros biomecánicos del callo medidos en torsión a alta velocidad, entre el grupo control y otro suplementado con vitamina D, calcio y fósforo. Este es el único estudio existente usando vitamina D.

Por otro lado, Lidor¹⁰⁹ estudió la influencia de la fractura sobre los metabolitos de la vitamina D₃, así como la distribución de éstos en diferentes tejidos durante el proceso de consolidación, en un estudio experimental en pollos. En sangre, encontró niveles casi indetectables de 1,25 (OH)₂ vitamina D₃ el primer día postfractura, para subir al pico máximo al tercer día, pero siempre por debajo de los niveles de animales pareados sin fractura (controles). Los niveles de 24,25 (OH)₂ vitamina D₃ se mantuvieron relativamente similares a los de los controles durante todo el periodo de consolidación. No midió la 25 (OH) vitamina D₃ en sangre. En el callo de fractura, los niveles de 25 (OH) vitamina D₃ permanecieron constantes durante todo el periodo de consolidación, mientras que los de 1,25 (OH)₂ vitamina D₃ presentaron un pico máximo a los 7 días, al comenzar la remodelación del callo. El 24,25 (OH)₂ vitamina D₃ presentó su pico máximo a los tres días, coincidiendo con el desarrollo máximo del tejido cartilaginoso en el callo.

En conclusión, no hay evidencia clara sobre la influencia de la suplementación de calcidiol sobre la consolidación de fracturas en ancianos, ni sobre el efecto del déficit de vitamina D (observado en ancianos con fractura de cadera) sobre la consolidación de las fracturas, lo que nos animó a desarrollar este trabajo.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Se ha demostrado que la suplementación con calcidiol en el anciano, disminuye la tasa de fracturas. También se ha indicado que los niveles de calcidiol en sangre son inferiores en los pacientes ancianos que se rompen la cadera frente a controles de la misma edad y sexo. Todo esto sugiere que el déficit de vitamina D debilita al hueso sano, mientras que la suplementación lo fortalece. El objetivo fundamental de este trabajo es comprobar el efecto, tanto del déficit como de la suplementación con calcidiol, sobre el fenómeno de la consolidación de las fracturas.

Así pues, se planteó la hipótesis, a partir de los conocimientos existentes sobre el riesgo de producción de fracturas en el hueso sano, de que la 25-OH-vitamina D (calcidiol), suministrada en el momento de la fractura, mejoraría la consolidación de las fracturas en ancianos. Asimismo, el déficit de vitamina D durante los últimos meses de la vida, empeoraría la consolidación de dichas fracturas. Este empeoramiento sería reversible con la suplementación con calcidiol desde el momento de la fractura.

Para comprobar la veracidad de esta hipótesis, se diseñó un modelo experimental sobre ratas ancianas tipo Wistar, para así poder tener un control histológico, densitométrico y biomecánico del fenómeno de la consolidación, algo que hubiera sido imposible de realizar en humanos.

Los objetivos concretos de este trabajo fueron:

1º.- Diseñar un modelo experimental en animales ancianos con el fin de estudiar la posible influencia del déficit y la suplementación de vitamina D (calcidiol) en la consolidación de fracturas.

2º.- Adaptar para este modelo una prueba mecánica fiable que permita estudiar la resistencia mecánica del callo en consolidación, así como del hueso sano.

3º.- Validar un método de medición de la densidad ósea en el callo de fractura, relacionando estos resultados con los de la prueba mecánica.

4°.- Comprobar la influencia del déficit de vitamina D, así como de la suplementación con calcidiol, sobre la histología del callo de fractura, así como sobre la densidad ósea y resistencia mecánica tanto del callo de fractura y como del hueso sano.

5°.- Comprobar la influencia de las hormonas calciotropas (calcitriol, PTH) sobre la densidad ósea y resistencia mecánica del callo de fractura y del hueso sano, en dicho modelo.

MATERIAL Y METODOS

1°.- Animales de experimentación y grupos

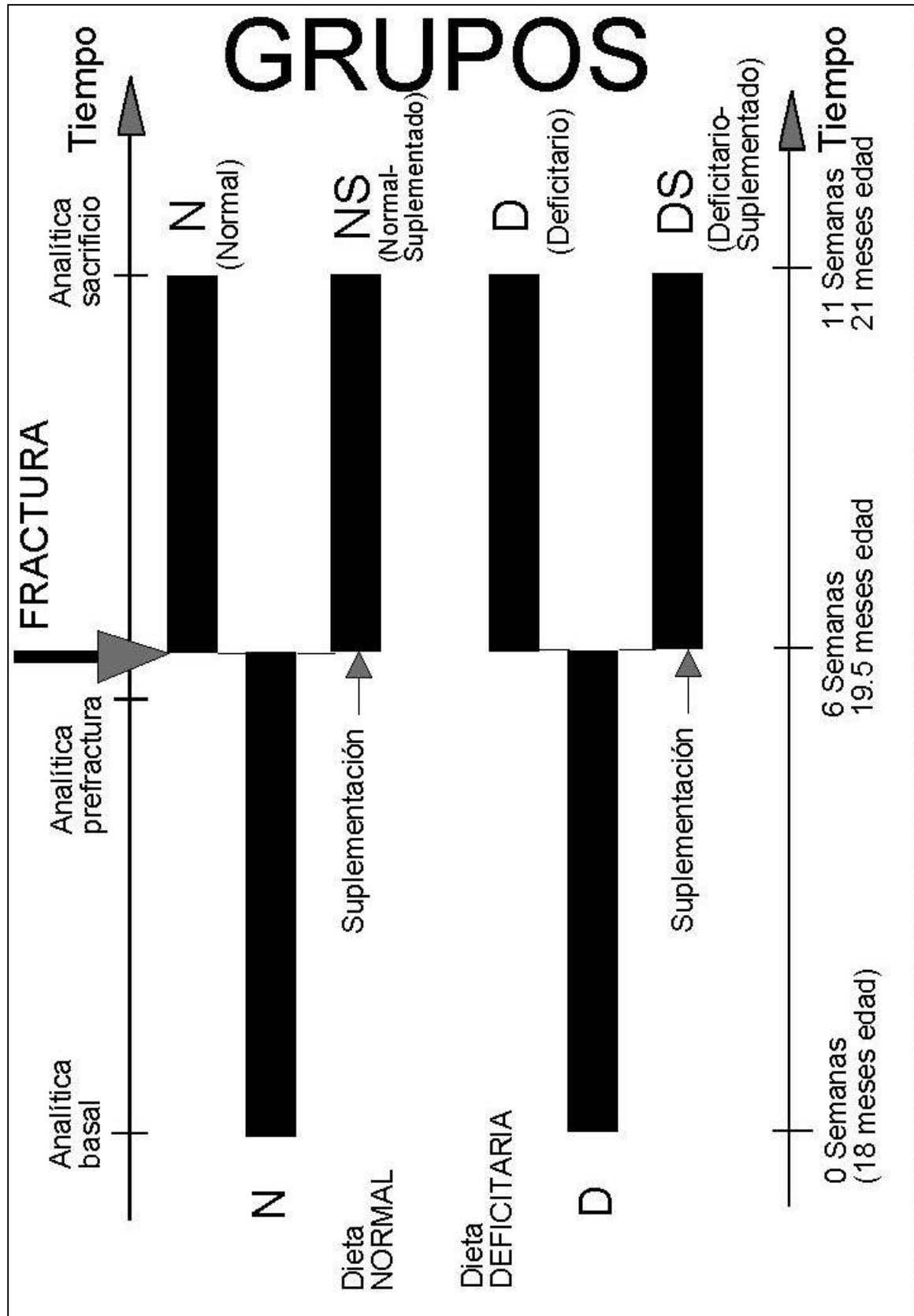
Se utilizaron 55 ratas tipo Wistar hembras, nacidas en el animalario del hospital "La Paz" y criadas en el mismo hasta cumplir los 18 meses de edad. Durante este tiempo, permanecieron en el animalario a una temperatura estable de 22°C, con ciclos luz-oscuridad de 12 horas diarias, con bebida y comida "ad libitum". La dieta suministrada (Beekay^R) contenía un 1.27% de calcio, 0.885% de fósforo, así como 3000 UI de vitamina D₃ por kilo de alimento, entre otros.

En este momento las ratas se dividieron al azar en 4 grupos, llamados N (normal), NS (normal suplementado), D (deficitario), y DS (deficitario suplementado), de 11, 11, 18 y 15 ratas, respectivamente. Los dos primeros grupos (N, NS) siguieron con la dieta normal, antes mencionada, mientras que los dos últimos (D, DS) comenzaron con una dieta similar a la anterior, pero libre de vitamina D (deficitaria en vitamina D) (Esquema 1).

Tras 6 semanas de dieta, se llevó a cabo la fractura experimental. Desde este momento, los grupos NS y DS recibieron una suplementación de 25-OH-vitamina D ó calcidiol (Hidroferol^R, laboratorios FAES, Bilbao) vía subcutánea de 250 UI/100 gr. de peso en el momento de la fractura, seguidas de dosis de 125 UI/100 gr. subcutánea a los 15 y 30 días, sucesivamente. De las 55 ratas que iniciaron el estudio, una murió tras la primera inyección de anestesia, mientras que otras 4 murieron en el postoperatorio inmediato de la realización de la fractura experimental, o los pocos días. Otras 5 ratas más murieron durante la última fase del estudio, parece ser que debido a la avanzada edad. Con todo esto completaron el estudio 45 ratas, 11 del grupo N, 9 del NS, 12 del D y 13 del DS.

Para diseñar la vía de administración de la suplementación, se seleccionaron 6 ratas hembras tipo wistar de 4 meses de edad, dividiéndose en 3 grupos: al primero (ORAL) se le administraron 250 UI/100 gr. de peso de 25-OH-vitamina D (calcidiol) junto con la comida, asegurando su ingesta al día siguiente; al segundo (SUBCUTANEO) se le administró la misma dosis vía subcutánea en el abdomen; al tercero (INTRAPERITONEAL) se le administró la misma dosis vía intraperitoneal. A los 5 días fueron sacrificados y se midieron los niveles de 25-OH-vitamina D (calcidiol) en suero. La vía que pareció ofrecer resultados más homogéneos fue

la subcutánea, por lo que se utilizó esa vía (véase resultados y discusión, más adelante).



Esquema 1: Diseño experimental

A las 5 semanas de la fractura, las ratas fueron sacrificadas, extrayéndose los fémures y las tibias.

El trabajo se dividió en 4 series, cada una de las cuales contenía un número aproximadamente igual de miembros de los 4 grupos, para disminuir así en lo posible la variabilidad debida al momento de realización del experimento, así como la derivada de los distintos lotes (camadas) de ratas usadas.

2°.- Fractura experimental

Se llevó a cabo mediante un aparato construido siguiendo los principios de Bonnarens y Einhorn²¹ (Foto 1).

Las ratas se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de una solución compuesta por: clorhidrato de ketamina 50 mgr/ml; Atropina 1 mgr/ml; y diacepam 5 mgr/ml. De esta solución se administró una dosis de 0.25 ml por cada 100 gr. de peso.

Tras la anestesia, se administró una dosis de antibiótico, cefazolina, a la dosis de 4 mgr/100 gr de peso, inyectada vía intramuscular en el tríceps braquial derecho. Posteriormente, se rasuraban ambas rodillas y se sumergía todo el material quirúrgico (bisturí, pinzas de disección, mango en T, agujas de kirschner, etc.) en una solución de clorhexidina al 5%.

La primera parte de la realización de la fractura consistía en el enclavado intramedular retrógrado de ambos fémures mediante una aguja de Kirschner de 1 mm de diámetro. Para ello, se practicó un abordaje anteromedial de la rodilla, seccionando el alerón rotuliano interno y rechazando la rótula lateralmente, con lo que se exponían ambos cóndilos femorales. Posteriormente se montaba la aguja de Kirschner con punta trocar en un mango en T y se insertaba la misma a través de la escotadura intercondílea, sin realizar ningún tipo de fresado. Se insertaba toda la aguja por el canal intramedular del fémur hasta que ésta emergía por el trocánter mayor y atravesaba la piel. En este momento se cortaba la aguja a nivel de los cóndilos femorales y se la hacía avanzar tirando del extremo proximal de ésta, para evitar que el extremo distal de la aguja lesionara la rodilla. Entonces se doblaba el extremo proximal de la aguja a 90°,

para así evitar la migración distal de la aguja durante el proceso de consolidación, y se cortaba para evitar la lesión de la piel en la zona del trocánter. La incisión se cerraba con Dexon^R de 3/0 y seda 3/0, suturando con mucho cuidado el alerón rotuliano interno, para evitar la luxación de la rótula.

Después de este pre-enclavado, se pasaba inmediatamente a la producción de la fractura, de forma bilateral.

El aparato de fractura (Foto 1) consistía básicamente en 2 puntos de apoyo, donde se colocaba la pata del animal (Foto 2) a la altura del tercio medio del fémur, y un peso que se dejaba caer justo en el medio, sobre un sistema de "Guillotina" que tiene un tope que limita la profundidad del desplazamiento, así como un resorte que permite que el impacto sea un golpe seco. La distancia entre los dos puntos de apoyo fijos era de 1.5 cms. El peso, de 400 gr., se dejaba caer de una altura de 75 cms. Las fracturas así producidas fueron en su inmensa mayoría transversas u oblicuas cortas, mínimamente desplazadas.

Una vez producida la fractura, se comprobaba ésta mediante un aparato de radioscopia convencional (General Electric-Estenoscop: 2 segs, 49 Kv, 0.7 mA), y si en algún caso ésta no se había conseguido, se repetía el procedimiento. También se practicaba radiografía (Cabinet X-Ray System - Faxitron series. Hewlett Packard) en placa de alta sensibilidad Agfa Mamoray RP3 (exposición 15 segs, 34 Kv)(Foto 3), para posterior comprobación de la morfología de la fractura. Aquéllos casos en los que la fractura no se situaba en el tercio medio del fémur, fueron desechados para algunos estudios posteriores (histología y prueba mecánica). Sin embargo, sí se les realizó la densitometría, porque se consideró que en este caso la localización de la fractura no influiría excesivamente en los resultados.

En este momento se inyectaba un analgésico (buprenorfina, vía subcutánea, en una dosis de 0.1-0.5 mgr/kgr. de peso) para disminuir el dolor a la rata en el postoperatorio inmediato. También entonces se procedía a suplementar con 25-OH-vitamina D (calcidiol) a aquellos grupos así programados (NS y DS), vía subcutánea. Posteriormente se colocaba a la rata en su jaula, permitiendo la carga inmediata.

3°.- Sacrificio y conservación

Tras 5 semanas desde la producción de la fractura, se procedía al sacrificio. Se volvió a anestésiar con el mismo preparado (ketamina, atropina, valium) al animal. Tras la realización de una laparotomía media, se identificaba la vena cava y se canalizaba ésta con una aguja intramuscular, extrayendo la máxima cantidad de sangre posible (unos 10 ml), para el análisis bioquímico.

Posteriormente se extraían ambos fémures y ambas tibias, liberándolos de partes blandas y extrayendo la aguja intramedular del fémur. No existieron signos clínicos de infección (rubor, calor) en ninguno de los fémures extraídos. Ninguna aguja extraída del fémur tuvo una angulación superior a los 5°, ni hubo problemas de extracción. Las tibias se introdujeron en gasas húmedas (suero fisiológico) y se conservaron a -20°C. Los fémures se dividieron en dos grupos. 16 de ellos, elegidos al azar, se introdujeron en una solución de alcohol de 70°, para realizar posteriormente estudios histológicos. El resto fueron introducidos en una gasa húmeda (suero fisiológico) y se conservaron a -20°C.

4°.- Análisis bioquímico

Durante todo el proceso, a cada rata se le realizaron 3 tomas de sangre para análisis bioquímico.

La primera (BASAL), se realizó al cumplir cada rata los 18 meses de edad. Bajo anestesia (ketolar, atropina, diacepam) se realizó la sección de los 2 cms. distales de la cola, extrayéndose así una cantidad aproximada de 2 ml. de sangre. La segunda toma (PREFRACTURA), realizada con la misma metodología, se realizó a las 6 semanas de la primera, siempre 2 días antes de la producción de la fractura experimental, para evitar una excesiva pérdida sanguínea en un mismo momento (la derivada de la extracción y la de la fractura), y así permitir una cierta recuperación de la volemia. La tercera y última toma (SACRIFICIO) fue la del sacrificio, obtenida mediante laparotomía y venopunción de la vena cava abdominal, obteniéndose una cantidad aproximada de 10 ml.

Tras la extracción de la sangre, en tubo de vidrio, se permitió la coagulación de la misma a temperatura ambiente durante un periodo mínimo de 15 minutos. Después, se procedió a la centrifugación del mismo en una centrífuga a 3000 revs/min. durante 15 minutos. Posteriormente se separó el suero en tubo aparte y se congeló a -20°C , hasta su análisis bioquímico.

En todas las muestras de sangre se determinó:

a) 25-OH-vitamina D, analizado por RIA, mediante método comercial INSTAR (Stillwater-Minnesota, USA). Aquellos animales que no disminuyeron su tasa de vitamina D tras la dieta deficitaria, y aquéllos que no la aumentaron tras la suplementación serían excluidos del estudio.

b) Calcitriol, por citorreceptor de timo comercializado por Nichol (San Juan Capistrano, California, USA), tras extracción con acetonitrilo y purificación por microcartucho de carbono C-18-OH.

c) PTH intacta, específico para rata, mediante ensayo RIA con kit comercial comercializado por Nichol (San Juan Capistrano, California, USA).

Debido a la escasa cantidad de sangre disponible en las dos primeras tomas, hubo algunas mediciones de calcitriol y PTH algunas ratas que no se pudieron realizar por falta de muestra.

5°.- Histología

El estudio histológico se llevó a cabo sobre 16 fémures elegidos al azar (5 del grupo N, 3 del NS, 4 del D y 4 del DS). Inmediatamente tras el sacrificio y la extracción del fémur, se retiró la aguja intramedular y se introdujo el hueso en una solución de alcohol etílico al 70% (fijador) hasta el momento de su procesamiento.

Posteriormente, se incluyeron los fémures (sin descalcificar) en metilmetacrilato. La inclusión consistió en colocar la pieza en un tubo de vidrio con fondo plano de 23 mm. de diámetro y añadir monómero de metilmetacrilato, compuesto que contiene hidroquinona como inhibidor de la polimerización. También contiene dibutilftalato, un compuesto que se añade para mejorar las propiedades del metilmetacrilato. La polimerización del monómero se consiguió añadiendo metilmetacrilato parcialmente polimerizado al monómero (iniciador). También se añadió un catalizador (benzoilperóxido), que inhibe a la hidroquinona. Una vez incluida la pieza (una semana después), se rompió el tubo de vidrio y se cortó la pieza.

Los cortes se realizaron con un microtomo de Reichert-Jung (Reichert-Jung, Buffalo, New York, USA) de forma seriada en el plano sagital de la pieza, resultando cada corte de 5 micras de espesor. Posteriormente se montaron en un portaobjetos recubiertos con una lámina de polietileno y fueron prensados durante 12 horas a 37°C.

El corte central de cada pieza, es decir, aquél en el cual el canal medular que había estado ocupado por la aguja intramedular aparecía más grueso, fue teñido con azul de Toluidina^{38,183}, una tinción que tiñe el tejido osteoide de azul pálido y el hueso mineralizado de azul violeta (Foto 4). La tinción se llevó a cabo introduciendo la muestra durante 5-7 minutos en una solución al 1% de azul de toluidina, a un pH de 4.

Con ayuda de un microscopio y un ocular milimetrado Zeiss^R, se determinó la anchura máxima media de los ribetes de osteoide de cada pieza. Para ello, en cada corte se seleccionó al azar un campo de visión a 40 aumentos localizado en la zona de tejido óseo neoforado del callo externo. En dicho campo, se hicieron 10 mediciones. Cada medición expresaba la anchura máxima de un ribete determinado. Los 10 ribetes que se midieron en cada pieza estaban situados unos junto a otros, pero todos individualizados. En cada pieza se halló la media aritmética de las 10 mediciones, obteniéndose un valor para cada callo.

Por otro lado, también se realizó en el corte central de cada callo una medición de la superficie total del callo externo, así como del porcentaje de tejido fibroso, cartilaginoso y óseo que se observaba en dicho callo externo. Para ello se utilizó un retroproyector, con el que se

dibujaron sobre papel las áreas de las distintas zonas de cada corte. Posteriormente, con ayuda de un equipo informático (Videoplan Kontron^R), se determinaron la superficie y porcentaje de cada tipo de tejido en cada corte estudiado. Las mediciones efectuadas se hicieron según la descripción de Aro⁸.

6°.- Densitometría

Para determinar la masa ósea, se utilizó un densitómetro tipo Hologic QDR-1000TM (S/N 277), gracias a la colaboración de la Fundación Jiménez Díaz (Clínica de la Concepción, Madrid). Este es un densitómetro radiológico digital (DEXA) que emite dos haces de energía de 70 y 140 Kv, provisto de un colimador de rayos de 1 mm para su aplicación en huesos de pequeño tamaño. Se usó un programa informático especial para el análisis con alta resolución.

Los huesos congelados (fémures y tibias) se descongelaron a temperatura ambiente y se introdujeron en suero salino, donde se realizó la lectura. Los datos suministrados por el densitómetro fueron procesados por ordenador, obteniéndose la densidad ósea de una serie de zonas predeterminadas.

En los fémures, estas zonas fueron (Foto 5):

- 1.- Extremidad distal del fémur, hasta donde comenzaba el callo (L1).
- 2.- Zona del callo (L2).
- 3.- Zona diafisaria proximal, desde el final del callo hasta la zona subtrocantérea (L3).
- 4.- Cabeza del fémur, hasta la zona subtrocantérea (L4).
- 5.- Total del fémur, resultado de sumar los valores de las 4 zonas anteriores.

En las tibias, fueron (Foto 6):

- 1.- Epífisis distal de la tibia, desde la articulación del tobillo hasta el punto donde se estrecha para pasar a convertirse en diáfisis (L1).
- 2.- Diáfisis, la zona comprendida entre las otras dos (L2).
- 3.- Epífisis proximal, desde la articulación de la rodilla hasta el punto donde la epífisis

se estrecha para convertirse en diáfisis (L3).

4.- Total de la tibia, resultado de sumar los valores de las 3 zonas anteriores.

Tanto para cada zona, así como para cada hueso completo, se obtuvieron:

- a) Area (cm^2) de la zona.
- b) Cantidad de masa ósea, en gramos.
- c) Densidad de masa ósea, en $\text{gramos}/\text{cm}^2$, resultado de dividir a) por b).

7°.- Prueba mecánica

La realización de la prueba mecánica se llevó a cabo gracias a la colaboración de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), en cuyas instalaciones se desarrolló el procedimiento. Tras la realización de la densitometría, e inmediatamente después de ésta, se procedió a embutir los extremos óseos en unos cabezales especialmente diseñados (Foto 7).

Para ello, se diseñaron unos moldes que permitían la colocación de una cabeza de resina epoxi de 16 mm. de diámetro, mediante fraguado de la resina, que se aplicaba semilíquida en el molde. Estos moldes hacían que el hueso estuviera siempre en una posición central respecto a los cabezales. Durante todas las manipulaciones, el hueso permanecía húmedo y rodeado de una capa de parafilm, para evitar la desecación (Foto 7). Posteriormente, se volvía a congelar a -20°C hasta el momento del ensayo mecánico.

El ensayo mecánico al que se sometieron los huesos fue el de torsión a baja velocidad ($10^{\circ}/\text{min}$). Se utilizó una máquina de ensayo electromecánica tipo Schenk-Trebel modelo RTP 0.6 (Foto 8), con indicador digital M1602, a la que se acopló un sensor de alta definición para medir pares de fuerza de un rango nominal en el entorno de 1 Nm. En los amarres de la máquina se colocó un equipo especialmente diseñado para el anclaje de los cabezales de resina epoxi de 16 mm de diámetro, provistos de sistema de llave cardan para anular los momentos flexores que se pudieran generar al ensamblar el hueso a la máquina (Foto 8).

La máquina suministraba dos señales: por un lado, el ángulo girado por uno de los

cabezales, que lo hacía a una velocidad homogénea de 10°/min., frente al otro, que estaba fijo. Por otro lado, el sensor de alta definición indicaba el par de fuerzas registrado sobre el cabezal fijo. Estas dos señales se enviaban a un equipo informático que comprendía una tarjeta de adquisición de datos, un terminal de conexión para entrada de señales analógicas, y un sistema básico de software especialmente diseñado para la digitalización, presentación en pantalla e impresión de los datos. Mediante éste, se obtuvieron en cada ensayo:

- 1.- Curva XY de momento (par torsor) - ángulo girado (Fotos 9 y 10).
- 2.- Valor máximo del par alcanzado por la probeta.
- 3.- Deformación angular correspondiente al valor del par máximo.
- 4.- Rigidez de la probeta, calculada como interpolación entre los puntos 10%-50% de la deformación angular correspondiente al valor del par máximo (equivalente a la rigidez de la zona elástica). Representa la pendiente de la curva en esta zona.
- 5.- Energía absorbida por la probeta, calculada como el área bajo la curva XY.

Para determinar la exactitud del método, y como fase previa a la realización de los experimentos definitivos, se realizó la torsión de 4 fémures sin fractura pertenecientes a 2 ratas hembras, tipo Wistar, de 3 meses de edad, con lo que se comprobó la fiabilidad del método (véase resultados y discusión).

8°.- Métodos de análisis estadístico

Los datos cuantitativos se expresaron como la media \pm la desviación típica. Para definir la variabilidad del método de torsión, se calculó el coeficiente de variación¹¹⁰. Este coeficiente es igual a la desviación típica partido por la media y multiplicado por 100.

El efecto que tuvieron, tanto el déficit previo, así como de la suplementación de vitamina D postfractura, sobre los datos bioquímicos, histológicos, densitométricos y mecánicos se analizaron entre los 4 grupos mediante un análisis de la varianza de 2 vías (deficit o no; suplementación o no), realizándose el método de Scheffé para comparaciones múltiples post-hoc. El nivel de significación aceptado fue de 0.05. La tabla esquemática del análisis de los grupos aparece en el esquema 2.

La evolución de la bioquímica (25-OH-vitamina D; 1,25 (OH)₂-vitamina D; PTH) entre las 3 muestras sucesivas se analizaron mediante t de Student para muestras apareadas, con corrección de Bonferroni cuando se realizaron comparaciones múltiples. La comparación entre los grupos Normal y Deficitario en la segunda muestra de sangre, se realizó mediante t de Student para muestras independientes.

La correlación entre la bioquímica, densitometría y prueba mecánica se estudió mediante el coeficiente de correlación de Pearson y su intervalo de confianza del 95%.

		Dieta		
Suplementación	N	D	Con supl.	
	NS	DS	Sin supl.	
		Normal	Deficitaria	

Esquema 2: División de los grupos experimentales para su análisis.

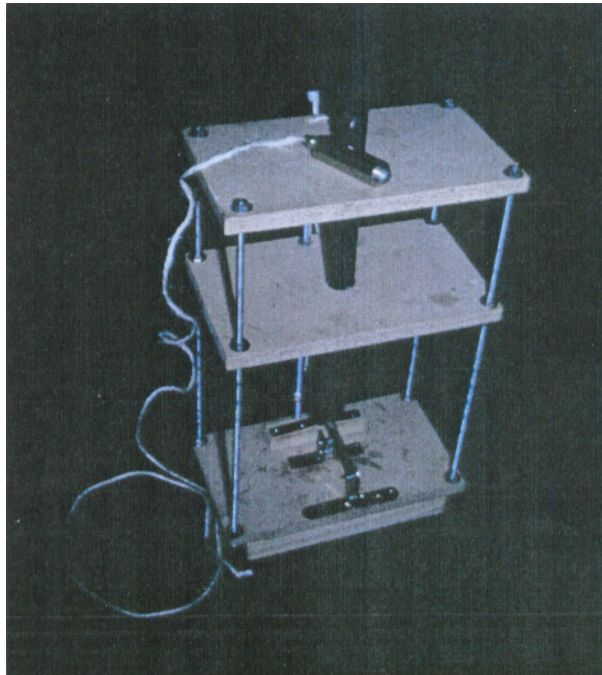


Foto 1: Visión general del aparato empleado para la producción de la fractura experimental.

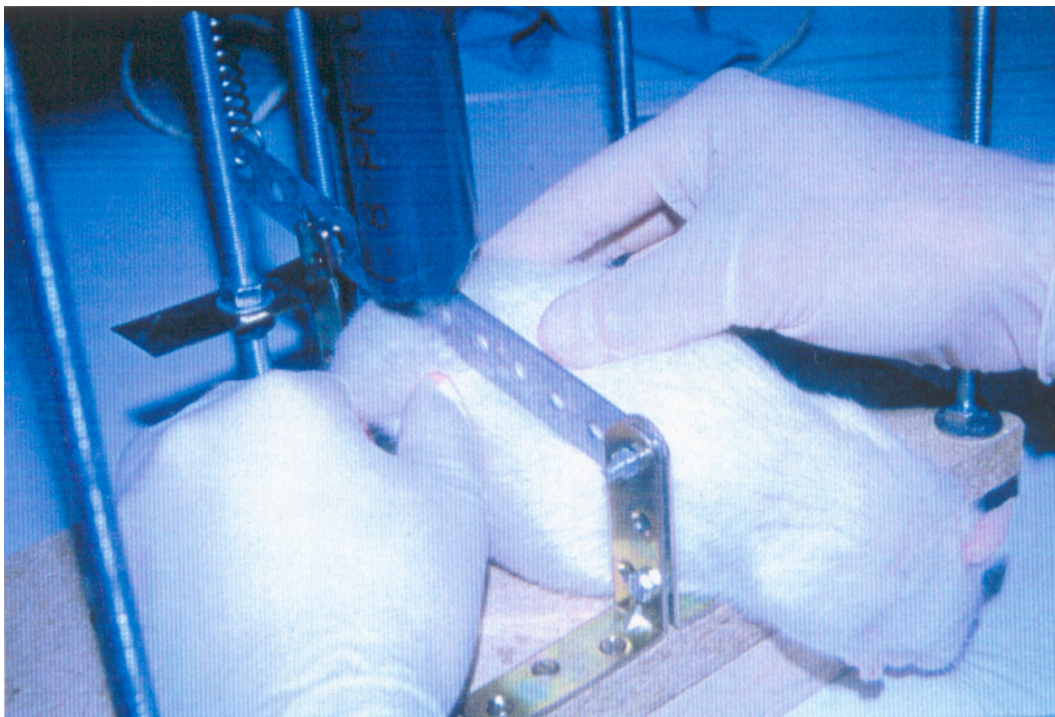


Foto 2: Momento de la realización de la fractura: el peso cae de forma brusca sobre el fémur de la rata, colocado sobre dos puntos de apoyo.

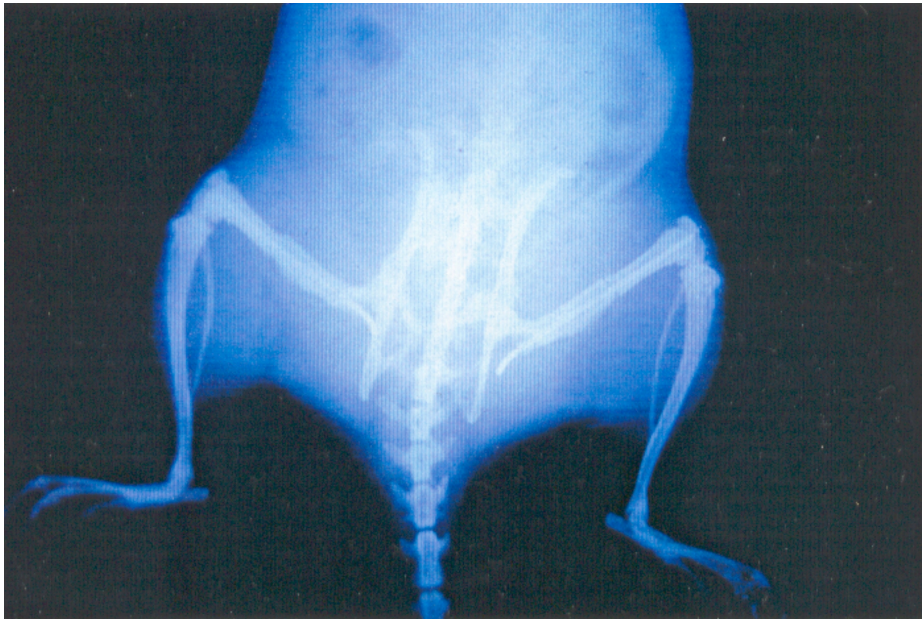


Foto 3: Radiografía de control de las fracturas producidas. Se observan dos fracturas transversas puras, el tipo de fractura más frecuentemente conseguido.

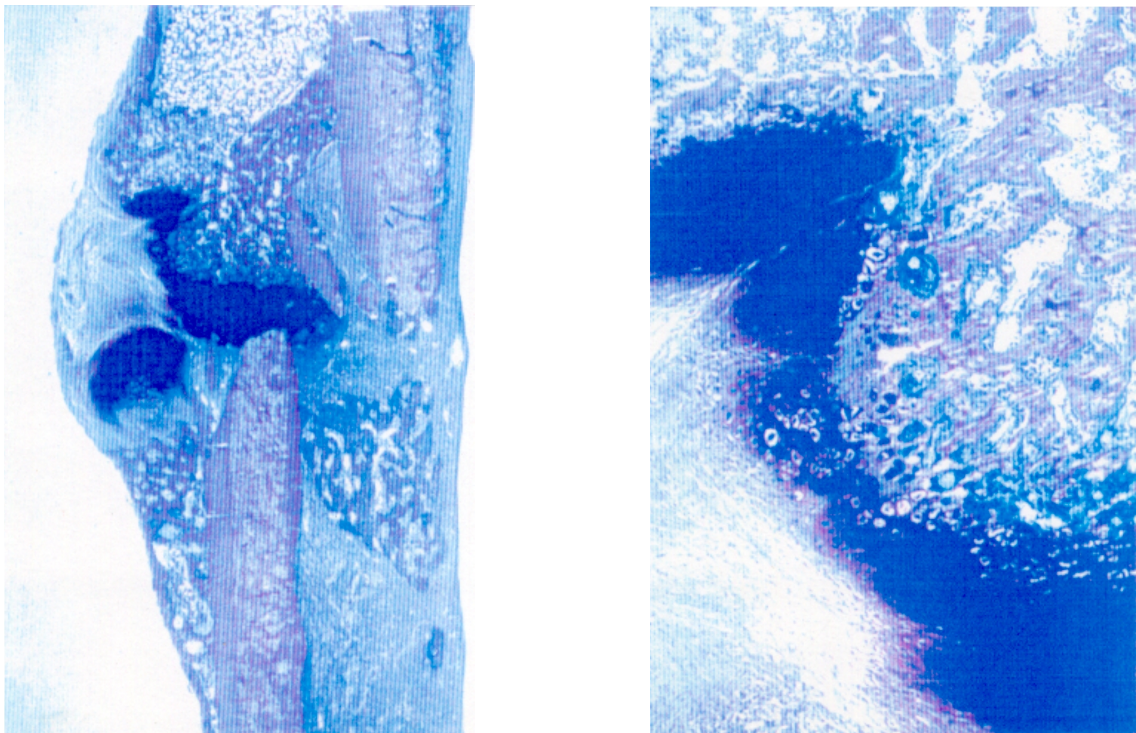


Foto 4: Corte histológico de un callo teñido con azul de toluidina (15 aumentos). A la derecha, detalle de la misma preparación (75 aumentos).

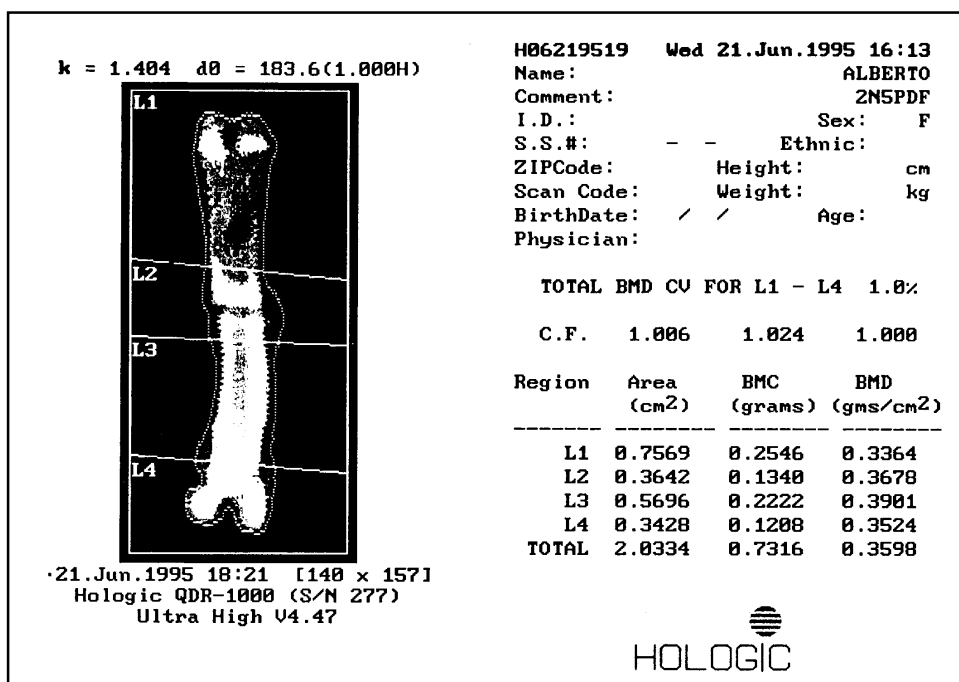


Foto 5: Densitometría realizada sobre un fémur. Obsérvense las distintas zonas en las que se midió la densidad ósea (L1-4).

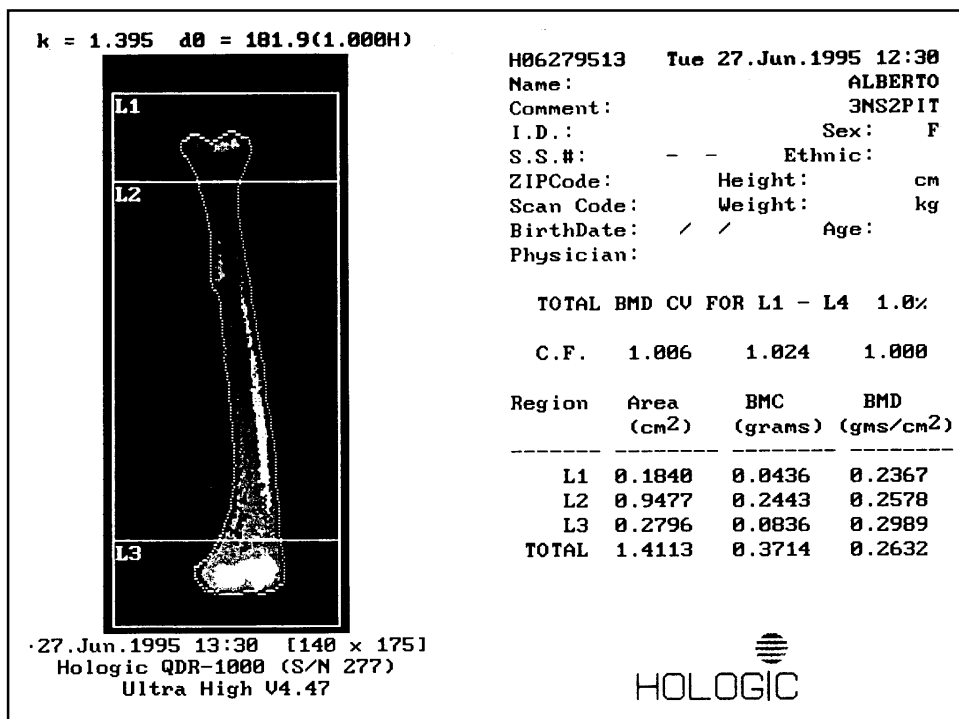


Foto 6: Densitometría realizada sobre una tibia. Obsérvense las distintas zonas en las que se midió la densidad ósea (L1-3).

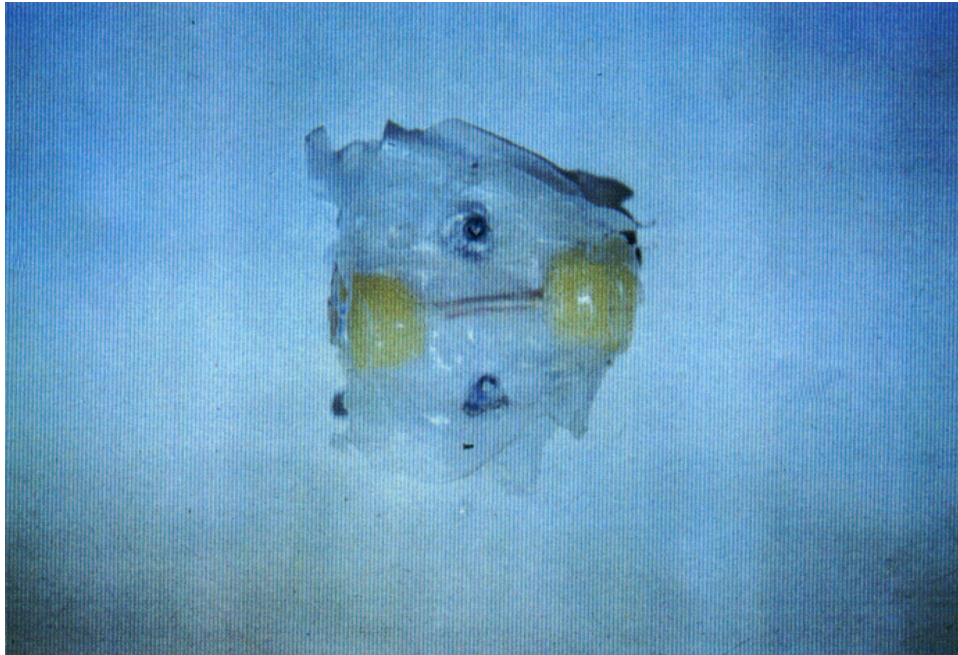


Foto 7: Tibia con sus cabezales de resina epoxi colocados. Está protegida de la desecación por una capa de parafilm^R.

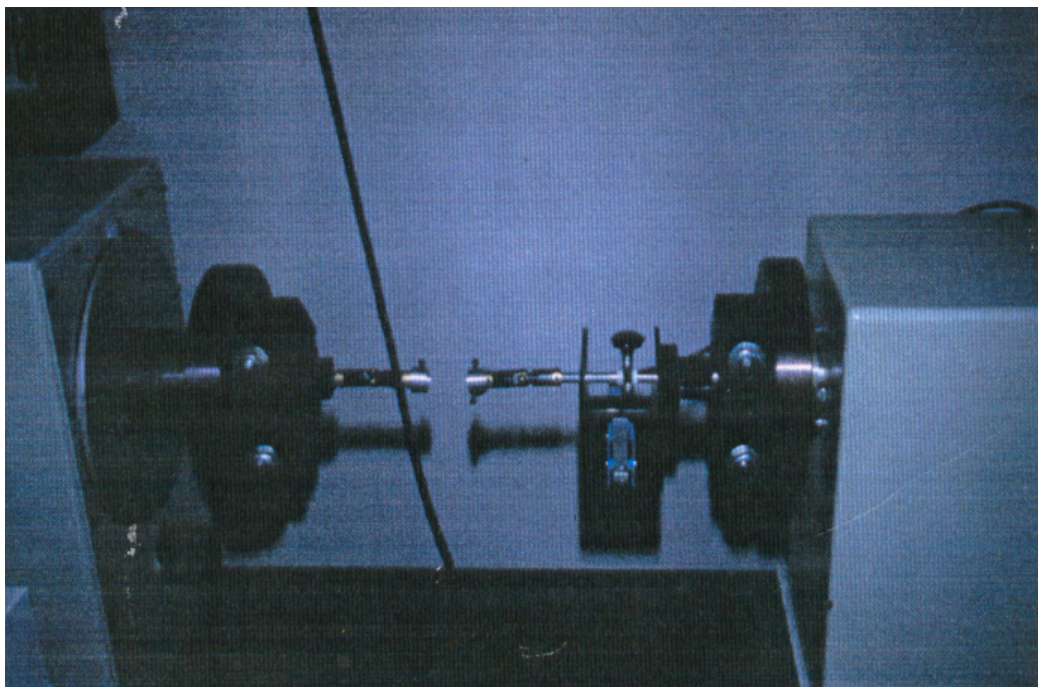


Foto 8: Máquina de torsión, con sensor de alta definición y sistemas de amarre con mecanismo de llave cardan.

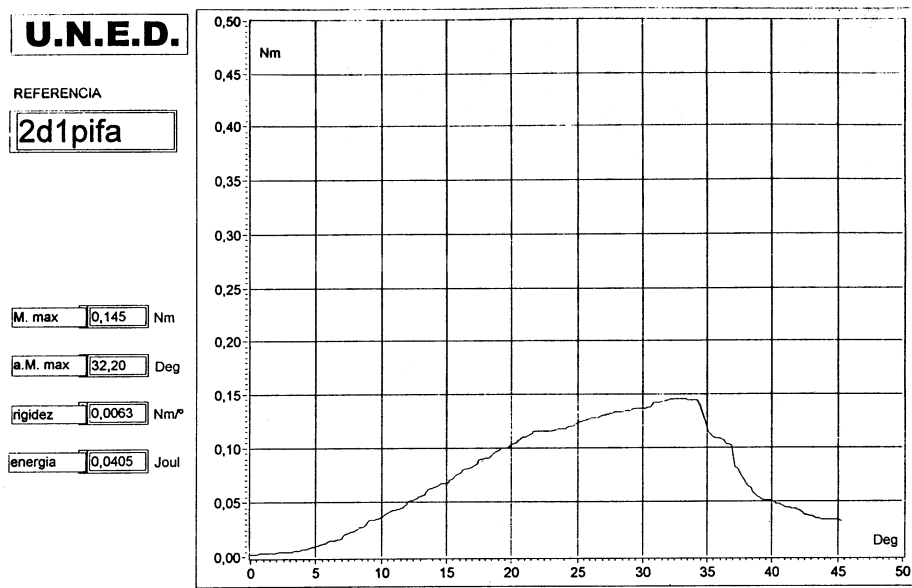


Foto 9: Curva par torsor - ángulo girado de un fémur realizada por el ordenador. Obsérvese que la caída tras la fractura no es tan brusca como en la foto 10.

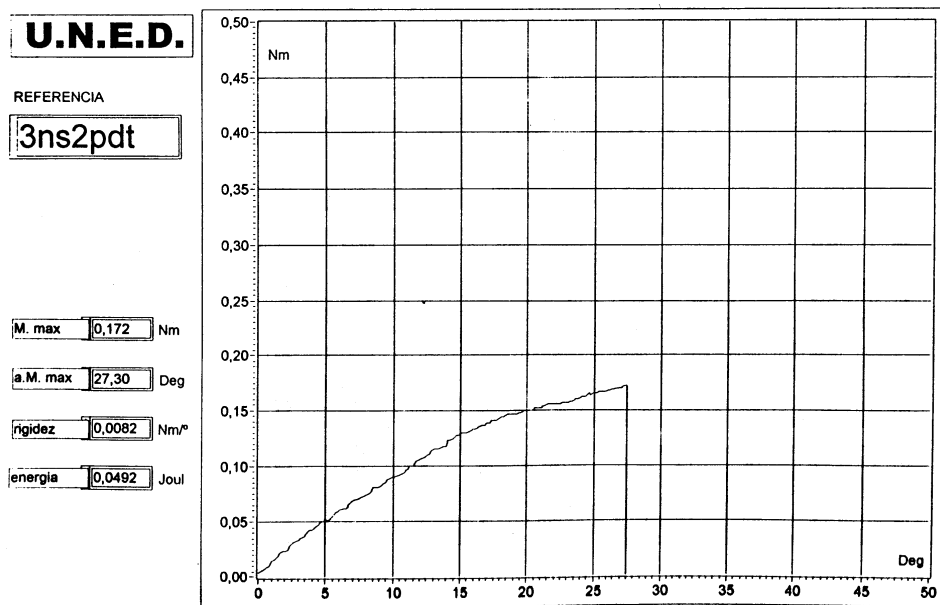


Foto 10: Curva par torsor - ángulo girado de una tibia realizada por el ordenador.

RESULTADOS

1°.- En relación con la puesta a punto del modelo experimental

a) *Para decidir la pauta de suplementación de calcidiol*, se estudiaron los resultados del análisis de 25-OH-vitamina D en las 6 ratas Wistar jóvenes (4 meses de edad), que figuran en la tabla 1. A partir de estos resultados, se seleccionó la vía subcutánea porque era la que parecía ofrecer los resultados más homogéneos.

	ORAL		SUBCUTANEO		I.P.	
BASAL	4.2	8.3	6.2	8.8	7.3	11.3
POST-S	11.5	30.6	23.0	35.2	12.3	45.5

Tabla 1: Niveles de 25-OH-vitamina D en los 3 grupos de suplementación: Oral, subcutáneo e intraperitoneal. BASAL: valores antes de la suplementación; POST-S: valores 5 días después de la suplementación de 500 UI/200 gr.

b) *Para comprobar la reproducibilidad del método de torsión a baja velocidad*, se analizaron los resultados de la torsión de 4 fémures sin fractura pertenecientes a 2 ratas hembras jóvenes (tabla 2).

FEMURES DE RATAS JOVENES	Rata 1 Derecha	Rata 1 Izquierda	Rata 2 Derecha	Rata 2 Izquierda
Par Máximo (Nm)	0.318	0.321	0.334	0.312
Angulo del Par Máximo (°)	13.53	10.97	11.95	13.07
Rigidez (Nm/°)	0.0300	0.0312	0.0300	0.0243
Energía absorbida (Julios)	0.0388	0.0322	0.0383	0.0379

Tabla 2: Valores mecánicos de la torsión hasta la fractura, de fémures de ratas hembras jóvenes de 3 meses de edad.

En estos resultados, el coeficiente de variación fue del 3.1% para el par máximo, 9.2% para el ángulo del par máximo, 10.7% para la rigidez, y 8.4% para la energía absorbida. Por consiguiente, el método de torsión se consideró suficientemente fiable, ya que su coeficiente de variación fue bastante bajo, sobre todo en los datos relativos al par torsor máximo.

2°.- Trazo de fractura obtenido

En el estudio radiográfico realizado tras la producción de la fractura experimental sobre las 45 ratas que completaron el estudio, se observó una predominancia de fracturas del 1/3 medio de la diáfisis femoral, de morfología transversa pura (Foto 3) u oblicua corta (trazo de fractura con una angulación menor de 30° respecto a una línea perpendicular a la diáfisis), representando éstas el 83.4% de las fracturas producidas (Tabla 3). En cuatro fracturas el trazo obtenido estuvo situado en la zona supracondílea del fémur, rechazándose éstos fémures para estudios posteriores (salvo densitometría). Por todo esto, el método de fractura se consideró suficientemente homogéneo.

	1/3 Medio Transversa	1/3 Medio Oblicua Corta	1/3 Medio Oblicua larga	1/3 Medio con tercer fragmento	1/3 Distal Supra- condílea	Total
Núm. de Fémures	61	14	4	7	4	90
Porcentaje	67.8%	15.6%	4.4%	7.8%	4.4%	100%

Tabla 3: Morfología de la fractura producida en 90 fémures de ratas ancianas.

3°.- Análisis bioquímico

En los datos obtenidos, se comprobó que toda rata con dieta deficitaria disminuyó su cifra de 25-OH-vitamina D en la siguiente muestra, y toda rata suplementada aumentó su cifra

en el siguiente análisis, por lo que no fue necesario excluir a ningún animal del estudio por este motivo.

Los valores de 25-OH-vitamina D (ng/ml) obtenidos se reflejan en la tabla 4, y de forma gráfica en la figura 2. Los resultados de las comparaciones entre los diferentes grupos en la 2ª y 3ª muestra de sangre se expresan en la tabla 5, junto con el significado de cada comparación. Por último, la tabla 6 indica las comparaciones entre las distintas tomas de sangre. Con la dieta deficitaria, se encontraron niveles de vitamina D significativamente inferiores respecto a las ratas alimentadas con dieta normal. La vitamina D aumentó también en los grupos suplementados, con lo que se comprobó que el diseño y realización de los grupos fue correcto.

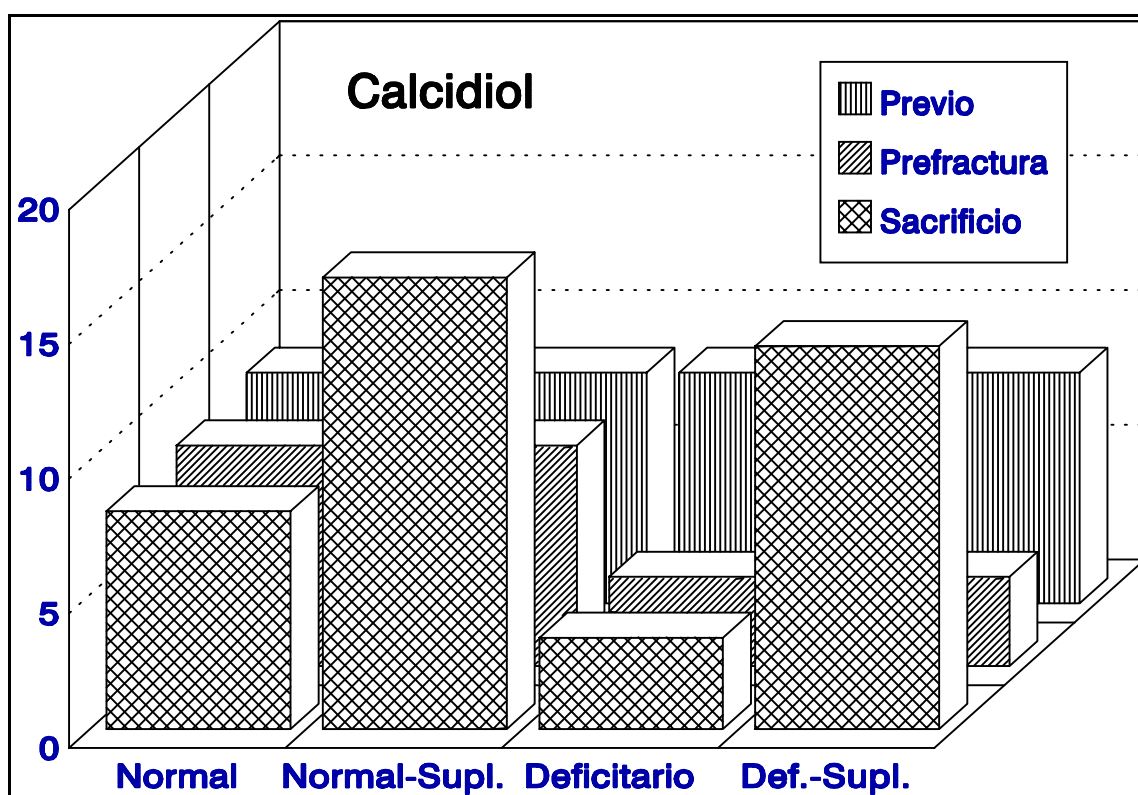


Figura 2: Representación gráfica de los valores de calcidiol

	N	NS	D	DS
Basal	8.5 ± 4.6			
Prefractura	8.2 ± 3.4		3.3 ± 1.9	
Sacrificio	8.0 ± 3.2	16.7 ± 5.3	3.3 ± 1.7	14.2 ± 8.1

Tabla 4: Niveles medios de 25-OH-vitamina D (ng/ml) en cada grupo experimental.

Muestra	Grupos comparados	signific.	Pregunta formulada, y su respuesta.	
Prefractura	N-NS vs D-DS	p<0.01	¿Se consiguió hacerlas deficitarias antes de la producción de la fract.?	Sí
Sacrificio	N-NS vs D-DS	p<0.05	¿Se mantuvo la deficiencia después de la fractura?	Sí
	N-D vs NS-DS	p<0.01	¿La suplementación aumentó los niveles de vit. D?	Sí
	N vs NS	p<0.05	¿La suplementación aumentó los niveles de vit. D en el grupo N?	Sí
	D vs DS	p<0.01	¿La suplementación aumentó los niveles de vit. D en el grupo D?	Sí
	N vs D	p<0.01	¿Se mantuvo la deficiencia de vitamina D respecto a normales tras la fract.?	Sí
Sacrificio	NS vs DS	N.S.	¿Tras la suplementación, los grupos deficitario y normal	Prob. Sí

Muestra	Grupos comparados	signific.	Pregunta formulada, y su respuesta.	
			alcanzaron los mismos niveles de vit. D?	
	N vs DS	C.S.	¿La suplementación en el grupo deficitario igualó los niveles de vit D normales?	Prob. Sí
	D vs NS	p<0.01	¿Existía diferencia entre el grupo normal suplementado y el deficitario?	Sí

Tabla 5: Comparaciones en los niveles de 25-OH-vitamina D entre los distintos grupos en una misma toma de sangre. Cada comparación responde a una pregunta. N.S= No significativo; C.S.= Casi significativo (p<0.10).

Grupos	Basal-Prefractura		Prefractura-Sacrificio			
	N y NS	D y DS	N	NS	D	DS
Significación	N.S.	p<0.01	N.S.	p<0.01	N.S.	p<0.01

Tabla 6: Resultados de la comparación de los valores de 25-OH-vitamina D entre las tres muestras de sangre.

También se compararon los resultados de la toma basal de calcidiol en las ratas de 18 meses de edad, con los resultados basales (antes de la suplementación) de las 6 ratas jóvenes (4 meses de edad) que se usaron para el desarrollo del modelo experimental (Tabla 1). Los resultados fueron de 7.5 ± 2.4 ng/ml para las ratas jóvenes, y 8.5 ± 4.6 ng/ml para las viejas, no siendo la diferencia estadísticamente significativa.

Los valores de 1,25-OH₂-vitamina D (pg/ml) se expresan en la tabla 7 y figura 3. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos comparados (Tablas 8 y 9).

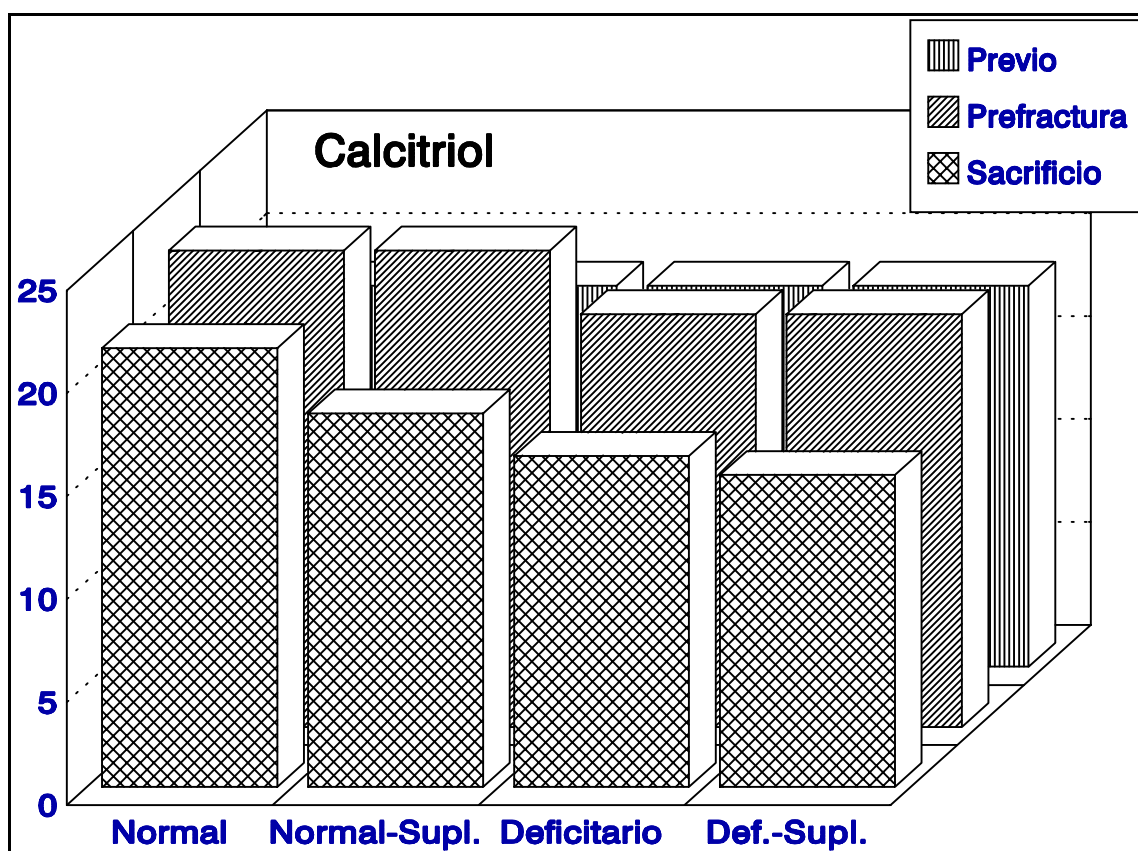


Figura 3: Niveles medios de calcitriol en cada grupo y en cada toma.

	N	NS	D	DS
Basal	18 ± 4			
Prefractura	23 ± 6		20 ± 9	
Sacrificio	21 ± 7	18 ± 6	16 ± 3	15 ± 3

Tabla 7: Niveles medios de 1-25-OH₂-vitamina D (pg/ml) en cada grupo experimental.

Muestra	Grupos comparados	Significación
Prefractura	N-NS vs D-DS	N.S.
Sacrificio	N-NS vs D-DS	C.S.
	N-D vs NS-DS	N.S.
	N vs NS	N.S.
	D vs DS	N.S.
	N vs D	N.S.
	NS vs DS	N.S.
	N vs DS	N.S.
	D vs NS	N.S.

Tabla 8: Comparaciones de los niveles de 1,25-OH₂-vitamina D entre los distintos grupos en un momento dado. C.S.= p<0.10.

Grupos	Basal-Prefractura		Prefractura-Sacrificio			
	N y NS	D y DS	N	NS	D	DS
Significación	N.S.	N.S.	N.S.	X	N.S.	X

Tabla 9: Resultados de la comparación de los valores de 1-25-OH₂-vitamina D entre las tres muestras de sangre: La extracción inicial (BASAL), a las 6 semanas (PREFRACTURA) y a las 11 semanas (SACRIFICIO). X= muestra insuficiente (menor de 4 mediciones).

Los valores de la PTHi basal (pg/ml) obtenidos se reflejan en la tabla 10 y figura 4. Las comparaciones realizadas figuran en las tablas 11 y 12. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos.

También se compararon de forma global (muestras apareadas) los niveles de PTHi hallados entre la 1ª y 2ª toma (basal-prefractura), así como entre la 2ª y 3ª (prefractura-

sacrificio), siendo significativas ambas comparaciones ($p < 0.05$), lo que implica que, de forma global, la PTH a las 6 semanas fue significativamente superior a la toma basal, y que 5 semanas tras la fractura, los niveles de PTH fueron sensiblemente inferiores a los hallados justo antes de la fractura (Figura 4).

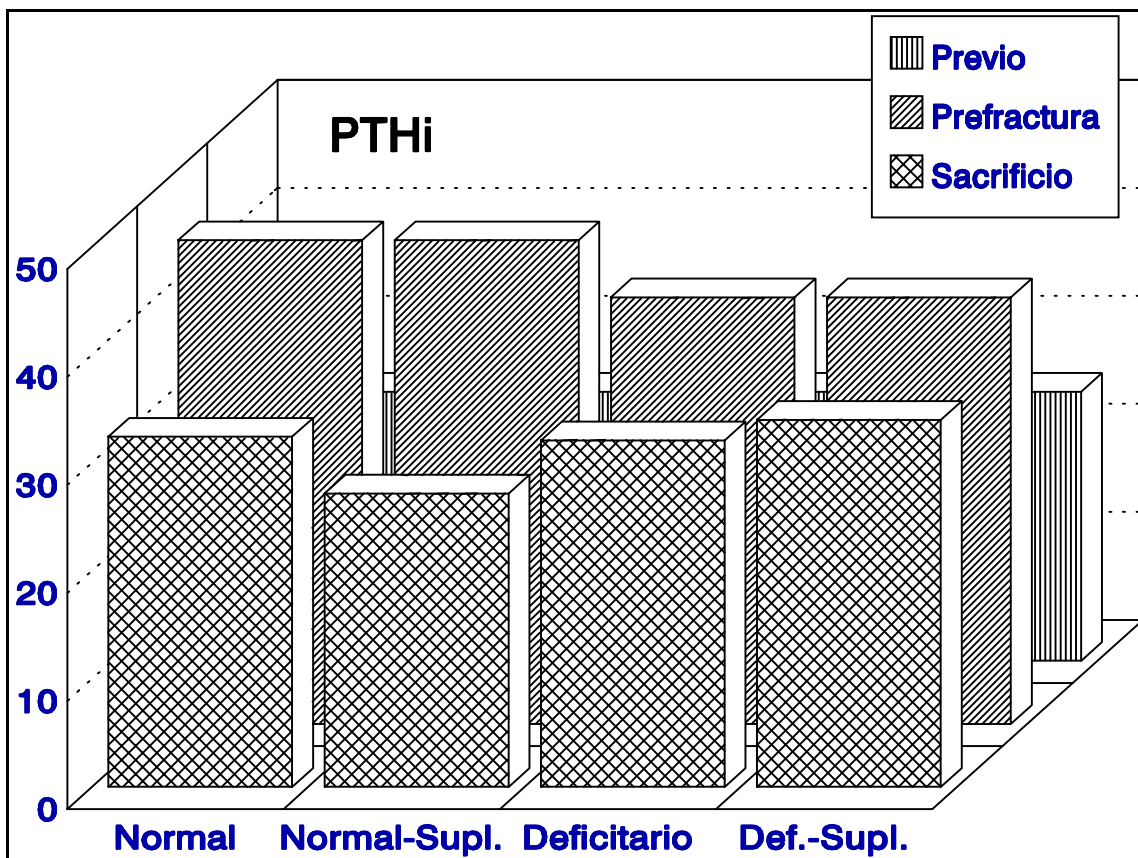


Figura 4: Valores de PTHi en cada grupo y en cada una de las 3 tomas.

	N	NS	D	DS
Basal	24 ± 2			
Prefractura	44 ± 12		39 ± 11	
Sacrificio	32 ± 16	27 ± 5	32 ± 13	34 ± 10

Tabla 10: Niveles medios de PTHi (pg/ml) en cada grupo experimental.

Muestra	Grupos comparados	Significación
Prefractura	N-NS vs D-DS	N.S.
Sacrificio	N-NS vs D-DS	N.S.
	N-D vs NS-DS	N.S.
	N vs NS	N.S.
	D vs DS	N.S.
	N vs D	N.S.
	NS vs DS	N.S.
	N vs DS	N.S.
	D vs NS	N.S.

Tabla 11: Comparaciones de los niveles de PTHi entre los distintos grupos de una misma muestra.

Grupos	Basal-Prefractura		Prefractura-Sacrificio			
	N y NS	D y DS	N	NS	D	DS
Significación	N.S.	N.S.	N.S.	X	N.S.	X

Tabla 12: Resultados de la comparación de los valores de PTHi entre las tres muestras de sangre: La extracción inicial (basal), a las 6 semanas (prefractura) y a las 11 semanas (sacrificio). X= Muestra insuficiente (menor de 4 mediciones).

Se realizó cálculo de regresión lineal entre los valores de 25-OH-vitamina D y 1,25 (OH)₂-vitamina D, siendo ésta no significativa en ninguna de las 3 muestras de sangre analizadas. Lo mismo se realizó entre la PTH y la 25-OH-vitamina D, así como entre la PTH y

1,25 (OH)₂-vitamina D, siendo todas las correlaciones no significativas.

4°.- Histología

Los resultados de la anchura media máxima de los ribetes de osteoide en cada uno de los callos de los 16 fémures elegidos al azar se presentan en la figura 5. Los resultados del valor medio por cada grupo (N, NS, D o DS) se presentan en la tabla 13.

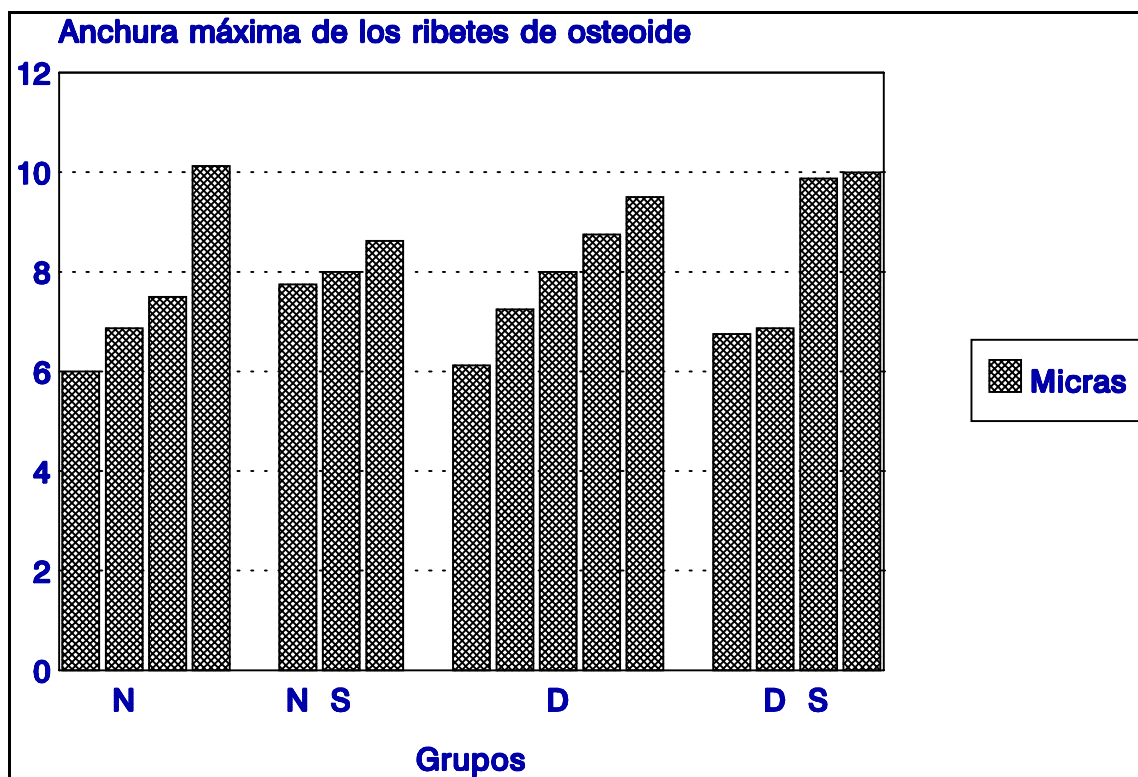


Figura 5: Valores medios de la anchura máxima del ribete de osteoide en cada callo medido.

Grupo	Valor medio de la anchura máxima de los ribetes de osteoide	Desviación típica	Número de fémures medidos
N	7.62	1.77	4
NS	8.12	0.45	3
D	7.92	1.31	5
DS	8.37	1.81	4

Tabla 13: Valores medios de la anchura máxima del ribete de osteoide por grupos, incluyendo el número de callos por cada grupo.

Los valores del ribete de osteoide no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos.

Respecto a la superficie del callo externo, así como al porcentaje de tejido óseo, cartilaginoso y fibroso del mismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos. Los resultados se presentan en la tabla 14, y de forma gráfica en la figura 6 (6a, 6b, 6c).

Gr.	Superficie del callo (mm ²)	% ósea	Superf. ósea	% cartilago	Superf. cartilago	% fibroso	Superf. fibroso
N	19.5 ±10.1	88.2 ±12.8	16.9 ±8.2	6.7 ±7.3	1.7 ±5.7	5 ±8.1	0.8 ±1.1
NS	28.2 ±9.5	62 ±11.8	17.1 ±6.3	15 ±4.6	4.1 ±1.4	23 ±8.5	6.8 ±3.6
D	17.4 ±6.9	74.4 ±17.4	12.1 ±3.6	10.4 ±8.7	2.1 ±2	15.2 ±11.8	3.2 ±2.8
DS	21.2 ±5.72	69.5 ±21.1	14.7 ±5.8	11.5 ±10.5	2.3 ±2.1	19 ±12.3	4.2 ± 2.7

Tabla 14: Resultados numéricos de la planimetría realizada sobre los cortes histológicos del callo. Superficie del callo externo. Valores en tanto por ciento y en valor absoluto de cada tipo de tejido en el callo.

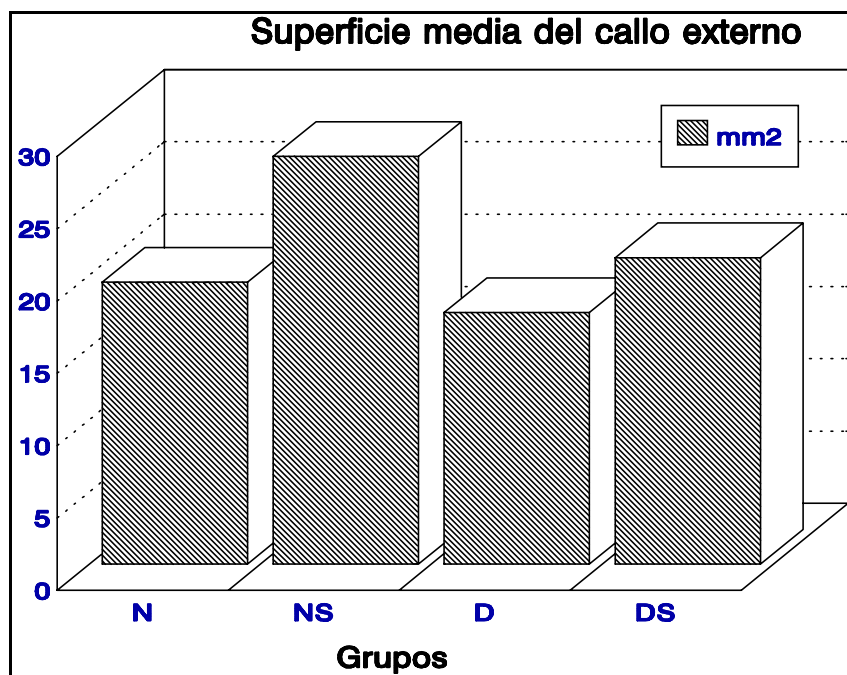


Figura 6a: Representación gráfica de la media de la superficie total del callo externo, en mm², en cada uno de los grupos estudiados.

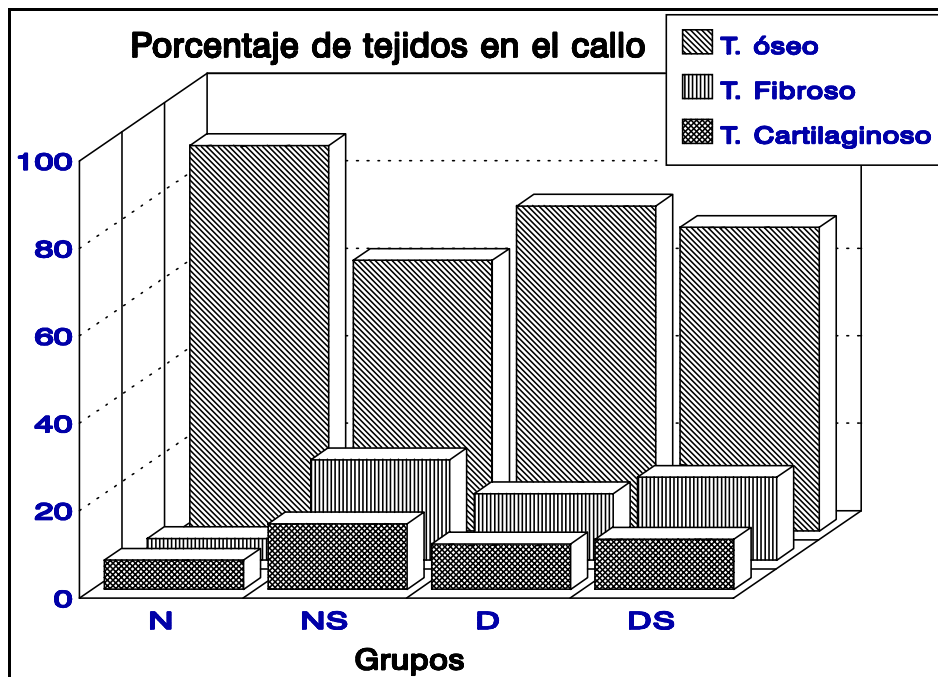


Figura 6b: Porcentaje medio de cada tipo de tejido encontrado en el callo, para cada grupo estudiado.

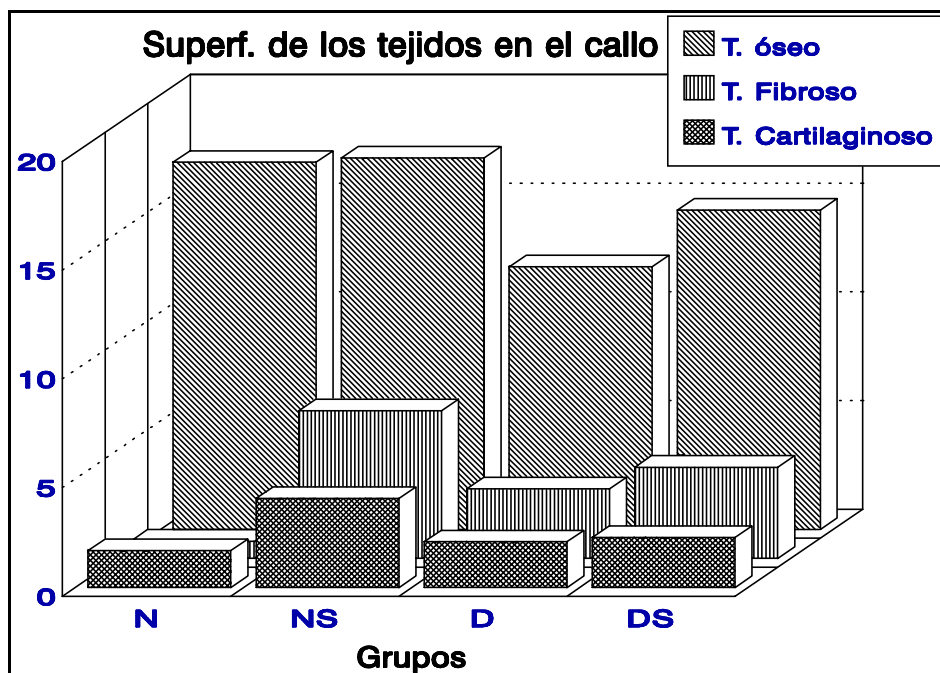


Figura 6c: Valor absoluto de la superficie que cada tejido ocupa en el callo.

5°.- Densitometría

Los resultados de la densitometría realizada en fémures y tibias se expresan gráficamente en las figuras 7 y 8. De los 90 fémures de los 45 animales, se realizó la densitometría en 57 fémures, siendo rechazados 33 bien porque se destinaron a histología (16 casos), o por problemas técnicos (17 casos). No se rechazaron los fémures en los que se realizó una fractura supracondílea. Los valores medios se expresan en la tabla 15. En estos 57 fémures se estudiaron el efecto del déficit y de la suplementación. También se compararon los valores de los grupos N, NS, D y DS entre sí. Todas las comparaciones se realizaron en cada una de las 4 zonas en las que se dividió el fémur, así como en el valor total del mismo.

En los fémures, se halló una densidad ósea significativamente inferior en los grupos deficitarios (D, DS) frente a los no deficitarios (N, NS) en la cabeza del fémur (Tabla 16).

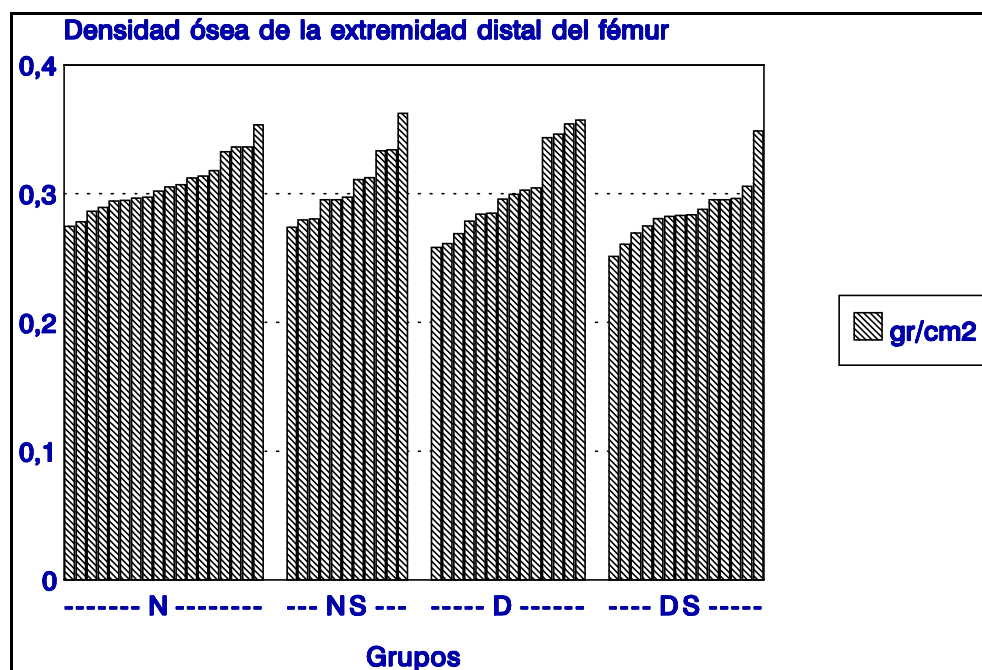


Figura 7a: Valores de la densidad ósea en la extremidad distal del fémur.

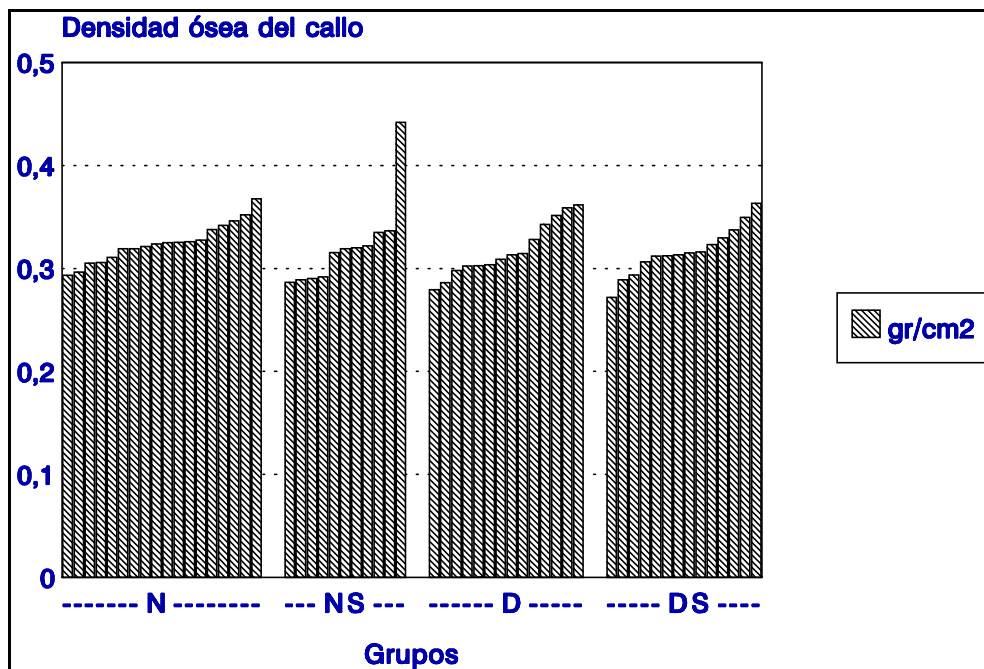


Figura 7b: Valores de la densidad ósea del callo.

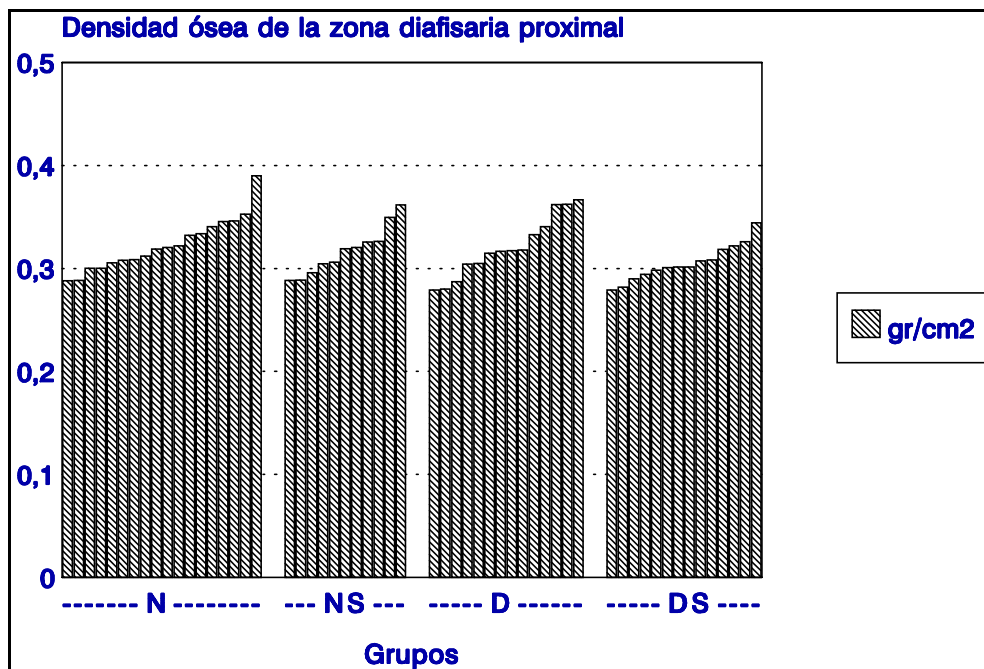


Figura 7c: Valores de la densidad ósea de la zona diafisaria proximal del fémur.

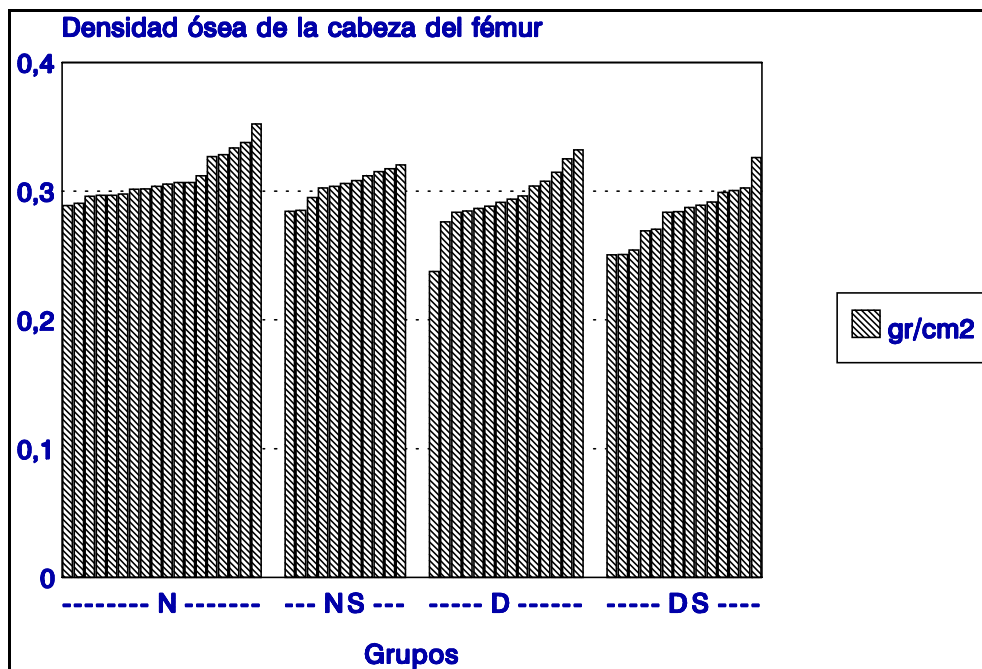


Figura 7d: Valores de la densidad ósea de la cabeza del fémur.

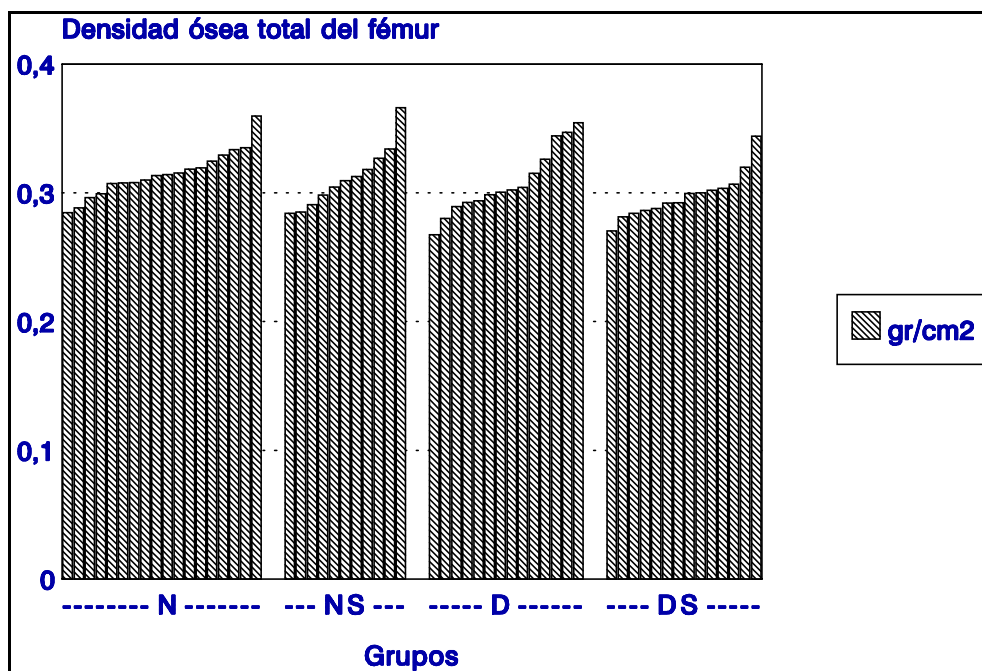


Figura 7e: Valores de la densidad ósea total del fémur.

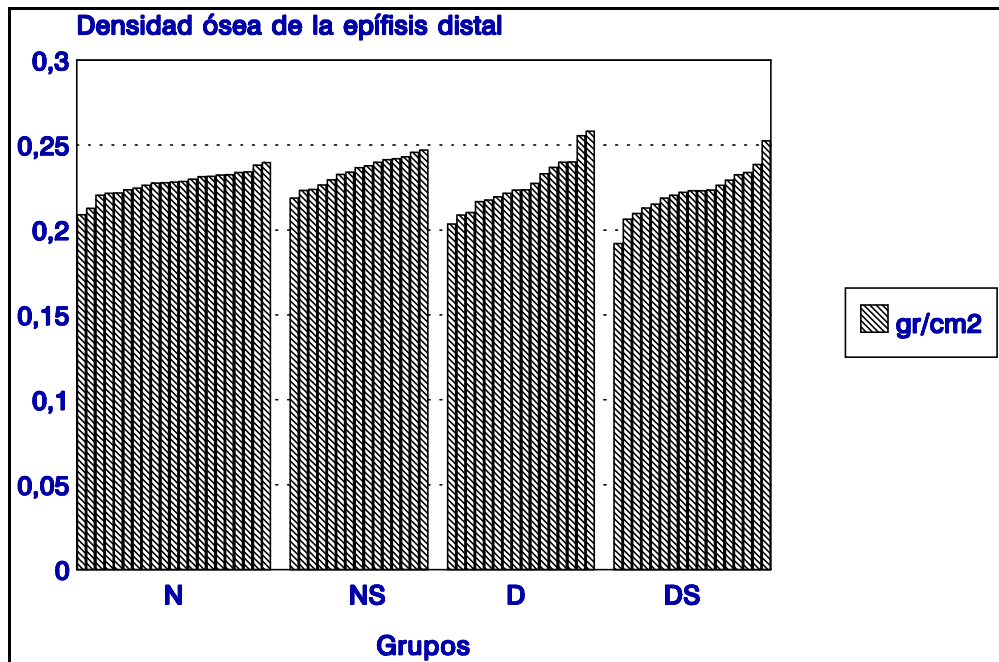


Figura 8a: Valores de la densidad ósea de la epífisis distal de la tibia.

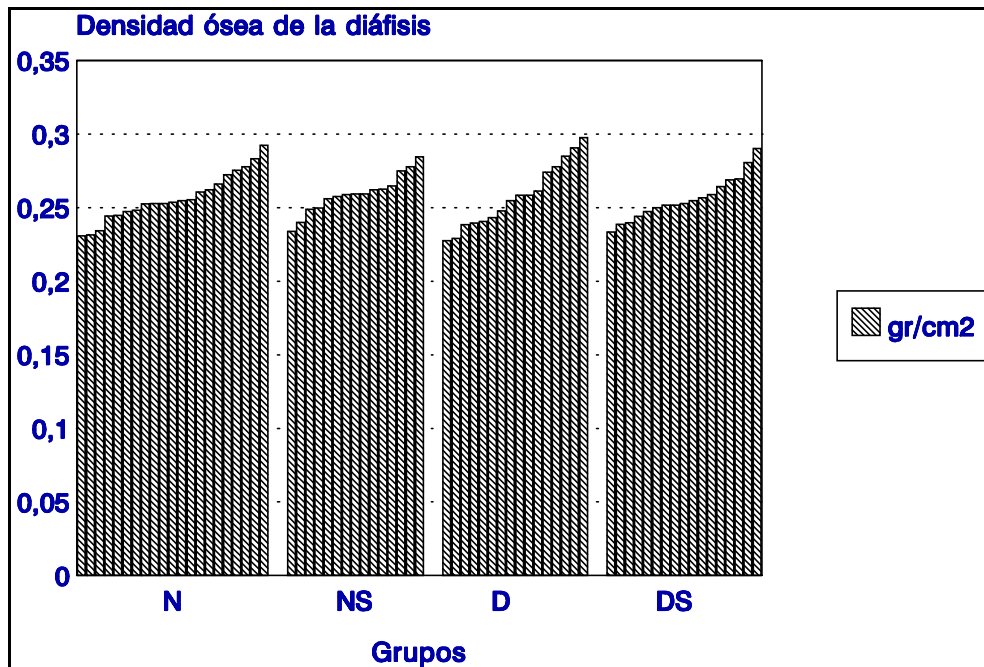


Figura 8b: Valores de la densidad ósea de la diáfisis de la tibia.

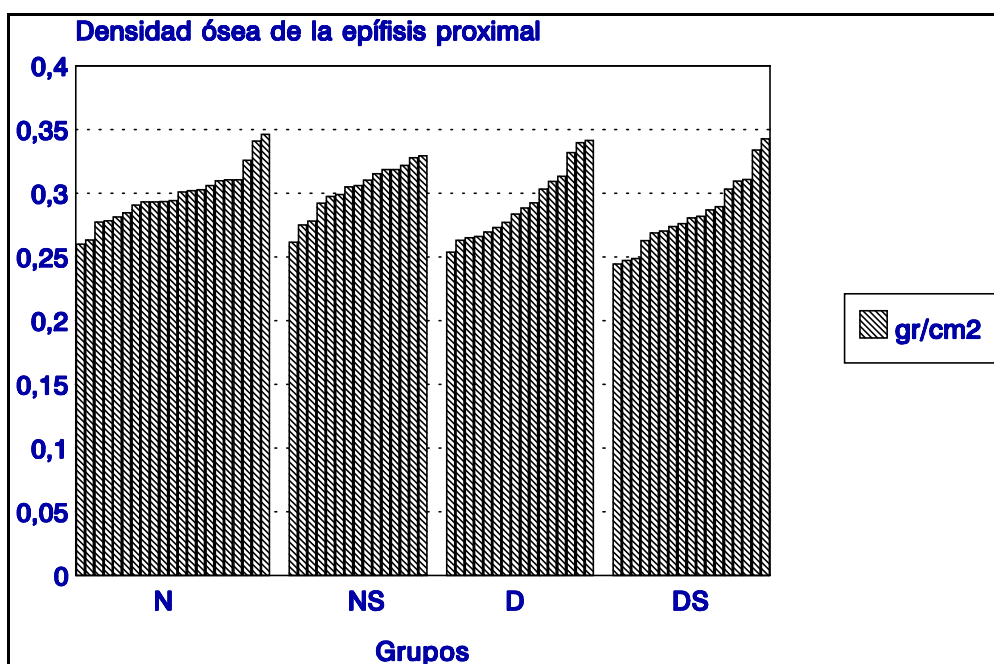


Figura 8c: Valores de la densidad ósea de la epífisis proximal de la tibia.

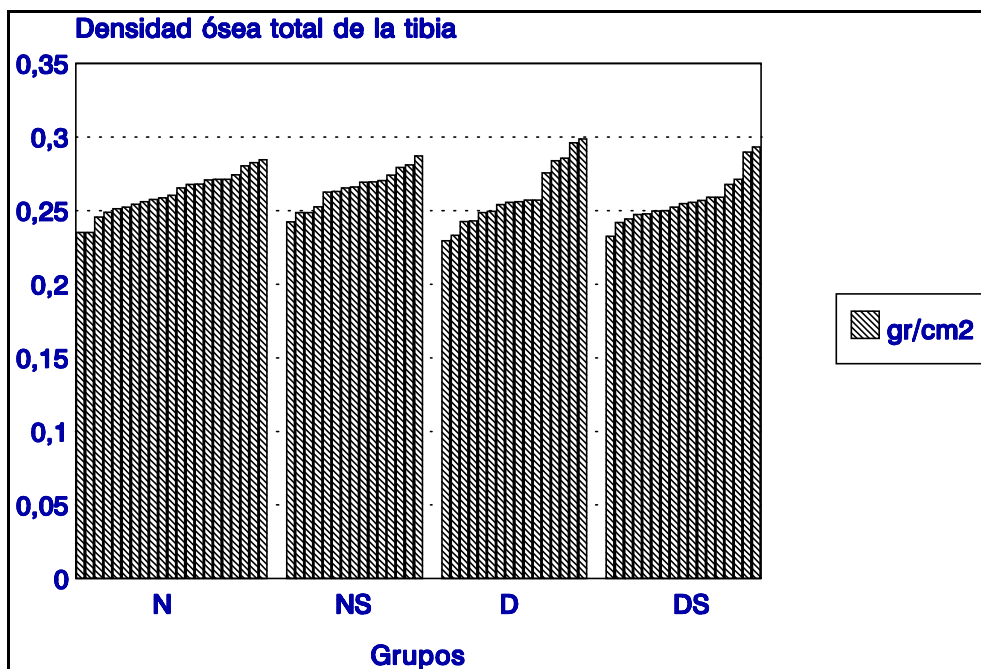


Figura 8d: Valores de la densidad ósea total de la tibia.

	Extremidad distal	Callo	Zona diafisaria proximal	Cabeza del fémur	Total del fémur	Nº de huesos
N	0.3073 ±0.0216	0.3248 ±0.0193	0.3231 ±0.0257	0.3103 ±0.0180	0.3148 ±0.0180	18
NS	0.3070 ±0.0273	0.3226 ±0.0437	0.3171 ±0.0236	0.3047 ±0.0122	0.3120 ±0.0243	11
D	0.3030 ±0.0343	0.3181 ±0.0265	0.3206 ±0.0294	0.2946 ±0.0231	0.3084 ±0.0260	14
DS	0.2870 ±0.0231	0.3167 ±0.0238	0.3054 ±0.0178	0.2830 ±0.0218	0.2980 ±0.0181	14

Tabla 15: Valores medios de la densitometría en 57 fémures para cada zona y en cada uno de los grupos estudiados.

Grupos	Extremidad distal	Callo	Zona diafisaria proximal	Cabeza del fémur	Total del fémur
N versus NS	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
D versus DS	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
N versus D	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
NS versus DS	N.S.	N.S.	N.S.	C.S.	C.S.
N versus DS	N.S.	N.S.	N.S.	p<0.01	N.S.
D versus NS	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
N-NS versus D-DS	N.S.	N.S.	N.S.	p<0.01	C.S.
N-D versus NS-DS	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Tabla 16: Esquema de las comparaciones realizadas sobre los valores de densidad ósea en fémures, con expresión de su significación estadística.

De las 90 tibias de los 45 animales, se realizó la densitometría en 69 de éstas, siendo rechazadas 21 por problemas técnicos. Los valores medios se expresan en la tabla 17. En estas 69 tibias se realizaron las mismas comparaciones que con los fémures. Los resultados aparecen en la tabla 18.

Se observa una disminución estadísticamente significativa de la densidad ósea en ambos extremos de las tibias en los grupos deficitarios (D-DS) respecto a los normales (N-NS).

	Epífisis distal	Diáfisis	Epífisis proximal	Total tibia	Nº de huesos
N	0.2275 ± 0.0075	0.2569 ± 0.0166	0.2984 ± 0.0218	0.2616 ± 0.0141	21
NS	0.2348 ± 0.0088	0.2594 ± 0.0134	0.3038 ± 0.0201	0.2654 ± 0.0129	15
D	0.2273 ± 0.0157	0.2579 ± 0.0283	0.2920 ± 0.0283	0.2604 ± 0.0213	16
DS	0.2224 ± 0.0134	0.2561 ± 0.0150	0.2843 ± 0.0284	0.2573 ± 0.0158	17

Tabla 17: Valores medios de la densitometría en 69 tibias para cada zona y en cada uno de los grupos estudiados.

Grupos	Epífisis distal	Diáfisis	Epífisis proximal	Total tibia
N versus NS	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
D versus DS	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
N versus D	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
NS versus DS	p<0.05	N.S.	N.S.	N.S.
N versus DS	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
D versus NS	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
N-NS versus D-DS	p<0.05 (con interacción)	N.S.	p<0.05	N.S.
N-D versus NS-DS	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Tabla 18: Esquema de las comparaciones realizadas sobre los valores de densidad ósea en tibias, con expresión de su significación estadística.

Se realizó estudio de correlación lineal entre el valor total de la densitometría en fémures y tibias, obteniéndose un resultado significativo ($p < 0.01$), con un coeficiente de correlación lineal (r) de 0.77 (0.63-0.86), y un r^2 de 0.59.

El análisis de correlación entre la densidad ósea de las distintas zonas dentro de cada hueso se expresa en la tabla 19a y 19b. En los fémures, se observa que la menor correlación tuvo lugar en la zona del callo frente a la cabeza del fémur. En las tibias, resultó menor la correlación de la diáfisis con el resto de las zonas, que la de las dos epífisis entre sí (debajo de la línea doble en la tabla 19b).

FEMUR	Significación	r	Intervalo conf. 95% para r	r^2
Callo / Extr. Distal	$p > 0.01$	0.66	0.48-0.79	0.44
Callo / Zona diafisaria proximal	$p < 0.01$	0.67	0.50-0.79	0.45
Callo / Cabeza fémur	$p < 0.01$	0.41	0.17-0.61	0.17
Extr. Distal / Zona diafisaria prox.	$p < 0.01$	0.75	0.60-0.84	0.56
Extr. Distal / Cabeza fémur	$p < 0.01$	0.67	0.50-0.79	0.45
Zona diafisaria prox. / Cabeza fémur	$p < 0.01$	0.68	0.52-0.80	0.47

Tabla 19a: correlaciones entre la densidad ósea de las diferentes zonas en los fémures. r : coeficiente de correlación.

TIBIA	Significación	r	Intervalo conf. 95% para r	r ²
Diáfisis / Epífisis distal	p<0.01	0.63	0.46-0.75	0.39
Diáfisis / Epífisis proximal	p<0.01	0.67	0.51-0.78	0.45
Epífisis proximal / distal	p<0.01	0.80	0.69-0.87	0.63

Tabla 19b: correlaciones entre la densidad ósea de las diferentes zonas en las tibias. r: coeficiente de correlación.

También se estudió la correlación entre la densitometría y los resultados bioquímicos. La densidad ósea total de las tibias se relacionó con los niveles de calcidiol en la primera toma de sangre (basal), siendo esta relación significativa ($p<0.01$), con $r=0.31$ (0.07-0.51), y $r^2=0.09$. No se objetivó relación significativa entre la densidad ósea total en tibias y los niveles de calcitriol o PTH en la primera toma de sangre (basal), ni tampoco existió correlación con ningún parámetro bioquímico obtenido en la tercera toma de sangre (sacrificio).

La correlación entre la densidad ósea total del fémur y los niveles de calcidiol en la toma basal fue significativa ($p<0.01$), con $r=0.51$ (0.15-0.75), y $r^2=0.26$. Se relacionó también la densidad ósea del fémur sin contar la zona del callo, encontrándose una correlación significativa ($p<0.01$), con $r=0.30$ (0.05-0.52) y $r^2=0.09$. El callo también demostró tener una relación lineal ($p<0.01$) con el calcidiol en la primera toma (basal), con $r=0.44$ (0.20-0.63) y $r^2=0.19$. No se encontró correlación entre la densidad ósea y los niveles de calcitriol o PTHi en la toma basal. Tampoco se demostró correlación lineal ($p>0.10$) entre los valores de la densitometría total del fémur y los niveles de calcidiol, calcitriol, o PTH en la última muestra de sangre de la rata (sacrificio).

6°.- Prueba mecánica

De los 45 animales (90 fémures) se separaron 16 al azar para estudio histológico. De los 74 restantes, 22 se desecharon por fallo en la producción de la fractura (fractura supracondílea en 4 casos), problemas en la introducción de los cabezales, rotura durante la manipulación, etc, quedando útiles para el análisis un total de 52 fémures. Todos los fémures se rompieron por la zona del callo (estadios biomecánicos I y II de White²¹⁰), salvo uno, perteneciente al grupo NS, que se fracturó por la zona del callo y por parte de hueso sano (estadio III de White²¹⁰).

Los resultados de la torsión de los fémures se presentan en la tabla 20. Se analizaron los datos, comprobándose el efecto del déficit y de la suplementación. Se compararon (tabla 21) los resultados del par máximo entre todos los grupos.

El segundo grupo (NS: normal suplementado tras la fractura) presentó un par torsor máximo significativamente superior al resto ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos N, D y DS, ni entre los grupos D y DS. Los grupos suplementados demostraron tener un par torsor máximo significativamente superior a los grupos no suplementados. En la Figura 9 se observan los resultados del par torsor de cada pata estudiada.

	N	NS	D	DS
Par Máximo (Nm)	0.120 ±0.032	0.181 ±0.043	0.128 ±0.032	0.130 ±0.048
Angulo del par máx. (°)	26.0 ±14.5	21.8 ±12.2	24.9 ±5.8	26.0 ±11.4
Rigidez (miliNm/°)	9.7 ±10.5	16.3 ±16.1	12.7 ±13.3	7.0 ±4.9
Energía absorbida (Julios)	0.023 ±0.017	0.030 ±0.021	0.029 ±0.011	0.028 ±0.019

Tabla 20: Resultados medios de los parámetros biomecánicos medidos.

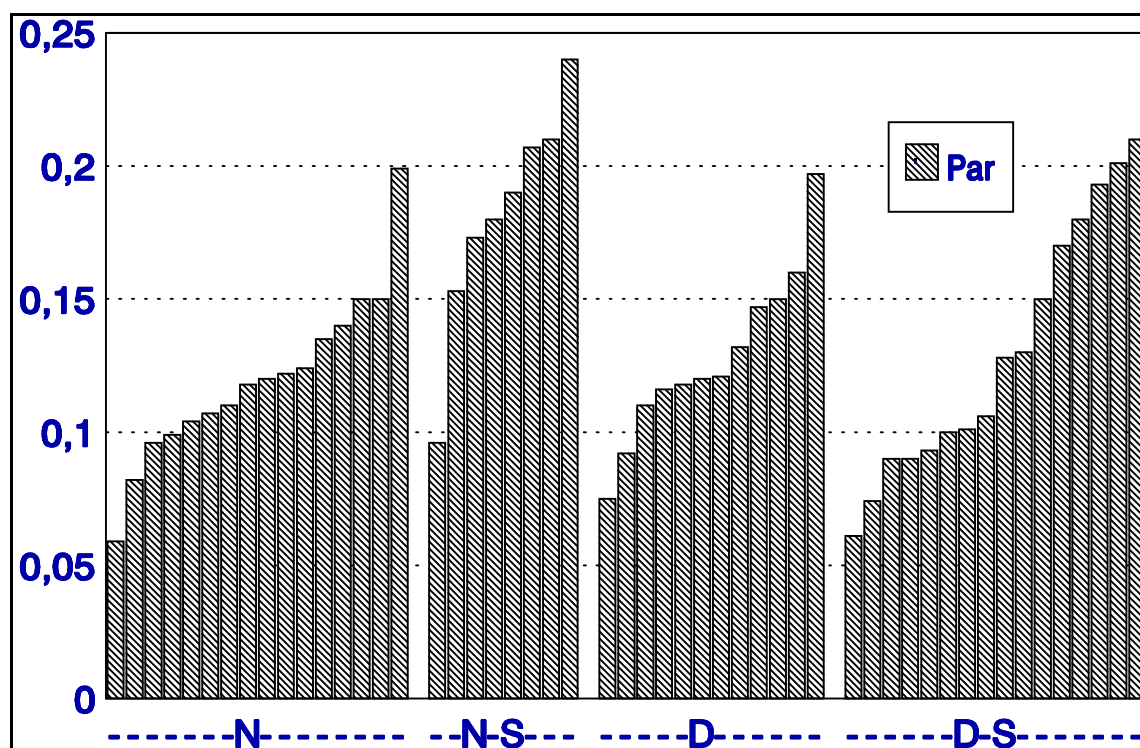


Figura 9: Gráfica esquemática de los valores del par máximo de cada fémur dentro de cada grupo.

N-NS vs D-DS	N-D vs NS-DS	N-NS	N-D	D-DS	NS-DS	N vs DS	D vs NS
C.S.	p<0.01 (con interacción)	p<0.01	N.S.	N.S.	p<0.05	N.S.	p<0.05

Tabla 21: Comparaciones del par torsor máximo de los fémures entre grupos. C.S.: casi significativo ($0.10 > p > 0.05$). N.S.: no significativo ($p > 0.10$)

También se estudiaron las tibias de los 45 animales (90 tibias). 16 tibias fueron desechadas por fallos técnicos en la manipulación de las mismas, siendo 74 las que resultaron útiles para el análisis mecánico. Los resultados de la torsión de las tibias se reflejan en la tabla 22, y de forma gráfica en la figura 10.

No existieron diferencias estadísticamente significativas en los valores de par máximo de las tibias entre ninguno de los grupos comparados (tabla 23).

	N	NS	D	DS
Par Máximo (Nm)	0.140 ±0.027	0.146 ±0.038	0.145 ±0.031	0.139 ±0.031
Angulo del par máx. (°)	32.4 ±9.8	27.4 ±7.0	30.1 ±12.0	25.8 ±10.0
Rigidez (miliNm/°)	6.1 ±2.1	6.9 ±2.2	6.8 ±2.3	7.5 ±2.7
Energía absorbida (Julios)	0.048 ±0.021	0.038 ±0.013	0.044 ±0.020	0.038 ±0.022

Tabla 22: Resultados medios de los parámetros biomecánicos medidos en tibias.

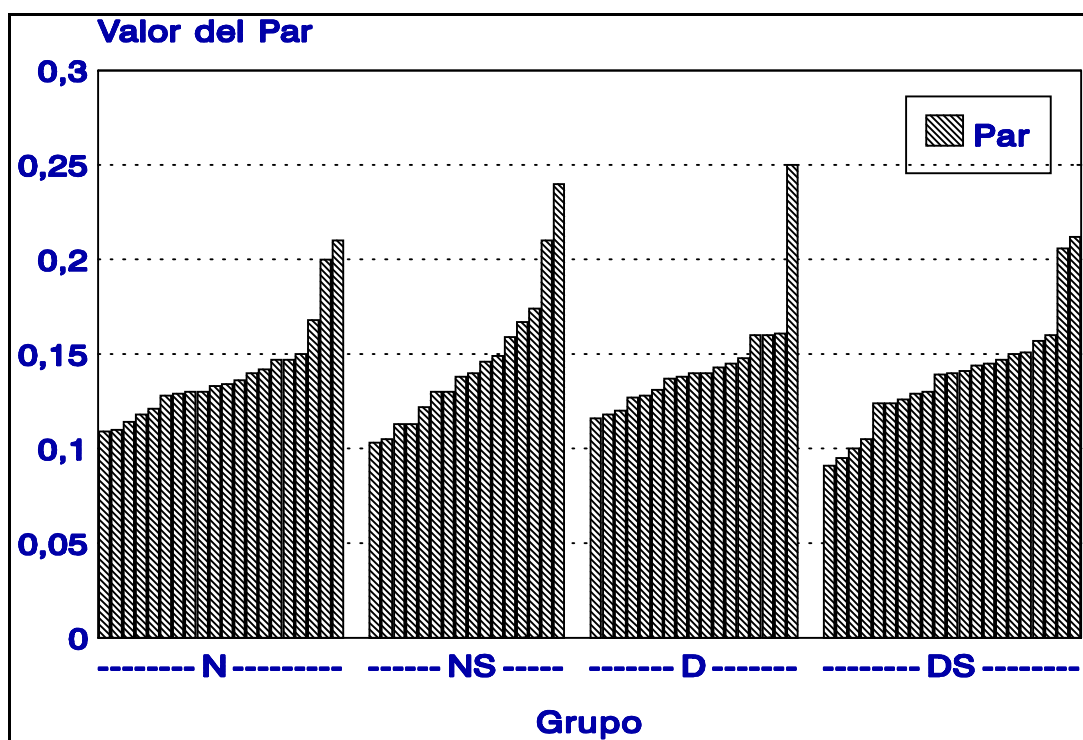


Figura 10: Gráfica esquemática de los valores del par máximo de cada tibia dentro de cada grupo.

Gr.	N-NS vs D-DS	N-D vs NS-DS	N-NS	N-D	D-DS	NS-DS	N-DS	D-NS
Sign.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Tabla 23: Comparaciones del par torsor máximo de las tibias entre grupos. N.S.: no significativo ($p > 0.10$).

También se realizó test de correlación lineal entre los valores del par máximo entre los fémures y las tibias de la misma pata, en los casos en los que se disponía de ambos datos (44

casos), obteniéndose un resultado significativo ($p < 0.01$), y un coeficiente de correlación lineal (r) de 0.48 ($r^2 = 0.23$), con un intervalo de confianza del 95% de 0.21-0.68.

Se realizó estudio de correlación lineal entre los valores de par máximo de la tibia con los resultados bioquímicos en la primera toma de sangre (basal).

Se encontró relación entre la resistencia mecánica de las tibias a la torsión y los niveles de calcidiol y calcitriol en la muestra basal (tabla 24). No se encontró correlación entre los resultados bioquímicos en la tercera toma de sangre (sacrificio) y el par máximo de la tibia.

Correlación con el par torsor máximo en tibias	calcidiol	calcitriol	PTH
Significación	$p < 0.01$	$p < 0.01$	N.S.
Coefficiente correlación (r)	0.32	0.40	-
Intervalo confianza 95% para r	0.09-0.51	0.01-0.69	-
r^2	0.10	0.16	-

Tabla 24: Resultados de la correlación entre el par torsor máximo en tibias y los resultados bioquímicos de la toma de sangre basal.

También se realizó estudio de correlación lineal entre los valores del par máximo del fémur y los resultados bioquímicos de la última muestra de sangre (sacrificio), no encontrándose correlación con ninguno de los tres parámetros bioquímicos. Sin embargo, sí existía una acusada correlación entre el par máximo y los niveles de calcidiol en el sacrificio cuando se usaban sólo los grupos N y NS ($p < 0.01$), con un valor de $r = 0.55$ (0.19-0.78), y $r^2 = 0.30$. También se realizó estudio de correlación entre los parámetros bioquímicos de la primera toma de sangre y los resultados del par torsor máximo del fémur, encontrándose los resultados reflejados en la tabla 25.

Estos resultados indican que existió correlación entre los valores de resistencia mecánica

del fémur y los valores de calcitriol y PTH en la primera toma de sangre (basal).

Correlación con el par torsor máximo en fémures	calcidiol	calcitriol	PTH
Significación	N.S.	p<0.01	p<0.01
Coefficiente correlación (r)	-	0.76	-0.69
Intervalo confianza 95% para r	-	0.41-0.92	-0.22 a -0.90
r^2	-	0.58	0.47

Tabla 25: Resultados de la correlación entre el par torsor máximo en fémures y los resultados bioquímicos de la toma de sangre basal.

Los resultados del estudio de correlación lineal entre el par máximo obtenido tras torsión de cada hueso y los resultados de densitometría se exponen en la tabla 26 (fémures) y 27 (tibias), desglosados para cada zona. En total, se obtuvieron resultados de análisis mecánico y densitometría en 46 fémures (se desecharon aquéllos con fractura supracondílea) y en 59 tibias, sobre las que se aplicó el test de regresión lineal.

Existió correlación entre el par torsor máximo soportado por cada hueso antes de la fractura y los valores de densidad ósea de cada una de las zonas del hueso correspondiente en todas las zonas, salvo en la cabeza del fémur.

	Significación	Coefficiente de correlación (r)	Intervalo de confianza del 95% para r	r ²
Extremidad distal	p<0.01	0.36	0.08 a 0.59	0.13
Callo	p<0.01	0.40	0.12 a 0.62	0.16
Zona diafisaria proximal	p<0.01	0.33	0.04 a 0.56	0.11
cabeza del fémur	N.S.	-	-	-
Total del fémur	p<0.01	0.40	0.12 a 0.62	0.16

Tabla 26: Resultados del test de regresión lineal entre el par máximo y la densitometría de 46 fémures.

	Significación	Coefficiente de correlación (r)	Intervalo de confianza del 95% para r	r ²
Epífisis distal	p<0.01	0.23	0.03 a 0.46	0.05
Diáfisis	p<0.01	0.43	0.20 a 0.62	0.19
Epífisis proximal	p<0.01	0.26	0.01 a 0.48	0.07
Total de tibia	p<0.01	0.41	0.17 a 0.60	0.17

Tabla 27: Resultados del test de regresión lineal entre el par máximo y la densitometría de 59 tibias.

DISCUSSION

1°.- Sobre la técnica experimental

1.1.- Animales de experimentación y grupos

Para cumplir los objetivos previstos, es decir, estudiar la influencia de la vitamina D sobre la consolidación de las fracturas, se ha diseñado un modelo experimental en ratas. No se ha diseñado un modelo clínico porque no están aún suficientemente desarrollados los métodos no invasivos de determinación de la resistencia mecánica del callo de fractura en el hombre¹²¹ como para permitir una valoración fiable del desarrollo de la consolidación. De todos los animales de experimentación existentes (rata^{181,192}, conejo²¹⁰, pollo¹⁰⁹, perro¹²², etc.) se seleccionó finalmente la rata tipo Wistar por ser un animal ampliamente usado en la literatura para el estudio de la consolidación de fracturas^{73,74,207}, con métodos de fractura²¹, estudio mecánico^{32,53,94,120}, y densitométrico^{66,67,181} bien definidos. Además, se ha comprobado que es un animal muy útil para el estudio de la osteoporosis^{97,192}. La mayoría de estudios experimentales existentes sobre la vitamina D y la consolidación de fracturas están realizados sobre ratas^{19,51,112}, sobre todo las tipo Wistar y Sprague-Dawley.

Se han usado ratas hembras porque éstas cierran antes que los machos los cartílagos de crecimiento⁹⁸. En machos, estos cartílagos pueden estar abiertos hasta los 30 meses de edad, mientras que en las hembras se cierran a los 6-9 meses de edad^{97,98}.

Se conoce que la vida media de la rata Wistar es de 24 meses⁹⁷, cesando la actividad ovárica (menopausia) sobre los 15 meses de edad¹⁸¹. La masa ósea de las ratas tipo Wistar alcanza el máximo alrededor del año de edad¹⁸¹, para luego ir decreciendo progresivamente. Tras el cese de la actividad ovárica, éstas pierden hueso esponjoso de forma heterogénea⁹⁷, es decir, no de la misma forma ni a la misma velocidad en todos los huesos del organismo, en una forma semejante a lo que ocurre en la osteoporosis humana, en la que se pierde hueso con más rapidez en la columna vertebral, muñeca y extremidad proximal del fémur¹³¹. En la rata tipo Sprague-Dawley, parece ser que el hueso que pierde más masa ósea con la edad es la tibia¹⁹².

Para el estudio metabólico del hueso intacto, la rata tiene el inconveniente, como casi

todos los animales de experimentación, de que en ella no se producen fracturas asociadas al desarrollo de osteopenia⁹⁷, con lo que no se puede medir la incidencia de fracturas con la edad o bajo determinados factores. Sin embargo, existen pruebas mecánicas sobre hueso intacto que nos dan una idea de la resistencia del hueso⁹⁷.

Por todas estas razones, elegimos la rata Wistar hembra de 18 meses de edad como el animal más idóneo para estudiar la influencia de la vitamina D en la consolidación de fracturas en ancianos.

Se ha indicado que en la población anciana disminuyen los niveles de 25-OH-vitamina D respecto a personas jóvenes^{14,49,68,71,80,88,100,146,148}, aunque no se ha constatado esta disminución respecto a personas jóvenes cuando se incluían en el estudio ancianos escrupulosamente sanos y con una ingesta adecuada de vitamina D¹⁸⁹. A su vez, en la población anciana, la disminución de vitamina D parece ser mayor en aquéllos pacientes con fractura de cadera^{105,126,209}, aunque esta opinión no es compartida por todos los autores¹³. Hay discrepancia en la literatura respecto a la disminución en los niveles de 1,25-(OH)₂-vitamina D y PTH entre pacientes ancianos con y sin fractura de cadera^{36,58,88,115,126}.

Se diseñaron dos grupos experimentales de ratas ancianas (18 meses de edad al iniciar el estudio): uno, en el que se induciría un déficit de vitamina D a través de una dieta libre de este elemento; y otro, control, sin modificaciones en la dieta (Esquema 1). El grupo deficitario serviría para simular lo que ocurre con los pacientes ancianos con déficit de este elemento, mientras que el grupo normal representaría a la población anciana bien nutrida en vitamina D, con niveles equiparables a los de personas más jóvenes.

El tiempo durante el cual se aplicó la dieta fue de 6 semanas, basado en la duración media de un ciclo de remodelación en la rata, que es de aproximadamente 3 semanas¹⁰⁸. Se necesita que una alteración bioquímica actúe sobre el hueso más de 3 semanas para que se noten los efectos sobre él. Por eso, para asegurar este periodo, se duplicaron estas 3 semanas. Además, 6 semanas de dieta contribuye a vaciar las reservas de vitamina D de la rata, con lo que durante el periodo de consolidación la rata estará efectivamente en hipovitaminosis D.

Para comprobar el efecto de la suplementación de vitamina D sobre ambos grupos, se subdividieron éstos en dos: uno suplementado con 25-OH-vitamina D tras la fractura y otro no suplementado. Con todo esto, resultaron 4 grupos: a) dieta normal, que siguió con dieta normal tras la fractura (grupo N); b) dieta normal, que siguió con dieta normal tras la fractura pero que se suplementó con 25-OH-vitamina D subcutánea tras la misma (grupo NS); c) dieta deficitaria, que siguió con dieta deficitaria tras la fractura (grupo D); d) dieta deficitaria, que siguió con dieta deficitaria y que se suplementó con 25-OH-vitamina D tras la fractura (grupo DS). (Esquema 1).

La pauta de suplementación de 25-OH-vitamina D se diseñó en función de la recomendación de la Conferencia de Desarrollo de Consenso, que tuvo lugar en el 4º Simposium Internacional de Osteoporosis, formado por 14 expertos¹⁵⁵, junto con otras publicaciones^{72,80,186}, que recomendaban que los ancianos deben tomar 800 U.I. de vitamina D al día. Para el tratamiento de la depleción de vitamina D, se ha propuesto⁷² la administración de una dosis de choque de 18000 U.I. cada 15 días. Con la dieta normalmente consumida por las ratas, se calculó que éstas tomaban unas 11.25 UI de vitamina D por cada 100 gr. de peso. Como 18000 UI son 18000/800 veces la dosis diaria normal recomendada para el anciano, la suplementación se calculó como 18000/800 multiplicado por 11.25 (la ingesta normal de la rata), resultando una dosis de 253.125 UI por cada 100 gr. de peso de la rata (que se redondeó a 250).

En la bibliografía se encontraron pautas de administración de vitamina D a ratas vía oral⁵¹, subcutánea¹¹² e intraperitoneal²⁰⁶. De estos estudios, sólo el primero (oral) estudiaba la relación entre la consolidación de fracturas y la administración de vitamina D, usando una dosis muy pequeña (2762 UI/10 Kg⁵¹), y sin ofrecer explicación sobre el uso de esa dosis. Para averiguar si la dosis propuesta por nosotros era aceptable, así como para averiguar la vía de administración que produjera los resultados más homogéneos de 25-OH-vitamina D en sangre, se seleccionaron 6 ratas Wistar de 4 meses de edad, dividiéndose en 3 grupos: uno con dosis oral (2 ratas), otro subcutáneo (2 ratas) y el último intraperitoneal (otras 2 ratas). Los resultados más homogéneos de 25-OH-vitamina D en sangre al 5º día de la suplementación parecieron corresponder a la administración subcutánea (aproximadamente se cuadruplicó el nivel basal en

las dos ratas). En las otras 2 vías de administración, los niveles basales se cuadruplicaron (aproximadamente) en una de las dos ratas, duplicándose en la otra, respectivamente (Tabla 1). Además, esta vía resultaba más segura que la oral y menos lesiva que la intraperitoneal. Por todo esto, se decidió usar la vía subcutánea. La dosis elegida pareció ser incluso algo excesiva (cuadruplicó los niveles basales), por lo que se decidió administrar la cantidad prevista (250 UI/100 gr) en la primera dosis, pero disminuirla a la mitad (125 UI/100 gr) a los 15 y 30 días, para evitar el riesgo de acumulación de dosis e hipervitaminosis. En los controles bioquímicos realizados tras el sacrificio de las ratas ancianas, se comprobó que la suplementación había sido efectiva, duplicando los niveles de ratas normales (Tabla 6).

Para determinar el efecto de las variables experimentales (déficit de vitamina D y suplementación) sobre la consolidación de la fractura, el estudio se podría haber diseñado de dos formas: a) sacrificando semanalmente uno o varios animales de cada grupo y realizando una curva con todos los parámetros medidos en el callo en función del tiempo de consolidación transcurrido, para posteriormente comparar las curvas entre sí. y b) sacrificando a todos los animales a la vez y luego comparando los parámetros del callo entre los distintos grupos. Para ello, es necesario la constancia de que estos parámetros avanzan en el tiempo de forma progresiva, sin sufrir altibajos durante todo el proceso de consolidación, o, al menos, durante un periodo de tiempo aceptable alrededor del momento donde se interrumpe la consolidación. Esto se ha comprobado que es cierto para los parámetros biomecánicos medidos en torsión en la consolidación de fracturas del 1/3 medio de fémur en ratas⁵⁴, durante todo el proceso de consolidación. También se ha comprobado que el porcentaje de tejido cartilaginoso y fibroso en el callo va disminuyendo a partir del 7º-9º día desde la producción de una fractura en la tibia de una rata Sprague-Dawley⁸. Respecto a la densitometría, se ha observado en fracturas de metatarsianos de ratas Wistar, que el contenido mineral óseo del callo va aumentando a medida que avanza la consolidación¹⁵⁹.

En nuestro trabajo decidimos usar este segundo diseño porque resulta más fácil comparar estadísticamente datos puntuales que curvas, y porque también parece que se necesitan menos animales (bastante costosos) para demostrar diferencias. Al usar este diseño, interesaba elegir el periodo de consolidación de la fractura que más diferencias nos pudiera

ofrecer entre los distintos grupos.

La mayoría de los autores que utilizan este sistema, sacrifican a los animales entre 4^{73,112}-5^{51,180} semanas tras la producción de la fractura, usando ratas jóvenes. Bonnarens²¹, que describe el método de producción de fracturas usado en este trabajo, evalúa la consolidación a las 5 semanas.

En ratas jóvenes, el foco fracturario recupera la resistencia mecánica del hueso intacto a las 4 semanas de consolidación^{54,120}, por lo que parece que en ellas éste es un buen periodo cuando se estudian factores que pueden retrasar la consolidación. Si se pretendiera demostrar una aceleración de la consolidación, habría que buscar un periodo de consolidación inferior a las 4 semanas en ratas jóvenes.

En ratas ancianas, sin embargo, el periodo de consolidación de una fractura es mucho más dilatado, encontrándose en ratas Wistar de 2 años de edad que tras 11 semanas de consolidación de una fractura de tibia, ésta sólo ha recuperado el 27% de la resistencia mecánica del hueso ensayada a flexión¹².

En este estudio, se seleccionaron 5 semanas como periodo de consolidación por: a) está dentro del periodo de consolidación de la rata Wistar anciana; b) no interesaba un periodo menor de consolidación porque los parámetros mecánicos podían ser tan pequeños que no fueran detectables las diferencias entre grupos; c) tampoco interesaba un periodo mucho mayor porque también pretendemos estudiar la posible aceleración de la consolidación en el suplemento de vitamina D, con lo que se necesitaba un periodo de consolidación no muy prolongado. Además, las ratas usadas eran bastante ancianas, con lo que se podían perder individuos si se prolongaba mucho el estudio (a pesar de ello, 5 ratas fallecieron en la última fase de la experimentación).

1.2.- Fractura experimental

Se han descrito en la literatura varios métodos para la producción de fracturas

experimentales en la rata. Los diferentes métodos empleados varían en tres aspectos: a) realizar la fractura de forma abierta, con cirugía^{74,193,207,210}, o de forma cerrada (sin abrir la piel en el foco de fractura)^{9,12,21,51,53,54,95,112,180}; b) sintetizar^{9,12,21,51,74,112,180,207,210} o no^{53,54,95,193} la fractura; c) fracturar la tibia^{7,8,12,85} o el fémur^{21,51,54,73,74,120,180,181}.

Respecto a si realizar la fractura de forma abierta o cerrada, se decidió esto último para evitar el riesgo de infección y de ausencia o retardo de la consolidación, debido a la importante lesión de partes blandas que implica la cirugía sobre el foco de fractura^{28,149}. Esta interferencia local se sumaría al debido a la avanzada edad de la rata^{12,54}, complicando aún más una consolidación ya de por sí delicada. El único inconveniente de realizar la fractura de forma cerrada es que no siempre se consigue un trazo de fractura homogéneo. En nuestro modelo, conseguimos una fractura perfectamente transversa sólo en el 67.8% de los casos (aunque el 95.6% fueran, en general, trazos de fractura aceptables: Tabla 3). En cualquier caso, no se infectó ninguna fractura. Finalmente, y sobre todo, la fractura cerrada es el mecanismo habitual de producción de fracturas en ancianos, con lo que se corresponde más con lo que sucede en la clínica.

También se decidió sintetizar la fractura, ya que la síntesis facilita la consolidación²⁸. Respecto al tipo de síntesis, se usó una aguja intramedular, sin fresado previo del canal medular. La ventaja de la síntesis intramedular es que alinea perfectamente los fragmentos. Esto permite que el análisis posterior de torsión ofrezca unos resultados más homogéneos que si los extremos no están alineados²⁰⁵. Además, el clavo sin fresado previo, no es una síntesis totalmente rígida, lo que permite la carga precoz del callo, acelerando aún más la consolidación^{74,208}. Una síntesis no rígida da lugar a la formación de un callo voluminoso, al contrario que en las síntesis rígidas, donde en ocasiones se produce la llamada consolidación ósea primaria o directa, pasando directamente de la fase de inflamación a la de remodelación del callo^{35,139}. La formación de callo visible resulta muy útil en nuestro caso, para llevar a cabo los estudios histológicos con mayor facilidad.

La mayoría de trabajos utilizan el fémur como hueso en el que producir la fractura, más que la tibia. Por otro lado, el fémur, al ser un hueso recto, es más fácil de enclavar. Los trabajos

que utilizan la tibia tienen, en su mayoría, como objetivo fundamental el estudio histológico^{7,206}. Por todo ello usamos el fémur en nuestro trabajo.

El modelo de fractura que nos pareció más sencillo y reproducible fue el de Bonnarens²¹, que además, ha sido muy usado en la literatura^{51,180}. Para facilitar la inserción del clavo, éste se introduce antes de producir la fractura, con lo que, además, el mismo clavo evita que los extremos óseos se desplacen mucho al fracturarse y lesionen mucho las partes blandas perifocales. El clavo, al ser elástico, se deforma en el momento de la fractura, pero posteriormente recupera su forma inicial. En ningún caso se anguló más de 5°, con lo que no se plantearon problemas a la hora de la extracción del mismo. Por otra parte, la utilización de magnitudes similares de energía para la producción de la fractura en todos los casos, asegura una mayor homogeneidad en el tipo de fractura, independientemente del trazo resultante. La fractura que se observa en clínica humana es metafisaria, pero en la rata resulta muy difícil realizar este tipo de fractura.

Tras la producción de la fractura, se suministró un analgésico (buprenorfina) para evitar el dolor postoperatorio y facilitar además la carga precoz.

3º.- Conservación de los huesos

Una vez extraídos los huesos, se conservaron a -20°, envueltos en una gasa con suero salino fisiológico. Pelker¹⁵⁶ demostró que no existían diferencias en los parámetros mecánicos (medidos mediante torsión rápida) entre los huesos largos de ratas ensayadas tras el sacrificio, y aquéllos que se ensayaron tras 15 días de congelación a -20°. En nuestro estudio, las piezas estuvieron congeladas por un periodo siempre inferior a 3 meses. De todas formas, nuestro objetivo ha sido comparar entre diversos grupos, habiendo estado todos los grupos sometidos a congelación, con lo que este factor influye por igual sobre todos los grupos. Para asegurar que efectivamente este factor afectara por igual a todos los grupos, la experimentación se llevó a cabo en 4 series, teniendo cada serie un porcentaje similar de huesos de los 4 grupos. Aunque cada serie se realizaba en un momento distinto, los miembros de una misma serie fueron fracturados, sacrificados, congelados y descongelados a la vez. Con ello, los tiempos medios de

congelación de cada grupo (N,NS,D,DS) se igualaron.

2°.- **Sobre los resultados bioquímicos**

2.1.- Comparaciones por grupos:

2.1.1.- *25-(OH)-vitamina D (Calcidiol)*: El objetivo fundamental de la medición del calcidiol en sangre fue comprobar la repercusión bioquímica de las manipulaciones en la dieta y suplementación.

En la muestra basal de sangre, los niveles medios de calcidiol fueron de 8.5 ngr/ml, similares a los valores de ratas jóvenes (4 meses de edad) de la misma raza y sexo (7.5 ngr/ml). De esta forma, se consiguió que las ratas ancianas tuvieran unos niveles adecuados de vitamina D al comenzar el estudio, similar a lo que ocurre en la población anciana bien nutrida en vitamina D¹⁸⁹.

En la extracción prefractura, tras 6 semanas de dieta, se comprobó una disminución estadísticamente significativa de los niveles de calcidiol en los grupos alimentados con una dieta deficitaria en vitamina D, respecto a los normales (3.32 versus 8.20) (Figura 2, tabla 5), así como respecto a los valores que estas mismas ratas tenían 6 semanas antes, al iniciar la dieta (Tabla 6). Esto nos permitió considerar válido el método de la alimentación sin vitamina D para conseguir animales deficitarios en esta vitamina.

Este método, para conseguir ratas deficitarias, ha sido ampliamente usado en la literatura^{99,141,198,199,202,206}. Se considera tan seguro que no en todos los trabajos se comprueba ya la consecución del déficit. En los que sí lo hacen^{99,198,206}, se observa un descenso desde aproximadamente 10 ngr/ml a la décima parte⁹⁹ en la primera semana de dieta. Estos estudios, sin embargo, han sido realizados sobre ratas del tipo Sprague-Dawley jóvenes, por lo que sus resultados no son exactamente comparables con los de este trabajo. En nuestro caso, partimos de unos niveles de calcidiol similares (8.5), y, tras las seis semanas de deficiencia, se alcanzaron niveles significativamente más bajos (3.3), pero no tanto como los obtenidos tras una dieta

deficitaria en las ratas jóvenes tipo Sprague-Dawley.

En la tercera toma de sangre, realizada en el momento del sacrificio, se observaron en el grupo normal unos niveles de calcidiol similares a los valores obtenidos en la anterior muestra (Tabla 4), sin ser las diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6).

Los grupos suplementados (NS y DS) aumentaron de forma llamativa los niveles de calcidiol respecto a la toma anterior. El grupo NS pasó de 8.20 a 16.78 y el DS de 3.32 a 14.23, con lo que se confirmó que la suplementación fue efectiva. El nivel más alto de estos dos grupos correspondió al grupo NS, aunque sin diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo DS (Tabla 5).

Las diferentes comparaciones realizadas, así como su significado, se analizan detalladamente en la tabla 5.

2.1.2.- *1,25-(OH)₂-vitamina D (calcitriol)*: No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones realizadas entre los distintos grupos. Esto puede ser debido al efecto de la fractura sobre el metabolismo del animal¹⁰⁹, a que las diferencias existentes sean de un rango tan pequeño que el sistema de análisis bioquímico utilizado no tenga sensibilidad suficiente para distinguirlos, o a que el tiempo de déficit y/o suplementación fuera demasiado corto como para que se manifestaran las diferencias.

Sí parece desprenderse de los datos obtenidos (figura 3) que los niveles de calcitriol pueden disminuir en las ratas deficitarias respecto a las normales, tanto en la segunda como en la tercera muestra de sangre, encontrándose la diferencia entre los grupos normales (N-NS) y deficitarios (D-DS) en la tercera toma en el límite de la significación (Tabla 8).

Lo que no parece tener efecto es la suplementación, o, en todo caso, un efecto inverso al esperado, ya que los niveles de calcitriol en los grupos suplementados (NS-DS) son inferiores a los de cada grupo sin suplementar (N-D)(Figura 3). Esta falta de respuesta a la suplementación podría deberse a que, al aumentar mucho los niveles de calcidiol, éste metabolito podría actuar

sobre los receptores de calcitriol, con lo que disminuiría la síntesis de éste.

La disminución de los niveles de calcitriol que se observa en la tercera toma (sacrificio) respecto a la segunda (prefractura) en todos los grupos experimentales (figura 3) pueden venir determinados por el hecho de la reacción metabólica a la fractura. Lidor¹⁰⁹, en un estudio en pollos, demostró que tras la producción de una fractura, los niveles de calcitriol disminuían respecto a controles sin fractura, disminución que se mantenía, pero de forma irregular, durante las 3 semanas siguientes. De todas formas, los resultados no son estadísticamente significativos, con lo que no podemos extraer resultados concluyentes en este punto.

2.1.3.- *PTHi*: Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones realizadas entre los distintos grupos de una misma muestra. Esto se corresponde con los hallazgos encontrados en ancianos con fractura de cadera, que aunque presenten niveles de calcidiol y calcitriol inferiores a los controles sanos (de la misma edad y sexo, pero sin fractura), no muestran diferencias estadísticamente significativas en los niveles de PTH¹²⁶. También puede ser debido al pequeño rango de diferencias que pueda existir entre grupos, que pueden ser difícilmente detectables con los métodos de análisis bioquímico disponibles.

Entre las distintas muestras de sangre, no se observaron diferencias significativas, quizá por el pequeño número de datos. Sin embargo, de forma global, si parece que los niveles de PTH aumentaron durante las primeras 6 semanas de dieta. Esto pudiera ser debido al aumento de la edad de las ratas, lo mismo que ocurre en humanos^{11,58,100,106,115,161}.

Al sacrificio, los valores de PTH disminuyeron, en general (figura 4). Varios autores^{77,118} han comprobado, en humanos, que la PTH disminuye durante la consolidación de fracturas, lo que explican por el aumento del calcio iónico en sangre que aparece por la inmovilización de la fractura. Este aumento del calcio iónico haría disminuir la secreción de PTH^{10,190}. En nuestro estudio no se inmovilizaron las fracturas, a pesar de lo cual, se comprobó esta disminución de la PTH. Quizá esto sea debido a que la realización de fracturas en ambos fémures implica dolor a la marcha cuando cede el efecto del analgésico postoperatorio, lo que

hace que el animal disminuya su actividad física. En este trabajo no se ha medido el calcio iónico debido a que la cantidad de sangre obtenida en cada toma de la rata era bastante limitada, con lo que no se dispuso de cantidad suficiente para ello. Quizá en la rata ocurra algo similar al hombre, con lo que se explicaría esta aparente disminución de la PTHi.

2.2.- Correlaciones entre calcidiol, calcitriol y PTH

No se encontraron correlaciones significativas entre estos tres parámetros, en ninguna de las tres tomas efectuadas. La causa puede estar en que las diferencias no sean detectables fielmente por el método bioquímico.

3°.- Histología

3.1.- Método histomorfométrico y planimétrico

De todas las medidas histomorfométricas descritas, tanto para el callo de fractura⁷, como para el hueso esponjoso normal (sin fractura)¹⁸⁵, la más interesante para nuestro estudio fué la determinación de la anchura de los ribetes de osteoide, ya que aporta una información indirecta muy útil sobre la existencia o no de alteraciones de la mineralización del hueso (osteomalacia)¹⁸⁴. Sobre el hueso no fracturado, se sabe que la deficiencia de vitamina D produce una disminución de la velocidad de mineralización¹⁸⁴, aunque esto nunca se ha comprobado en el callo de fractura.

Para realizar la cuantificación de los ribetes de osteoide, fue necesario procesar los cortes histológicos sin decalcificar¹⁸⁵. No se realizaron 4 mediciones en cada ribete y se obtuvo la media, tal como se ha descrito¹⁸⁴, sino que se obtuvo sólo una medición por cada ribete: su anchura máxima. La razón de esta modificación fue que en el callo, al contrario que en el hueso esponjoso normal, el número de ribetes de osteoide por unidad de superficie es muchísimo más elevado (Foto 4), por ser un hueso con un proceso acelerado de formación y remodelación⁷. En este contexto, la medición múltiple de cada ribete puede añadir complejidad y posibilidad de error a un procedimiento ya de por sí complicado. Además, las mediciones tienen la finalidad de

comparar entre diversos grupos, por lo que si se aplica la misma metodología en todos los casos, no debe de variar el resultado. No se midió el tiempo medio de retardo de la mineralización, ya que para ello era necesario el marcaje con tetraciclinas, y se consideró que ésto implicaba otro posible factor de variabilidad a nivel bioquímico. Dado que el estudio histológico se realizó sobre un pequeño número de casos (16), y que se podía usar la anchura de los ribetes de osteoide para valorar de forma indirecta la existencia de osteomalacia, decidimos no realizar el estudio con tetraciclinas.

La planimetría se realizó para comprobar si las alteraciones experimentales afectaban de alguna manera a la cantidad o proporción de los distintos componentes tisulares del callo, así como a su tamaño. Los cortes de la pieza se realizaron de forma longitudinal, para facilitar así el estudio planimétrico, siguiendo las recomendaciones de Aro⁸. Todo el estudio se llevó a cabo sólo en el corte central de la pieza, porque éste parece ser el más representativo de todos⁸.

3.2.- Resultados de la medición del osteoide

Los datos obtenidos indican que la anchura máxima media de los ribetes de osteoide en el callo de fractura puede ser similar en los distintos grupos (Figura 5, Tabla 13), aunque el número de casos es muy pequeño como para obtener conclusiones ciertas. Los dos principales parámetros que regulan el grosor del osteoide son la velocidad de aposición del osteoide (a más rapidez, mayor grosor), y la velocidad de mineralización del mismo (a mayor velocidad, menor grosor).

Respecto a la velocidad de aposición del osteoide, no parece haber razones para que existan diferencias entre los distintos grupos, ya que las únicas variables implicadas son la vitamina D y el calcio, que no se conoce que tengan relación con la velocidad de aposición de osteoide¹⁸⁴.

Respecto a la velocidad de mineralización, se ha indicado que en el hueso sano (sin fractura) ésta se retarda en casos de déficit de vitamina D¹⁸⁴. Sin embargo, este retardo podría ser debido a la hipocalcemia que conlleva dicho déficit de vitamina D, ya que se ha demostrado

que si se corrige la hipocalcemia con una dieta con elevada concentración de calcio, el contenido mineral óseo de ratas deficitarias en vitamina D es similar al de ratas no deficitarias⁹⁹, lo que implica que con el calcio se corrigen las alteraciones en la mineralización. Esta puede ser la causa que explique por qué no se encuentran diferencias entre los distintos grupos, ya que se sabe que tras la producción de la fractura se produce, el primer día, un estado de hipocalcemia (debido probablemente al stress de la fractura)^{77,133}, seguido posteriormente de hipercalcemia^{77,118}, que podría ser capaz de normalizar la velocidad de mineralización en el callo, independientemente de que se añadan suplementos o se induzca un déficit de vitamina D, lo que atenuaría las posibles diferencias.

3.3.- Resultados planimetría

Tampoco existieron diferencias significativas respecto al tamaño del callo externo entre los distintos grupos, probablemente debido al pequeño número de casos. Sí se observa una tendencia a formar más callo en el grupo NS (Tabla 14, Figura 6a) frente al N, y, de forma menos marcada, el DS frente al D, sugiriendo la formación de un callo de mayor tamaño a raíz de la suplementación. También se observó una pequeña tendencia del grupo D a formar menos callo que el N, y del DS respecto al NS, sugiriendo también que el déficit previo podría inducir una menor formación de callo.

Respecto a la composición ósea del callo, aunque tampoco existieran diferencias estadísticamente significativas debido al pequeño número de casos, se observó un menor porcentaje de tejido óseo en el grupo NS frente al N (Tabla 14, Figura 6b), así como del DS frente al D, indicando también un posible efecto de disminución del porcentaje de tejido óseo del callo debido a la suplementación, efecto no observado de forma tan clara con el déficit. Sin embargo, si lo que se mide es la superficie total de tejido óseo en el callo (con lo cual el tamaño del callo influye), observamos que estas diferencias se invierten totalmente, siendo entonces los grupos suplementados (NS y DS) los que tienen más superficie de tejido óseo en el callo respecto a los no suplementados, y los grupos normales (N, NS) más que los deficitarios (D, DS).

El estudio planimétrico en el callo de fractura presenta varias limitaciones: a) por un lado, se realiza sobre un corte central que se supone que es representativo de lo que sucede en el resto del callo, lo cual no siempre es así⁸; b) no considera la distribución espacial de los tejidos. Esto hace que no se tenga en cuenta la presencia de unión o no entre los extremos fracturarios, factor fundamental a la hora de evaluar la consolidación⁴².

La formación de más cartílago en el callo parece depender de la tensión de oxígeno. Al formarse un callo mayor, la tensión de oxígeno podría ser menor, dando lugar a más formación de cartílago^{76,89,130}. También la formación de más cartílago o tejido fibroso parece depender mucho de la movilidad entre los fragmentos^{35,130,149}. En nuestro estudio la movilidad de los fragmentos se supuso similar entre todos los grupos, pero pudo no haber sido así, dada la ligera variabilidad del trazo de fractura.

El número de casos en nuestro trabajo fue pequeño (16) porque los callos no resultaban útiles para estudio histológico tras la prueba mecánica, por lo que fue necesario realizar más animales (bastante costosos) para las secciones histológicas. Dado que la prueba mecánica se consideró más específica, se decidió no aumentar las muestras histológicas en detrimento de dicha prueba mecánica. Desde luego, se necesitan más estudios para definir exactamente el comportamiento histológico del callo de fractura bajo la influencia de la vitamina D, especialmente estudios realizados con sacrificio en distintas fases del proceso de consolidación, para poder así definir de forma concluyente la evolución histológica del callo.

4°.- Densitometría

4.1.- Método densitométrico

La densitometría con rayos X de doble energía (DEXA) es la técnica de medición de la densidad ósea más usada actualmente². Se han desarrollado métodos que han contribuido a aumentar la resolución del método, permitiendo así su aplicación a huesos pequeños^{66,67}, como los de rata, con coeficientes de variación del 0.5%⁶⁷.

Sin embargo, su aplicación al estudio del callo de fractura se ha realizado casi exclusivamente en animales grandes^{121,123}. En la rata, existe un estudio en la literatura internacional en el que se realiza densitometría al callo de fractura de tibias de ratas, con una metodología parecida a la usada en nuestro trabajo, pero usando densitometría fotónica simple. Sin embargo, en dicho trabajo⁹ no se realiza una prueba mecánica para validar el sistema como método capaz de indicar la resistencia mecánica del callo. Se sabe^{121,123,149} que el contenido mineral del callo va aumentando progresivamente, a medida que avanza la consolidación. Sin embargo, en el callo de fractura de ratas, Aro⁹ no pudo comprobar un aumento en la densidad ósea del mismo entre la 3ª y 6ª semana de consolidación.

En este trabajo se ha desarrollado y validado un sistema de aplicación de la densitometría al callo de fractura en la rata, parecido al de Aro⁹, pero usando DEXA. Consiste en medir la densidad ósea global de toda la zona del callo, y posteriormente comprobar si esta medición se corresponde con las características mecánicas del mismo, lo que nos permitiría considerar útil el método. Los resultados han confirmado la existencia de correlación lineal entre esta medición y el valor del par máximo de la prueba mecánica ($p < 0.01$), con un coeficiente de correlación de 0.40 ($r^2 = 0.16$).

Así pues, este método parece ser aceptable (existe correlación), pero tiene bastantes limitaciones como predictor de los parámetros mecánicos del callo (coeficiente de correlación relativamente bajo). Comparado con la correlación de Markel^{121,123}, que describió un coeficiente de correlación de 0.71 ($r^2 = 0.51$) en perros, el obtenido aquí es inferior, debido

fundamentalmente al pequeño tamaño del hueso y a la imposibilidad de realizar la densitometría sobre puntos concretos del callo, tal como figura en los trabajos de este autor.

La resistencia mecánica del callo parece depender más bien de la existencia o no de puentes óseos que atraviesen el callo y unan los dos extremos^{9,149}, que de la densidad ósea del mismo. La densitometría no nos puede aportar información sobre la estructura interna del callo, por lo que no es un excelente predictor de las características mecánicas del mismo. No obstante, la correlación encontrada sí indica que existe relación (aunque baja) entre la densidad ósea del callo y su resistencia mecánica, lo que concuerda con la idea de que el contenido mineral óseo del callo avanza a medida que avanza la consolidación¹⁴⁹, probablemente haciendo más frecuentes los puentes de unión a mayor densidad ósea.

Además, la densitometría fue muy útil para comprobar si la deficiencia de vitamina D fue capaz de producir una disminución en la masa ósea de la tibia y fémur (salvo en la zona del callo). Esto se discute en los apartados siguientes.

4.2.- Fémures: comparaciones por grupos

Al comparar los valores de masa ósea obtenidos por densitometría en el fémur entre los distintos grupos (N, NS, D, y DS), sólo se obtuvieron resultados estadísticamente significativos al comparar, en la cabeza del fémur, los grupos N y DS, así como al comparar los grupos deficitarios (D-DS) frente a los no deficitarios (N-NS)(Tabla 16). Esto implica que los grupos con dieta deficitaria presentaron una menor masa ósea que los no deficitarios. No se objetivó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos suplementados y sin suplementar (N-D versus NS-DS).

Esta disminución de la masa ósea en la cabeza del fémur en los grupos deficitarios en vitamina D hace pensar que en este modelo se ha conseguido inducir una disminución de masa ósea experimental con la dieta deficitaria en vitamina D durante las 11 semanas que duró el estudio. Esta disminución en la masa ósea es bastante parecida a la pérdida de densidad ósea que se produce en la osteoporosis senil humana, donde se pierde hueso y se producen más

fracturas fundamentalmente en la cadera, vértebras, húmero proximal, tibia proximal y pelvis¹³¹.

La suplementación, sin embargo, no ha sido capaz de mejorar la masa ósea, probablemente debido a que duró tan sólo 5 semanas (menos que el déficit), y que, además, ésta se produjo tras la fractura experimental, que ha podido alterar el metabolismo fosfocálcico^{99,118}, de forma que se atenúe el efecto de la suplementación. El hecho de la fractura y el dolor que se produce al apoyar el miembro fracturado hace que éste se apoye menos de lo normal, provocándose una descalcificación por desuso, que podría haber contrarrestado el posible efecto beneficioso de la suplementación.

En la zona del callo, tampoco se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Tabla 16), indicando que la densidad ósea del callo fue similar entre ellos. Esto se corresponde con el trabajo de Aro⁹, que no encontró diferencias entre la densidad ósea del callo en tibias de ratas Sprague-Dawley, entre la 3ª y 6ª semana de consolidación. En nuestro trabajo la consolidación se situó entre estos márgenes, con lo que la densitometría no pudo ofrecer información sobre una aceleración o mejora de la consolidación en este periodo.

4.3.- Tibias: comparaciones por grupos

Los resultados de la densitometría realizada en las tibias fueron significativamente diferentes en la comparación entre los grupos normales (N-NS) y deficitarios (D-DS), tanto en la epífisis distal como en la proximal (Tabla 18). Es decir, los grupos con dieta deficitaria en vitamina D presentaron menor masa ósea que los grupos no deficitarios en estas regiones. Estas son las zonas de la tibia con un mayor contenido de tejido óseo esponjoso, que es más susceptible a los cambios metabólicos del organismo que el hueso cortical.

Estos resultados se corresponden totalmente con los obtenidos en el fémur, en el sentido de que apoyan la idea de que con el déficit de vitamina D se consiguió disminuir la densidad mineral ósea de una forma parecida a lo que ocurre en la osteoporosis senil humana¹³¹.

Al igual que en el fémur, no se objetivó ninguna diferencia en la masa ósea en función

de la suplementación o no, pudiéndose aplicar en este caso la misma explicación que ya se ofreció en el caso del fémur: La suplementación duró menos tiempo que el déficit, y tuvo lugar tras la fractura experimental.

4.4.- Correlación en la densitometría fémures-tibias, y por zonas

La excelente correlación lineal encontrada en los valores de masa ósea entre la totalidad de la tibia y el fémur de una misma pata, con un coeficiente de correlación lineal de 0.77 ($r^2=0.59$), apoyan la exactitud del método de medición de la masa ósea. Con esta correlación, se puede afirmar que el 59% de la variabilidad de la densidad ósea de uno de los dos huesos puede ser explicada por la densidad ósea del otro. El resto de la variabilidad se puede atribuir a la variabilidad en la morfología y consolidación de la fractura, así como a error del método.

También se encontró una fuerte correlación en los valores de densitometría entre las distintas zonas de los fémures o las tibias (Tabla 19). Esto confirma aún más la exactitud del método densitométrico, ya que todas las zonas del hueso estuvieron sometidas a los mismos condicionantes bioquímicos, y parece lógico que los cambios en una zona del hueso se acompañen de cambios también en el resto. Sin embargo, esta correlación no fue de la misma envergadura (no tuvo la misma fuerza de asociación) en todas las comparaciones. Las diferencias más aparentes se encontraron en: a) La relación entre la zona del callo y la cabeza del fémur fue más baja ($r=0.41$) que el resto de comparaciones en el fémur ($r=0.66-0.75$). Esto puede tener relación con la diferencia hallada en la comparación de la masa ósea entre grupos. No se halló diferencia significativa entre los distintos grupos en la zona del callo, pero sí en la cabeza del fémur. Esto puede hacer que la correlación al comparar estas dos zonas sea menor. b) En la tibia, la relación entre ambas epífisis fue superior ($r=0.80$) a las demás relaciones en la tibia ($r=0.63-0.67$). Esto parece debido a que los cambios bioquímicos actúan más rápidamente sobre el hueso esponjoso (mayoritario en ambas epífisis) que en el compacto (mayoritario en diáfisis). Por eso, la correlación es mejor cuando se hace entre zonas con un mismo tipo de hueso metabólico (esponjoso) que cuando se realiza entre zonas con un tipo distinto de hueso (compacto versus esponjoso).

4.5.- Correlación de tibias y fémures con los resultados bioquímicos

Sólo se demostró la existencia de correlación entre la densitometría total de la tibia y/o fémur y los niveles de calcidiol en la primera toma de sangre. Esto parece lógico, ya que la primera toma de sangre es un reflejo del nivel de vitamina D que ha tenido la rata durante los 18 meses de vida previos, y se ha demostrado que un aumento en los niveles de vitamina D durante toda la vida de la rata es capaz de aumentar su densidad ósea vertebral¹⁸⁸. En humanos, también se ha demostrado una correlación entre los niveles de calcidiol y los valores de masa ósea en ancianos^{100,127}. Los cambios bioquímicos inducidos en las últimas 11 semanas de vida no tuvieron la fuerza suficiente para que se perdiera esta relación entre los niveles de calcidiol durante toda la vida y la masa ósea, aunque sí pudieron hacer que esta correlación apareciera más baja que la real.

Los coeficientes de correlación obtenidos (0.31 en tibias; 0.51 en fémures) fueron positivos, indicando que a mayor cifra de calcidiol, mayor masa ósea. El hecho de que el coeficiente de correlación sea superior en los fémures que en las tibias puede ser debido al efecto del callo. Para descartarlo, se realizó la correlación entre el calcidiol y la masa ósea de todo el fémur salvo la zona del callo. Los resultados así obtenidos ($r=0.30$) son bastante similares a los de las tibias ($r=0.31$), confirmándose que la correlación entre el calcidiol y el hueso sano (no fracturado) es similar. Respecto al callo, la correlación de éste con el calcidiol es mayor que la del hueso sano ($r=0.44$; $r^2=0.19$). Así pues, parece ser que un pequeño porcentaje (19%) de la variabilidad de la densidad ósea del callo viene condicionada por el nivel de calcidiol previo a las manipulaciones experimentales. Esto puede ser debido a que una mayor cifra de calcidiol previo implique un mejor metabolismo fosfocálcico, o una mejor constitución de la rata, con lo que la consolidación será mejor en estas ratas.

Sin embargo, no se constató una correlación similar con el calcitriol o la PTH en la primera muestra de sangre. En humanos, nuestro grupo de trabajo tampoco ha encontrado correlación entre estos 2 parámetros y la masa ósea¹²⁷.

Tampoco existió correlación entre la densitometría y la bioquímica en la 3ª muestra de

sangre. Esto parece debido a que las modificaciones experimentales en los niveles de calcidiol, calcitriol y PTH impuestas en un plazo breve de tiempo no son capaces de expresar, en la misma proporción, diferencias en la masa ósea global.

5°.- Prueba mecánica:

5.1.- Método de torsión

Para evaluar la consolidación de una fractura, se pueden usar, aparte de los métodos histológicos, densitométricos y mecánicos, otros, tales como la frecuencia de resonancia e impedancia^{112,179}, ultrasonidos¹²¹ e indentación^{4,111,123}.

Respecto a la frecuencia de resonancia, impedancia y ultrasonidos, presentan la ventaja de ser técnicas no invasivas, lo que permitiría su uso en humanos, pero dan una gran variabilidad de resultados^{121,179}, lo que las hace poco útiles. Lindgren¹¹², en su trabajo sobre la 1,25-(OH)₂-vitamina D y la consolidación de fracturas en ratas, realizó estudios de frecuencia de resonancia y comprobó que la correlación con los resultados de la prueba mecánica fue bastante pobre. Por todo esto, no se realizaron estos experimentos en este trabajo.

La indentación tiene la ventaja de poder aplicarse sobre la zona particular del callo que interese estudiar¹²³. Sin embargo, tiene la desventaja de, aparte de ser una técnica cruenta, presentar una gran variabilidad en los resultados^{4,111}, por lo que se desechó para nuestro trabajo.

La mayoría de autores están de acuerdo en que la mejor forma de evaluar la consolidación de una fractura es a través de un estudio mecánico^{12,32,51,53,112,122}, de forma que la prueba mecánica se ha convertido en el "patrón oro" frente al que comparar otras técnicas de valoración del callo^{121,122,123,193}.

Para evaluar las características mecánicas de los huesos, se ha considerado que la prueba debe reunir 5 características³². Estas son: 1°: La carga aplicada en el ensayo debe producir

fracturas similares a las que se producen clínicamente; 2º: La carga aplicada debe distribuirse de forma homogénea a lo largo de toda la sección para poder identificar las secciones débiles; 3º: El modelo de carga debe depender lo menos posible de la geometría del hueso; 4º: La velocidad de aplicación de la carga debe ser lo más similar posible a las condiciones de fractura normales. 5º: El aparato de ensayo debe ser lo más sencillo posible.

Los ensayos de tracción y compresión son difíciles de realizar en huesos tan pequeños (unos 3 cm. de longitud en fémures y 3.5 cm. en tibias), y no producen fracturas similares a las producidas clínicamente (salvo las fracturas por compresión de la columna vertebral). Los ensayos más realizados en la literatura son de flexión y torsión.

El modelo de flexión en 4 puntos distribuye las cargas homogéneamente en la zona central, pero la tensión transmitida al hueso es a compresión en una vertiente del hueso, y a tracción en la otra. Además, esta configuración es muy dependiente de la longitud del hueso.

La torsión, sin embargo, tiene la gran ventaja de distribuir los esfuerzos internos de forma homogénea por todo el hueso, independientemente de su longitud. Además, estas fuerzas son todas del mismo tipo, es decir, tensiones cortantes en toda la sección, aunque de mayor magnitud en la periferia. Esto representa una gran ventaja a la hora de detectar zonas débiles en el hueso, tales como una fractura en consolidación. Por lo demás, la torsión satisface los 5 puntos mencionados anteriormente³².

Respecto a la velocidad del ensayo, la mayoría de los autores consultados^{32,51,53} realizaron la prueba a alta velocidad, en un intento de aproximarse a la realidad de la producción de la fractura en un traumatismo. En este trabajo se ha llevado a cabo la prueba a baja velocidad porque la exactitud del método nos parece superior realizando un ensayo prácticamente estático. Cuando un hueso se fractura a alta velocidad, éste se rompe en un tiempo que ronda los 0.05 segundos. Parece difícil que en tan poco tiempo no exista una aceleración en el giro de la máquina de envergadura tal que pueda falsear los resultados. Sabemos que los resultados varían en función de la velocidad de giro aplicada^{34,93,104,153}. Parece difícil obtener resultados fiables con una aceleración tan inmensa. En los ensayos a baja velocidad este factor desaparece. Otro

factor es el probable desajuste entre el par registrado y el ángulo. Un desfase de microsegundos puede alterar los resultados. Sólo en el estudio de Markel¹²² se realiza la prueba a baja velocidad (15°/min., frente a 10°/min. en este trabajo), aunque no ofrece una explicación clara sobre la utilización de esta baja velocidad.

Al aplicar la carga a baja velocidad, los pares de fuerzas necesarios para producir la fractura del hueso son inferiores a los conseguidos a alta velocidad. En nuestro ensayo de fémures de ratas jóvenes, el par máximo fue de 0.318 a 0.334 Nm, mientras Einhorn⁵¹ obtiene unos resultados de 0.65 (+- 0.10) Nm a una velocidad de 550°/seg., usando ratas tipo Sprague-Dawley machos jóvenes (250 gr. de peso). Ekeland⁵³ obtiene 0.55 Nm de media en 4 fémures de ratas Wistar macho de 2 meses de edad, ensayadas a una velocidad de 2.5°/seg. Markbreiter¹²⁰ encontró 0.39 Nm de media en 14 fémures de ratas hembras tipo Sprague-Dawley, jóvenes, de 250 g de peso, ensayadas a 756°/seg. Todos estos resultados son superiores a los obtenidos en nuestro ensayo. Esto se explica por el comportamiento viscoelástico del hueso. Así pues, se confirma que el hueso presenta una mayor resistencia a la rotura cuanto mayor es la velocidad a la que se aplica la carga^{34,93,104,153}.

De los cuatro parámetros medidos en la prueba mecánica (par máximo, ángulo del par máximo, rigidez, energía absorbida), el más importante es el par máximo, ya que indica la fuerza de cizallamiento máxima que ha soportado el hueso sin romperse. Este parámetro es función, principalmente, de la zona más débil del hueso^{32,53}. En nuestra experimentación, el hueso siempre se fracturó por la zona media del callo (salvo en un caso del grupo NS, que se fracturó por ella y por hueso sano), indicando que ésta era la zona más débil del hueso (la fractura se encontraba en la mayoría de los casos en los estadios I y II de los cuatro estadios biomecánicos de la consolidación descritos por White²¹⁰). Por eso, este parámetro pareció el más importante en la evaluación mecánica del callo de fractura en nuestro caso.

Además, el par máximo es el parámetro que demostró una menor variabilidad en los ensayos previos sobre huesos de ratas jóvenes sin fractura, en los que se encontró un coeficiente de variación de tan sólo el 3.1%, frente al 9.2% del ángulo del par máximo, 10.7% de la rigidez, y 8.3% de la energía. Esta variabilidad en el par máximo del 3.1% es muy inferior al 5-11%⁵³,

15%⁵¹, ó 10-38%¹²⁰ de variabilidad descritos por otros autores. Al aplicar la torsión a los huesos fracturados, se observó un aumento de la variabilidad, que resulta lógico por que con la fractura se añade un factor de variación. El coeficiente de variabilidad del par máximo en los fémures en consolidación del grupo de ratas normales (N) fue del 26% (desviación estandar partido por la media: 0.032/0.120), también algo más bajo que los descritos por otros autores en este mismo caso, de 23-32%⁵³, 34-52%¹²² y 23-50%¹²⁰. Todo esto apoya, además, la mayor fiabilidad del método de torsión desrrollado en este trabajo.

5.2.- Fémures: comparaciones por grupos

De los resultados de la comparación del par máximo en fémures entre los distintos grupos (Tabla 21, Figura 9), se desprende que la suplementación con calcidiol tras la producción de la fractura experimental, es capaz de mejorar la resistencia mecánica del callo de fractura, ya que la comparación entre los grupos suplementados (NS y DS) y no suplementados (N y D) arrojó resultados significativamente superiores en los grupos suplementados (Tabla 21).

El estudio mediante análisis de la varianza de 2 vías indicó que los grupos suplementados presentaban una resistencia mecánica a la torsión (par máximo) superior a los no suplementados, pero con un efecto de interacción (Tabla 21). Esta interacción implica que el efecto de la suplementación fue distinto en los grupos normales respecto a los deficitarios. Esto sugiere que la suplementación en el grupo deficitario tuvo menor efecto que en el grupo normal, lo que se confirma al observar que sí existieron diferencias significativas entre el grupo normal (N) y normal suplementado (NS), pero no se demostraron estas diferencias entre el grupo deficitario (D) y deficitario suplementado (DS). Una posible explicación para esta diferencia de comportamiento es que se necesite una mayor dosis de calcidiol en el grupo deficitario para alcanzar un efecto beneficioso similar al alcanzado en el grupo normal. Hemos de tener en cuenta que el grupo deficitario estuvo también sometido a dieta deficitaria durante el periodo en el que se suministraban los suplementos de vitamina D, por lo que parece lógico pensar que parte de la dosis suministrada se empleara para completar el déficit dietético. Esto se reflejó en el análisis de sangre realizado al sacrificio, en donde, se aprecian unos niveles de calcidiol algo

inferiores en el grupo DS frente al NS, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Otra posible explicación es que se alcanzaron unos niveles similares de calcidiol al final del estudio (al sacrificio), pero estos niveles se establecieron más tarde en el grupo deficitario, con lo que una parte del periodo de formación del callo no estuvo expuesto, en el grupo DS, al efecto beneficioso del aumento en los niveles de calcidiol, reflejándose ésto posteriormente en la prueba mecánica.

En el único trabajo existente sobre la consolidación de fracturas en ratas administrando suplementos de vitamina D, no se demostró una mejora en las características mecánicas del callo con la suplementación⁵¹. Esto pudo ser debido a varios factores: 1º.- Como suplemento se usó la vitamina D, y no la 25-OH-vitamina D (calcidiol). El calcidiol, pues, podría ser más activo que la vitamina D en su efecto sobre la consolidación de fracturas. 2º.- Einhorn⁵¹ usó ratas adultas, no ancianas, y en ellas el metabolismo de la vitamina D puede ser mejor que en las ratas ancianas, por lo que la suplementación no supondría, en este grupo, ningún beneficio. 3ª.- Este mismo autor⁵¹ usó, para el estudio mecánico, un método de torsión rápida, que, como se ha indicado anteriormente, parece menos fiable que el de torsión lenta, lo que puede hacer que no aparezcan diferencias significativas en su estudio, pero sí en este trabajo.

Lindgren¹¹² y Blahos¹⁹ sí demostraron una aceleración del proceso de consolidación al suplementar ratas jóvenes con 1,25-(OH)₂-vitamina D (calcitriol). En nuestro estudio, no existieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de calcitriol entre ninguno de los 4 grupos, con lo que no parece que el efecto beneficioso sobre la consolidación, detectado en este trabajo, sea debido a las modificaciones provocadas secundariamente sobre los niveles de calcitriol.

El hecho de que la suplementación con calcidiol mejore la consolidación de las fracturas en ratas ancianas, nos sugiere que si en el ser humano ocurriera lo mismo, se podría: 1º.- Suplementar a un anciano con fractura de cadera o vertebral, inmediatamente tras la producción de ésta, para prevenir una mayor pérdida de masa ósea y el riesgo de nuevas fracturas, tal como demostró Chapuy^{40,41}. El conocimiento de que esta suplementación en el momento de la fractura no empeora la consolidación de la misma, permite iniciar el tratamiento lo antes

posible. 2°.- Mejorar la consolidación de las fracturas en el anciano, con lo que se podrían mejorar los resultados de las osteosíntesis de cadera, o el grado de cifosis vertebral resultante tras la fractura vertebral.

Respecto al efecto del déficit previo, no se ha comprobado una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos no deficitarios (N y NS) y los deficitarios (D y DS), aunque el resultado estuvo en el límite de la significación ($0.05 < p < 0.10$). Así pues, parece que el déficit de vitamina D no empeora la consolidación. Esto se confirma al comparar en grupo normal (N) frente al deficitario (D). Observamos que los resultados son similares, sin acercarse siquiera al límite de la significación (Tabla 21).

El hecho de que la significación entre los grupos deficitarios (D y DS) y no deficitarios (N y NS) esté al límite, parece debido a que el efecto de la suplementación fue mayor sobre ratas normales que sobre aquéllas con dieta deficitaria. En efecto, al comparar el grupo normal suplementado (NS) frente al deficitario suplementado (DS) se comprueba que el primero es significativamente más resistente a la torsión que el segundo ($p < 0.05$). Este mayor efecto de la suplementación sobre ratas normales que sobre deficitarias ya se ha discutido anteriormente.

Si se considera la deficiencia de vitamina D como un posible modelo de disminución de masa ósea experimental, y suponiendo que los resultados en la rata fueran extrapolables al ser humano, se podría decir que en los pacientes con disminución de la masa ósea no se encuentra comprometida la consolidación, respecto a ancianos de la misma edad y sexo.

Las diferencias en la resistencia mecánica del callo de fractura comprobadas en este trabajo no parecen corresponderse con los hallazgos de la histoplanimetría, donde no se encontraron diferencias entre los distintos grupos. La razón de este hallazgo, aparte de las limitaciones ya mencionadas del método de histoplanimetría, puede estribar en que el factor más importante para determinar la resistencia mecánica del callo es el número de puentes óseos que unen los extremos del mismo¹⁴⁹, siendo ésto muy difícil de valorar en un corte histológico en el que se trabaja en un plano bidimensional.

5.3.- Tibias: comparaciones por grupos

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores del par máximo en las tibias ensayadas, entre los distintos grupos (Tabla 23). Esto parece debido a que el ensayo de las tibias se realizó con las dos epífisis embutidas en unos cabezales de resina epoxi, con lo que resultó que lo que fundamentalmente se ensayaba era la zona de la diáfisis de la tibia (zona sometida a torsión y donde se producía la fractura). La zona de la diáfisis está compuesta fundamentalmente por tejido óseo compacto, mucho menos sensible a cambios metabólicos en un corto periodo de tiempo que el hueso esponjoso, lo que ha podido ser la causa de que no se detecten diferencias entre grupos. Esto se corresponde con los resultados de la comparación de la prueba mecánica y la densitometría, que se comentan más adelante (apartado 5.7).

5.4.- Correlación fémures-tibias (par)

Existió correlación entre los resultados del par torsor máximo en el fémur y la tibia de la misma pata ($p < 0.01$), con un coeficiente de correlación (r) de 0.48.

Esta correlación implica que en aquellas tibias con mayor resistencia mecánica, el callo formado en el fémur también presentaba mayor resistencia mecánica. Esto puede ser debido, entre otras, a dos causas: 1º.- Que las modificaciones bioquímicas tendieron a llevar la resistencia mecánica, tanto del hueso ya formado (tibia) como del callo en consolidación, en el mismo sentido para cada modificación bioquímica, de forma que los resultados se corresponden hasta cierto punto (correlación no muy fuerte). El que esta correlación no sea muy fuerte explica por qué en los fémures se han encontrado diferencias significativas entre los distintos grupos, mientras que en las tibias no; 2º.- Otra posible causa de la correlación encontrada puede depender del tamaño de la pata: un hueso de mayor grosor presenta una mayor resistencia mecánica a la torsión que uno más estrecho²⁰⁵. Se supone que un animal de mayor peso tendrá tanto la tibia como el fémur más gruesos que otro de menor tamaño. Al tener el fémur grande,

se formará mayor cantidad de callo, colocado además de forma más periférica, más resistente a la torsión, correlacionando esta mayor resistencia con la mayor resistencia de la tibia de la misma pata, que también será más grande. Aparte de estas dos posibles causas, puede haber otras más, tales como la existencia de algunas patologías en algunos animales, mejor metabolismo fosfocálcico, constitución del animal, etc., que afecten de forma simultánea a ambos huesos.

5.5.- Correlación de la resistencia de las tibias con la bioquímica

Se encontró correlación ($p < 0.01$) (Tabla 24) entre los resultados del par torsor máximo encontrado tras el ensayo de las tibias y los niveles de calcidiol ($r=0.32$) y calcitriol ($r=0.40$) en la primera toma de sangre.

Esto confirma lo ya expuesto a propósito de la correlación entre los valores de la masa ósea y los parámetros bioquímicos en tibias, en el sentido de que las mediciones bioquímicas en la primera toma de sangre son un reflejo de los niveles bioquímicos a los que ha estado expuesta la rata durante toda su vida, y ésto ha condicionado hasta cierto punto las propiedades mecánicas de sus huesos¹⁸⁸. Al estudiar el par máximo encontramos también relación con el calcitriol, relación no encontrada en el caso de la densitometría. Estos resultados indican que los niveles de calcitriol condicionan hasta cierto punto (correlación baja, $r=0.40$) la resistencia mecánica del hueso ensayado a torsión, aunque esta influencia no parece estar mediatizada por cambios en la masa ósea medida por densitometría. Quizá el efecto a largo plazo del calcitriol sobre el hueso sea un cambio en la microarquitectura del mismo, sin cambios apreciables en la masa ósea, o quizá exista un factor común (mejor nutrición, constitución, etc.) que condicione ambos parámetros. En la literatura hay gran disparidad de opiniones sobre los efectos del calcitriol sobre el hueso^{44,69,79,91,200}, en función de la dosis de administración, estado patológico previo, etc. Se necesitan más estudios, administrando calcitriol a largo plazo, para confirmar estos resultados.

No se encontró relación con los niveles previos de PTH. Parece ser, pues, que los

niveles previos de esta hormona no influyen sobre la resistencia mecánica del hueso intacto.

Tampoco existió correlación entre el par máximo de las tibias y los resultados bioquímicos en la tercera y última toma de sangre, probablemente debido a que las alteraciones bioquímicas inducidas en un periodo corto de tiempo (11 semanas) no fueron capaces de alterar de forma muy evidente las propiedades mecánicas del hueso sano.

5.6.- Correlación de la resistencia de los fémures con la bioquímica

No se encontró correlación entre los parámetros bioquímicos en la última toma de sangre y los resultados de la resistencia máxima a la torsión en fémures. Quizá la causa de esto estribe en la gran cantidad de modificaciones bioquímicas inducidas (déficit y suplementación, en 4 combinaciones), con diferente efecto sobre la resistencia mecánica del callo (la suplementación sí, el déficit no), pero con efecto similar sobre los niveles de calcidiol en sangre. Por eso, si sólo usamos los grupos N y NS, en los que la única modificación es la suplementación, sí se observa una correlación entre los niveles de calcidiol y la resistencia mecánica del hueso (correlación positiva, $r=0.55$), lo que está en la misma línea de confirmar el efecto beneficioso de la suplementación de calcidiol sobre la resistencia mecánica del callo. Respecto a los niveles de calcitriol y PTH, no se demostraron diferencias significativas entre los distintos grupos, pero sí diferencias en la resistencia mecánica del fémur entre los distintos grupos, lo que puede explicar esta falta de correlación. Además, los valores de calcitriol y PTH pueden haberse visto modificados por el hecho de la respuesta a la fractura^{77,109,118}, lo que dificulta aún más el hallazgo de correlaciones.

Sí existió correlación, y además bastante acusada, entre los niveles de calcitriol y PTH en la primera muestra de sangre (previo a la manipulación experimental) y la resistencia a la torsión de los fémures ($r=0.76$ y -0.69 , respectivamente) (Tabla 25).

Quizá la razón de esto estribe en que con las modificaciones de la dieta no se consiguió modificar de forma significativa los niveles de calcitriol o PTH entre los distintos grupos

(Tablas 9 y 12), de forma que el nivel de calcitriol o PTH previo fue un factor condicionante sobre la consolidación de la fractura, que actuó durante todo el periodo de consolidación. En el caso del calcitriol, la correlación fue positiva, con lo que a mayor tasa de calcitriol previa, mejor consolidación. Estos dos factores, la existencia de correlación en los niveles de calcitriol antes de la manipulación experimental (reflejo de los niveles de calcitriol durante toda la vida) con la resistencia mecánica del callo de fractura, y el que con la manipulación experimental no se hayan modificado de forma significativa estos niveles, apoya los trabajos de Lindgren¹¹² y Blahos¹⁹ en el sentido de que la suplementación de calcitriol mejora la consolidación en ratas. Es decir, parece que los niveles de calcitriol durante el periodo de consolidación de la fractura podrían condicionar la aceleración del proceso de consolidación. Otra posible explicación es que en ratas con mayor nivel de calcitriol exista un mejor balance cálcico, por predisposición genética, lo que hace que desarrollen una mejor consolidación. De todas formas, se necesitan más trabajos que confirmen esta hipótesis.

Algo parecido podría suceder con la PTH. En este caso, la correlación es negativa ($r=-0.69$), con lo que a mayores niveles de PTH, peor consolidación, lo que puede ser científicamente plausible, ya que la PTH es una hormona que promueve la resorción ósea⁶². Sin embargo, se ha demostrado que el tratamiento crónico a bajas dosis con PTH tiene un efecto anabólico sobre el hueso¹²⁵, lo que pone en duda la simplicidad del planteamiento anterior. Además, en este trabajo hemos comprobado que no existe relación entre los niveles de PTH basal y la resistencia mecánica de las tibias. Se necesitan más estudios, con un control más estricto de los niveles de PTH durante el proceso de consolidación, para confirmar esta hipótesis.

La falta de correlación de la resistencia mecánica del fémur con los niveles de calcidiol previos al inicio de la manipulación experimental (1ª toma: basal) parece lógica (Tabla 25), ya que en este caso sí se alteró de forma marcada este metabolito de la vitamina D durante el desarrollo de la experimentación, con lo que sí tenemos la certeza de que el callo se formó bajo diferentes niveles de calcidiol en cada grupo experimental. No tendría sentido que la resistencia mecánica del callo tuviera relación con los niveles previos de calcidiol. Más lógico resulta que tenga relación con los niveles en la última toma de sangre (sacrificio), punto que ya se discutió

anteriormente.

5.7.- Correlación resistencia mecánica - densitometría en fémures y tibias

En los fémures, se observa la existencia de correlación lineal entre la resistencia mecánica y la densidad ósea de todas las zonas del fémur salvo la cabeza (Tabla 26). De todas las correlaciones encontradas, la más fuerte ($r=0.40$) es la de la zona del callo, que es la zona más débil del hueso y la que se explora fundamentalmente al medir la resistencia máxima a la torsión. Con esto se comprueba lo ya afirmado por otros autores^{121,123,149}, en el sentido de que la densidad ósea del callo correlaciona con la resistencia mecánica del mismo. Esto puede depender del hecho de que la mayor resistencia mecánica depende de la existencia de más puentes óseos entre los extremos, lo cual será más frecuente en un callo con mayor densidad ósea, que en otro con menos. Sin embargo, el hecho de que esta correlación no sea muy fuerte ($r=0.40$) explica por qué sí se han encontrado diferencias significativas entre grupos usando la torsión y no con la densitometría.

La existencia de correlación entre el par torsor máximo y la masa ósea de la extremidad distal del fémur y zona diafisaria proximal ($r=0.36$ y 0.33 , respectivamente), parece deberse más bien al hecho de que un factor común, tal como los cambios bioquímicos, constitución, grosor del hueso, etc. actuó sobre este hueso y sobre el callo en el mismo sentido, provocando la existencia de relación, que no se puede explicar desde el punto de vista de la causalidad. Esta relación debida a un factor común viene apoyado por la existencia de correlación fuerte ($r=0.66-0.75$) entre los valores de masa ósea de la extremidad distal del fémur, el callo y la zona diafisaria proximal (Tabla 19). El que exista una menor correlación entre el callo y la cabeza del fémur ($r=0.41$) explica por qué no aparece correlación entre la resistencia mecánica y la densidad ósea de la cabeza del fémur.

En las tibias ocurre algo similar. La correlación es mayor en este caso con la diáfisis porque ésta es la zona que se explora fundamentalmente al realizar la torsión (es la zona libre entre cabezales y donde se produce la fractura). En la literatura^{48,186} se ha comprobado la existencia de relación entre la densidad ósea y la resistencia mecánica del hueso intacto.

La existencia de correlación (más débil: $r=0.23-0.26$) con las otras zonas se puede

explicar con argumentos similares a los ya expuestos a propósito del fémur. Algún factor común (bioquímica, constitución, etc.) actuó sobre todo el hueso, de forma más o menos similar, haciendo que la relación existente entre la densidad ósea de la diáfisis y la resistencia mecánica del hueso, se haga extensiva al resto de zonas. Ya se ha comentado que la densidad ósea entre las tres zonas de la tibia presenta una estrecha correlación ($r=0.63-0.80$). Como las alteraciones bioquímicas parece ser que no actúan con la misma rapidez y profundidad sobre el hueso compacto (diáfisis) que sobre el esponjoso (epífisis), esto explica por qué la correlación con las zonas epifisarias es menor que con la zona diafisaria, que es la zona que se valora principalmente con el método de torsión.

CONCLUSIONES

1°.- El diseño experimental desarrollado en este trabajo, usando ratas Wistar hembras de 18 meses de edad, dividido en 4 grupos (N, NS, D, DS) parece un modelo válido para el estudio de la posible influencia del déficit y la suplementación de vitamina D en la consolidación de fracturas en animales ancianos.

2°.- El modelo de prueba mecánica de torsión a baja velocidad parece un método altamente fiable para el estudio de la resistencia mecánica del hueso de rata.

3°.- La determinación de la densidad ósea en el callo de fractura de la rata Wistar parece útil para valorar la consolidación, aunque no lo suficiente para sustituir a la prueba mecánica.

4°.- La suplementación con 25-OH-vitamina D mejora la resistencia mecánica del callo de fractura de 5 semanas de evolución de las ratas Wistar ancianas. Sin embargo, la deficiencia en este elemento no la empeora respecto a las normales. No se aprecian diferencias en la densidad ósea del callo en función de la suplementación o el déficit de vitamina D. Tampoco se aprecian diferencias a nivel histológico entre los distintos grupos, en el tiempo de consolidación estudiado.

5°.- La deficiencia de vitamina D produce una pérdida de masa ósea en la cabeza del fémur, así como en las epífisis de la tibia. No se aprecian diferencias en cuanto a la masa ósea del hueso sano en función de la suplementación con 25-OH-vitamina D. La resistencia mecánica del hueso intacto no parece alterarse ni con la suplementación ni con el déficit de vitamina D, producido experimentalmente durante 5 y 11 semanas, respectivamente.

6°.- La densidad ósea del hueso sano y del callo de fractura parece depender en gran medida de los niveles de calcidiol al inicio de la experimentación.

7°.- La resistencia mecánica del hueso intacto parece depender, parcialmente, de los niveles de calcidiol y calcitriol al inicio del estudio.

8°.- La resistencia mecánica del callo de fractura parece depender, parcialmente, de los niveles de calcitriol y PTH previos a la experimentación.

RESUMEN

Para conocer el efecto de la vitamina D sobre la consolidación de las fracturas, se diseñó un modelo experimental en rata Wistar hembra de 18 meses de edad. 55 ratas iniciaron el estudio, dividiéndose aleatoriamente en dos grupos: uno, en el que se indujo un déficit dietético de vitamina D durante 6 semanas, y otro, control, sin déficit. Tras este periodo, se realizó una fractura experimental en el tercio medio de ambos fémures. En ese momento se subdividieron ambos grupos en dos: uno en los que se realizó una suplementación con calcidiol durante la consolidación de la fractura, y otro en el que no (control). Tras 5 semanas de consolidación, se sacrificaron los animales, extrayéndose los fémures y las tibias. Se obtuvieron muestras de sangre al inicio del estudio, 2 días antes de la fractura, y al sacrificio, determinándose los niveles séricos de calcidiol, calcitriol y PTH.

Se realizó estudio histológico sobre 16 callos de fractura, midiéndose la anchura máxima media de los ribetes de osteoide, así como la proporción de los distintos tipos de tejido (óseo, cartilaginoso, fibroso) en el callo. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos.

Se aplicó la densitometría a 57 fémures y 69 tibias. No se apreciaron diferencias en la densidad ósea del callo en función de la suplementación o el déficit de vitamina D. La deficiencia de vitamina D produjo una pérdida de masa ósea en la cabeza del fémur, así como en las epífisis de la tibia. No se apreciaron diferencias en cuanto a la masa ósea del hueso sano en función de la suplementación con 25-OH-vitamina D. La densidad ósea del hueso sano y del callo de fractura correlacionó con los niveles de calcidiol al inicio de la experimentación.

También se realizó ensayo de torsión a baja velocidad de los fémures y las tibias. La suplementación con 25-OH-vitamina D mejoró de forma significativa la resistencia mecánica del hueso fracturado. Sin embargo, la deficiencia en este elemento no empeoró dicha consolidación respecto a las ratas normales. La resistencia mecánica del callo de fractura pareció depender en parte de los niveles de calcitriol y PTH previos a la experimentación. La resistencia mecánica del hueso intacto no pareció alterarse ni con la suplementación ni con el déficit de vitamina D, producido experimentalmente durante 5 y 11 semanas, respectivamente. La

resistencia mecánica del hueso intacto parece depender, en parte, de los niveles de calcidiol y calcitriol al inicio del estudio.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abe, E; Miyaura, C; Sakagami, H et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:4990-9, 1981.
- 2.- Adams, JE. Osteoporosis and bone mineral densitometry. *Curr Opin Radiol*, 4:11-20, 1992.
- 3.- Agus, ZS; Chiv, PJS; Goldberg, M. Regulation of urinary calcium excretion in rat. *Am J Physiol*, 232:F545-53, 1977.
- 4.- Aitken, GK; Bourne, RB; Finlay, JB; Rorabeck, CH; Andrae, PR. Indentation stiffness of the cancellous bone in the distal human tibia. *Clin Orthop*, 201:264-70, 1985.
- 5.- Alho, A; Benterud, JG; Ronningen, H; Hoiseth, A. Prediction of disturbed healing in femoral neck fracture. *Acta Orthop Scand*, 63:639-44, 1992.
- 6.- Andriole, VT; Nagel, DA; Southwick, WO. A paradigm for human chronic osteomyelitis. *J Bone Joint Surg*, 55-A:1511-5, 1973.
- 7.- Aro, HT; Wippermann, BW; Hodgson, SF; Chao, EYS. Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing. *J Orthop Res*, 8:238-46, 1990.
- 8.- Aro, HT; Eerola, E; Aho, AJ. Determination of callus quantity in 4-week-old fractures of the rat tibia. *J Orthop Res*, 3:101-8, 1985.
- 9.- Aro, HT; Wippermann, BW; Hodgson, SF; Wahner, HW; Lewallen, DG; Chao, EYS. Prediction of properties of fracture callus by measurement of mineral density using micro-bone densitometry. *J Bone Joint Surg*, 71-A:1020-30, 1989.
- 10.- Aurbach, GD. Regulation of secretion of parathyroid hormone. *Adv. Nephrol*, 11:131-7, 1982.
- 11.- Avioli, LV. Hormonal alterations and osteoporotic syndromes. *J Bone Miner Res*, 8 (Supp.2):S511-4, 1993.
- 12.- Bak, B; Andreassen, TT. The effect of aging on fracture healing in the rat. *Calcif Tissue Int* 45:292-7, 1989.
- 13.- Baker, MR; McDonnell, H; Peacock, M; Nordin, BEC. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations in patients with fractures of the femoral neck. *Br Med J*, I:589-90, 1979.
- 14.- Baker, MR; Peacock, M; Nordin, BEC. The decline in vitamin D status with age. *Age Ageing*, 9:249-52, 1980.
- 15.- Barraguy, JM; France, MW; Corless, D; Gupta, SP; Switala, S; Boucher, BJ; Cohen, RD. Intestinal cholecalciferol absorption in the elderly and in younger adults. *Clin Sci*

Mol Biol, 55:213-20, 1978.

16.- Barrios, C; Broström, LA; Stark, A; Walheim, G. Healing complications after internal fixation of trochanteric hip fractures: the prognostic value of osteoporosis. J Orthop Traum, 7:438-42, 1993.

17.- Bassett, CAL; Becker, RO. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. Science, 137:1063-4, 1962.

18.- Betés, M. Los factores vitamínicos D-3 en terapéutica. Ciencia Médica, 6:66-71, 1989.

19.- Blahos, J; Babicky, A; Porsova, I; Kolar, J. Effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on fracture healing and on general posttraumatic skeletal response in rats. Endocr Exper, 23:287-94, 1989.

20.- Boland, R. Role of vitamin D in skeletal muscle function. Endocr Rev, 7:434-48, 1986.

21.- Bonnarens, F; Einhorn, TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res, 2:97-101, 1984.

22.- Brighton, CT. Principles of fracture healing. Instr Course Lect, 33:60-82, 1984.

23.- Brighton, CT; Pollack, SR. Treatment of recalcitrant non-union with a capacitively coupled electrical field: a preliminary report. J Bone Joint Surg, 67-A:577-85, 1985.

24.- Brighton, CT; Hunt, RM. Histochemical localization of calcium in fracture callus with potassium pyroantimonate. J Bone Joint Surg, 68-A:703-715, 1986.

25.- Brighton, CT et al. Fracture healing in the rabbit fibula-when subjected to various capacitively coupled electrical fields. J Orthop Res, 3:331-40, 1985.

26.- Brommage, R; DeLuca, HF. Evidence that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is the physiologically active metabolite of vitamin D₃. Endocrine Rev, 6:491-511, 1985.

27.- Brown, EM. Four-parameter model of the sigmoidal relationship between parathyroid hormone release and extracellular calcium concentration in normal and abnormal parathyroid tissue. J Clin Endocrinol Metab, 56:572-81, 1983.

28.- Buckwalter, JA; Cruess, RL. Healing of the musculoskeletal tissues. En: Rockwood, CA; Green, DP; Bucholz, RW (Eds.). Fractures in adults, 3ª edición, Ed. JB Lippincott, Philadelphia, pp. 181-222, 1991.

29.- Buckwalter, JA; Cooper, RR. Bone structure and function. Instr Course Lect, 36:27-

48, 1987.

30.- Burckhardt, P. Treatment of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol*, 4:402-9, 1992.

31.- Burstein, AH; Zika, JM; Heiple, KG; Klein, L. Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone. *J Bone Joint Surg*, 57-A:956-61, 1975.

32.- Burstein, AH; Frankel, VH. A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech*, 4:155-8, 1971.

33.- Burstein, AH; Reilly, DT; Martens, M. Aging of bone tissue: mechanical properties. *J Bone Joint Surg*, 58-A:82-86, 1976.

34.- Carter, DR; Hayes, WC. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. *J Bone Joint Surg*, 59-A:954-62, 1977.

35.- Carter, DR; Blenman, PR; Beaupré, GS. Correlations between mechanical stress history and tissue differentiation in initial fracture healing. *J Orthop Res*, 6:736-48, 1988.

36.- Compston, JE; Silver, AC; Croucher, PI; Brown, RC; Woodhead, JS. Elevated serum intact parathyroid hormone levels in elderly patients with hip fracture. *Clin Endocrinol Oxf*, 31:667-72, 1989.

37.- Cruess, RL; Sakai, T. Effect of cortisone upon synthesis rates of some components of rat bone matrix. *Clin Orthop*, 86:253-9, 1972.

38.- Culling, CFA. *Handbook of histopathological techniques*. Ed. Butterworths, Londres, 1963.

39.- Chambers, TJ; Magnus, CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J Pathol.*, 136:27-34, 1981.

40.- Chapuy, MC et al. Vitamin D₃ and calcium to prevent hip fractures in elderly women. *New Engl J Med*, 327:1637-42, 1992.

41.- Chapuy, MC; Arlot, ME; Delmas, PD; Meunier, PJ. Effect of calcium and cholecalciferol treatment for three years on hip fractures in elderly women. *Br Med J*, 308:1081-2, 1994.

42.- Charnley, J. *The closed treatment of common fractures*, 3ª edición, ES Livingstone Ltd, Edinburgh, 1970.

43.- Chesnut III, CH. Tratamiento farmacológico: calcitonina, bifosfonatos, esteroides anabólicos y PTHh (1-34). En: Riggs, BL; Melton, LJ. *Osteoporosis*. Raven Press, pp. 437-49, 1988.

- 44.- Christiansen, C; Christensen, MS; Rodbro, P; Hagen, C; Transbol, I. Effect of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ in itself or combined with hormone treatment in preventing postmenopausal osteoporosis. *Eur J Clin Invest*, 11:305-9, 1981.
- 45.- DeLuca, HF; Schnoes, HK. Vitamin D: recent advances. *Ann. Rev. Biochem*, 52:411-39, 1983.
- 46.- Díez Pérez, A. Osteoporosis. Ed. MCR, Barcelona, 1992. 72pp.
- 47.- Díez, A; Martínez, MT; Puig, J; Cucurull, J; Serrano, S; Mariñoso, ML. Osteoporosis. En: Serrano, S; Aubia, J; Mariñoso, ML (Eds.). *Patología ósea metabólica*. Ed Doyma, Barcelona, 1990, pp. 92-117.
- 48.- Díez, A; Puig, J; Martínez, MT. Métodos no invasivos de determinación de la masa ósea. En: Serrano, S; Aubia, J; Mariñoso, ML (Eds.). *Patología ósea metabólica*. Ed Doyma, Barcelona, pp. 11-27, 1990.
- 49.- Eastell, R; Heath, H; Kumar, R; Riggs, BL. Factores hormonales: PTH, vitamina D y calcitonina. En: Riggs, BL; Melton, LJ. *Osteoporosis*. Raven Press, pp. 405-21, 1988.
- 50.- Einhorn, TA; Hirschman, A; Kaplan, C; Nashed, R; Devlin, VJ; Warman, J. Neutral protein-degrading enzymes in experimental fracture callus: a preliminary report. *J Orthop Res*, 7:792-805, 1989.
- 51.- Einhorn, TA; Bonnarens, F; Burstein, AH. The contributions of dietary protein and mineral to the healing of experimental fractures. *J Bone Joint Surg*, 68-A:1389-95, 1986.
- 52.- Einhorn, TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg*, 77-A:940-56, 1995.
- 53.- Ekeland, A; Engesaeter, LB; Langeland, N. Mechanical properties of fractured and intact rat femora evaluated by bending, torsional and tensile tests. *Acta Orthop Scand*, 52:605-13, 1981.
- 54.- Ekeland, A; Engesaeter, LB; Langeland, N. Influence of age on mechanical properties of healing fractures and intact bones in rats. *Acta Orthop Scand*, 53:527-34, 1982.
- 55.- Erden, RG; Weiser, H; Sinovatz, F; Rambeck, W; Zucker, H. Vitamin D metabolites prevent osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*, 50:228-36, 1992.
- 56.- Eriksson, SAV; Lindgren, JU. Combined treatment with calcitonin and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ for osteoporosis in women. *Calcif Tissue Int*, 53:26-28, 1993.
- 57.- Eventov, I; Frisch, B; Alk, D; Eisenberg, Z; Weisman, Y. Bone biopsies and serum

vitamin D levels in patients with hip fracture. *Acta Orthop Scand*, 60:411-3, 1989.

58.- Falch, JA; Mowé, M; Bohmer, T; Haug, E. Serum levels of intact parathyroid hormone in elderly patients with hip fracture living at home. *Acta Endocrinol*, 126:10-12, 1992.

59.- Faugère, MC; Ikamoto, S; DeLuca, HF; Malluche, HH. Calcitriol corrects bone loss induced by oophorectomy in rats. *Am J Physiol*, 250:E35-38, 1986.

60.- FDA. Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Division of metabolism and endocrine drug products, Food and Drug Administration (FDA), 1993.

61.- Finsen, V; Haave, O. Changes in bone-mass after tibial shaft fracture. *Acta Orthop Scand*, 58:369-74, 1987.

62.- Fitzpatrick, LA; Coleman, DT; Bibezikian, JP. The target tissue actions of parathyroid hormone. En: Coe, FL; Favus, MJ (editores): Disorders of bone and mineral metabolism. Raven Press, New York, 1991. pp. 123-148.

63.- Fleet, JC; Bruns, ME; Hock, JM; Wood, RJ. Growth hormone and parathyroid hormone stimulate intestinal calcium absorption in aged female rats. *Endocrinology*, 134:1755-60, 1994.

64.- Frost, HM. The biology of fracture healing. *Clin Orthop*, 248:283-93, 1989.

65.- Fujisawa, Y; Kida, K; Matsuda, H. Role of change in vitamin D metabolism with age in calcium and phosphorus metabolism in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 59:719-26, 1984.

66.- Gala, J; Díaz Curiel, M; Biezma, M; De la Piedra, C; López Gavilanes, E. Biochemical and densitometric changes induced by oophorectomy in rats. Comunicación al 15º annual meeting of the american society for bone and mineral research. Tampa, Florida, USA, septiembre de 1993.

67.- Gala, J; Diaz Curiel, M; de la Piedra, C; López, E. Evaluation of bone mass in rats through dual-energy X-ray absorptiometry: analysis of correlation between bone mass and mineral composition. En: Ring, EFJ (Ed.). Current research in osteoporosis and bone mineral measurement II. Ed. BIR, Londres, 1992.

68.- Gallagher, JC; Riggs, BL; Eisman, J; Hamstra, A; Arnaud, SB; DeLuca, HF. Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients. Effect of age and dietary calcium. *J Clin Invest*, 64:729-36, 1979.

69.- Gallagher, JC; Riggs, BL; Recker, RR; Goldgar, D. The effect of calcitriol on patients with postmenopausal osteoporosis with special reference to fracture frequency. *Proc Soc Exp Biol Med*, 191:287-292, 1989.

70.- Gallagher, JC. Tratamiento farmacológico de la osteoporosis: calcio, estrógenos y vitamina D. En: Riggs, BL; Melton, LJ. *Osteoporosis*. Raven Press, pp.423-36, 1988.

71.- Goldray, D; Mizrahi, E; Merdler, C; Edelstein, M; Algoetti, A; Eisenberg, Z; Jaccard, N; Weisman, Y. Vitamin D deficiency in elderly patients in a general hospital. *J Am Geriatr Soc*, 37:589-92, 1989.

72.- González García, JJ. Alteraciones del metabolismo fosfocálcico y de la vitamina D en la tuberculosis. Tesis doctoral. UAM, Madrid, 1992.

73.- Grundnes, O; Reikeras, O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*, 64:340-2, 1993.

74.- Grundnes, O; Reikeras, O. Effects of instability on bone healing. Femoral osteotomies studied in rats. *Acta Orthop Scand*, 64:55-8, 1993.

75.- Gurley, AM; Roth, SI. Bone. En: Sternberg, SS (Ed.), *Histology for pathologists*. Raven Press, New York, pp. 61-79, 1992.

76.- Ham, AW. *Tratado de histología*. J.B.Lippincott, Philadelphia, 7ª edición, 1975.

77.- Hardy, JRW; Conlan, D; Hay, S; Gregg, PJ. Serum ionised calcium and its relationship to parathyroid hormone after tibial fracture. *J Bone Joint Surg*, 75-B:645-9, 1993.

78.- Haussler, MR; McCain, TA. Basic and clinical concepts related with the vitamin D metabolism and action. *New Engl. J. Med*, 297:974-9, 1977.

79.- Hayes, WC; Myers, ER; Morris, JN; Gerhart, TN; Yett, HS; Lipsitz, LA. Impact near the hip dominates fracture risk in elderly nursing home residents who fall. *Calcif Tiss Int*, 52:192-8, 1993.

80.- Heaney, RP. Bone Mass, Nutrition, and Other Lifestyle Factors. *Am J Med*, 95(supp. 5A):29S-33S, 1993.

81.- Heikinheimo, RJ et al. Annual injection of vitamin D and fractures of aged bones. *Calcif Tissue Int*, 51:105-10, 1992.

82.- Henneman, PH; Wallach, S. A review of the prolonged use of estrogens and androgens in postmenopausal and senile osteoporosis. *Arch Intern Med*, 100:705-9, 1957.

83.- Henry, HL; Norman, AW. Vitamin D: metabolism and biological actions. *Ann.*

Rev. Nutr, 4:493-9, 1984.

84.- Henry, HL; Norman, AW. Metabolism of vitamin D. En: Coe, FL; Favus, MJ (editores): Disorders of bone and mineral metabolism. Raven Press, New York, pp. 149-162, 1991.

85.- Hiltunen, A; Vuorio, E; Aro, HT. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. J Orthop Res, 11:305-14, 1993.

86.- Holbrook, TL; Barrett-Connor, E; Wingard, DL. Dietary calcium and risk of hip fracture: 14-year prospective population study. Lancet, 1046-9, 1988.

87.- Holick, MF. The photobiology of vitamin D and its consequences for humans. Ann. N. Y. Acad, 453:1-13, 1985.

88.- Hordon, LD; Peacock, M. Vitamin D metabolism in women with femoral neck fracture. Bone Mineral, 2:413-26, 1987.

89.- Hulth, A. Current concepts of fracture healing. Clin Orthop, 249:265-84, 1989.

90.- Jenkins, HR; Roberts, JG; Webster, D; Williams, EO. Osteomalacia in elderly patients with fracture of the femoral neck. J Bone Joint Surg, 55-B:575-80, 1973.

91.- Jensen, GF; Meinecke, B; Boesen, J; Transbol, I. Does 1,25 (OH)₂D₃ accelerate spinal bone loss? A controlled therapeutic trial in 70-year-old women. Clin Orthop, 192:215-221, 1985.

92.- Kanis, JA et al. Evidence for efficacy of drugs affecting bone metabolism in preventing hip fracture. Br Med J, 305:1124-8, 1992.

93.- Kaplan, FS et al. Form and function of bone. En: Simon, SR (Ed.). Orthopaedic Basic Science. Ed. AAOS, pp. 127-84, 1994.

94.- Keller, TS; Spengler, DM; Carter, DR. Geometric, elastic, and structural properties of maturing rat femora. J Orthop Res, 4:57-67, 1986.

95.- Key, JA; Odell, RT. Failure of excess minerals in the diet to accelerate the healing of experimental fractures. J Bone Joint Surg, 37-A:37-44, 1955.

96.- Khouri, RK; Kouksi, B; Reddi, H. Tissue transformation into bone in vivo. A potential practical application. JAMA, 266:1953-5, 1991.

97.- Kimmel, DB. In vivo animal models in osteoporosis research. En: Marcus, R (Ed.). Osteoporosis. Blackwell Scientific publications, Boston, pp. 354-82, 1994.

98.- Kimmel, DB. Quantitative histologic changes in the proximal tibial epiphyseal

growth cartilage of aged female rats. *Cells Materials* 1(Supp):11-18, 1991.

99.- Kollenkirchen, U; Walters, MR; Fox, J. Plasma Ca influences vitamin D metabolite levels as rats develop vitamin D deficiency. *Am J Physiol*, 260:E447-52, 1991.

100.- Komar, L; Nieves, J; Cosman, F; Rubin, A; Shen, V; Lindsay, R. Calcium homeostasis of an elderly population upon admission to a nursing home. *J Am Geriatr Soc*, 41:1057-64, 1993.

101.- Koren, R; Ravid, A; Liberman, UA; Narinsky, R; Maron, L; Weisman, M; Samuel, R. Responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is reduced in lymphocytes from osteoporotic women. *J Bone Miner Res*, 7:1057-61, 1992.

102.- Krall, EA; Dawson-Hughes, B. Walking is related to bone density and rates of bone loss. *Am J Med*, 96:20-6, 1994.

103.- Lack, CH. Proteolytic activity and connective tissue. *Br Med Bull*, 20:217-22, 1964.

104.- Lakes, RS; Katz, JL; Sternstein, SS. Viscoelastic properties of wet cortical bone-I.- Torsional and biaxial studies. *J Biomech*, 12:657-78, 1979.

105.- Lau, EM; Woo, J; Swaminathan, R; MacDonald, D; Donnan, SP. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration in patients with hip fracture in Hong Kong. *Gerontology*, 35:198-204, 1989.

106.- Ledger, GA; Burritt, MF; Kao, PC; O'Fallon, WM; Riggs, BL; Khosla, S. Abnormalities of parathyroid hormone secretion in elderly women that are reversible by short term therapy with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Clin Endocrinol Metab*, 79:211-6, 1994.

107.- Levin, RM. The prevention of osteoporosis. *Hosp Pract Off Ed*, 26:77-80, 1991.

108.- Li, XJ; Jee, WSS; Ke, HZ; Mori, S; Akamine, T. Age-related changes of cancellous and cortical bone histomorphometry in female Sprague-Dawley rats. *Cells Materials*, supp. 1:25-35, 1991.

109.- Lidor, C; Dekel, S; Edelstein, S. The metabolism of vitamin D₃ during fracture healing in chicks. *Endocrinology*, 120:389-93, 1987.

110.- Lieber, RL. Experimental design and statistical analysis. En: Simon, SR (Ed.). *Orthopaedic Basic Science*. Ed. AAOS, pp. 623-66, 1994.

111.- Linde, F; Gothgen, CB; Hvid, I; Pongsoipetch, B. Mechanical properties of trabecular bone by a non-destructive compression testing approach. *Eng Med*, 17:23-29, 1988.

112.- Lindgren, JU; Narechania, RG; McBeath, AA; Lange, TA; DeLuca, HF. Effects of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ and calcitonin on fracture healing in adult rats. *Clin Orthop*, 160:304-8, 1981.

113.- Linkhart, TA; Herring, SJ; Keffer, MJ; Mohan, S; Baylink, DJ. Differential effects of osteolytic agents on resorption and release of insulin-like growth factors I and II in vitro. *J Miner Res*, 4:S214-9, 1989.

114.- Linkhart, TA; Mohan, S. Parathyroid hormone stimulates release of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II from neonatal mouse calvaria in organ culture. *Endocrinology*, 125:1484-90, 1989.

115.- MacDonald, D; Lau, E; Chan, ELP; Mak, T; Woo, J; Leung, PC; Swaminathan, R. Serum intact parathyroid hormone levels in elderly chinese females with hip fracture. *Calcif Tissue Int*, 51:412-4, 1992.

116.- MacLaughlin, J; Holick, MF. Ageing decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *J Clin Invest*, 76:1536-8, 1985.

117.- Maierhoffer, WJ; Gray, RW; Cheung, HS; Leman, J. Bone resorptions stimulated by elevated serum 1-25 (OH)₂ vitamin D concentrations in healthy men. *Kidney Int*, 24:555-560, 1983.

118.- Mallmin, H; Ljunghall, S; Larsson, K. Biochemical markers of bone metabolism in patients with fracture of the distal forearm. *Clin Orthop*, 295:259-63, 1993.

119.- Marie, PJ; Hott, M; Garba, MT. Contrasting effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on bone matrix and mineral appositional rates in the mouse. *Metabolism*, 34:777-783, 1985.

120.- Markbreiter, LA; Pelker, RR; Friedlander, GE; Peschel, R; Panjabi, MM. The effect of radiation on the fracture repair process. A biomechanical evaluation of a closed fracture in a rat model. *J Orthop Res*, 7:178-83, 1989.

121.- Markel, MD; Chao, EYS. Noninvasive monitoring techniques for quantitative description of callus mineral content and mechanical properties. *Clin Orthop*, 293:37-45, 1993.

122.- Markel, MD; Morin, RL; Wikenheiser, MA; Lewallen, DG; Chao, EYS. Quantitative CT for the evaluation of bone healing. *Calcif Tissue Int*, 49:427-32, 1991.

123.- Markel, MD; Wikenheiser, MA; Morin, RL; Lewallen, DG; Chao, EYS. The determination of bone fracture properties by dual-energy X-ray absorptiometry and single-photon absorptiometry: A comparative study. *Calcif Tissue Int*, 48:392-9, 1991.

124.- Marks, SJ; Popoff, SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat*, 83:1-44, 1988.

125.- Martínez, ME; García, JA; Sánchez, MJ. Fisiología del metabolismo mineral. *Medicine*, 6:1336-49, 1993.

126.- Martínez, ME; del Campo, MT; Delgado, AD; Sánchez, MT; García, JA; Munuera, L. Niveles de vitamina D en pacientes ancianos con fractura de cadera en Madrid. Comunicación al XXX congreso nacional de la SECOT. Barcelona, 1993.

127.- Martínez, ME; del Campo, MT; Sánchez-Cabezudo, MJ et al. Relations between calcidiol serum levels and bone mineral density in postmenopausal women with low bone density. *Calcif Tiss Int*, 55:253-6, 1994.

128.- Marx, SJ; Bourdeau, JE. Calcium metabolism. En: Maxwell, MH; Kleeman, GR; Narius, RG (editores): *Clinical disorders of fluid and electrolyte metabolism*. 4ª ed., New York, McGraw-Hill, 1987.

129.- Mayer, E; Kadowaki, S; Williams, G; Norman, AW. 1,25-dihydroxyvitamin D. En: Kumar, R (editor). *Vitamin D: Basic and clinical aspects*. Martinus Nijhoff publishers, Hingham, Massachusetts, pp. 259-302, 1984.

130.- McKibbin, B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg*, 60-B:150-162, 1978.

131.- Melton III, LJ; Riggs, BL. Espectro Clínico. En: Riggs, BL; Melton, LJ. *Osteoporosis*. Raven Press, pp. 171-198, 1988.

132.- Melton III, LJ; Chao, EYS; Lane, J. Aspectos biomecánicos de las fracturas. En: Riggs, BL; Melton, LJ. *Osteoporosis*. Raven Press, pp. 123-45, 1988.

133.- Meller, Y; Shainkin-Kestenbaum, R; Shany, S; Zuilli, I; Yankowitz, N; Giat, J; Konforti, A; Torok, G. Parathyroid hormone, calcitonin, and vitamin D metabolites during normal fracture healing in humans. *Clin Orthop*, 183:238-45, 1984.

134.- Mets, T. Calcium, vitamin D, and hip fractures. Incidence of falls may have decreased (carta). *Br Med J*, 309:193, 1994.

135.- Meuleman, J. Osteoporosis and the elderly. *Med Clin North Am*, 73:1455-70, 1989.

136.- Meunier, PJ. Prevention of hip fractures. *Am J Med*, 95(5A):75S-78S, 1993.

137.- Mohan, S; Baylink, DJ. Bone Growth factors. *Clin Orthop*, 263:30-48, 1991.

- 138.- Mow, VC; Flatow, EL; Foster, RJ. Biomechanics. En: Simon, SR (Ed.). Orthopaedic Basic Science. Ed. AAOS, pp. 397-446, 1994.
- 139.- Müller, ME; Allgöwer, M; Schneider, R; Willenegger, H. Manual de osteosíntesis. 3ª edición. Springer-Verlag, Barcelona, 1993.
- 140.- Na, RCK; Rovse, D; Suki, WN. Calcium transport in the rabbit superficial proximal convoluted tubule. *J Clin Invest*, 74:834-8, 1984.
- 141.- Naveh-Many, T; Silver, J. Regulation of parathyroid gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia, and vitamin D in the rat. *J Clin Invest*, 86:1313-9, 1990.
- 142.- Nordin, BEC; Morris, HA. Osteoporosis and vitamin D. *J Cell Biochem*, 49:19-25, 1992.
- 143.- Nordin, BEC; Horsman, A; Crilly, RG; Marshall, DH; Simpson, M. Treatment of spinal osteoporosis in postmenopausal women. *Br Med J*, 451-4, 1980.
- 144.- Norman, AW; Myrtic, JF; Maxgell, RJ; Nowickz, HG; Williams, V; Porjak, J. 1-25 dihydroxycholecalciferol: identification of the proposed active form of vitamin D₃ in the intestine. *Science*, 173:51-3, 1971.
- 145.- O'Driscoll, M; Chalmers, J; Booz, MKA. Subcapital fracture types and osteomalacia and vitamin D deficiency. *J Bone Joint Surg*, 55-B:882, 1973.
- 146.- Omdahl, JL; Garry, PJ; Hunsaker, LA; Hunt, WC; Goodwin, JS. Nutritional status in a healthy elderly population: vitamin D. *Am J Clin Nutr*, 36:1225-33, 1982.
- 147.- Orimo, H et al. Effects of 1-alfa-hydroxyvitamin D₃ on lumbar bone mineral density and vertebral fractures in patients with postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 54:370-6, 1994.
- 148.- Orwoll, ES; Meier, DE. Alterations in calcium, vitamin D, and parathyroid hormone physiology in normal men with aging: Relationship to the development of senile osteopenia. *J Clin Endocrinol Metab*, 63:1262-9, 1986.
- 149.- Ostrum, RF et al. Bone injury, regeneration and repair. En: Simon, SR (Ed.). Orthopaedic Basic Science. Ed. AAOS, pp. 277-323, 1994.
- 150.- Ott, SM. Calcium and vitamin D in the pathogenesis and treatment of osteoporosis. En: Marcus, R (Ed.). Osteoporosis. Blackwell Scientific publications, Boston, pp. 227-92, 1994.
- 151.- Pan, WT; Einhorn, TA. The biochemistry of fracture healing. *Curr Orthop*, 6:207-

13, 1992.

152.- Parfitt, AM. Remodelación ósea: relación con la cantidad y estructura del hueso y la patogenia y prevención de fracturas. En: Riggs, BL; Melton, LJ. Osteoporosis. Raven Press, pp. 49-103, 1988.

153.- Park, HC; Lakes, RS. Cosserat micromechanics of human bone: strain redistribution by a hydration sensitive constituent. *J Biomech*, 19:385-97, 1986.

154.- Peck, WA; Woods, WL. Las células del hueso. En: Riggs, BL; Melton, LJ. Osteoporosis. Raven Press, pp. 1-47, 1988.

155.- Peck, WA et al. Consensus development conference: Osteoporosis. *Am J Med*, 94:646-50, 1993.

156.- Pelker, RR; Friedlander, GE; Markham, TC; Panjabi, MM; Moen, CJ. Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res*, 1:401-11, 1984.

157.- Pinilla, TP; Boardman, KC; Bouxsein, ML; Myers, ER; Hayes, WC. Differences in loading direction from a fall can reduce the failure load of the proximal femur as much as age-related bone loss. *Transactions of the 41st annual meeting of the Orthopaedic Research Society*, 20:239, 1995.

158.- Postacchini, F; Gumina, S; Perugia, D; De Martino, C. Early fracture callus in the diaphysis of human long bones. *Clin Orthop*, 310:218-28, 1995.

159.- Powell, ES; Lawford, PV; Duckworth, T; Black, MM. Is callus calcium content an indicator of the mechanical strength of healing fractures?. An experimental study in rat metatarsals. *J Biomed Eng*, 11:277-81, 1989.

160.- Pun, KK; Wong, FH; Wang, C; Lau, P; Ho, PW; Pun, WK; Chow, SP; Cheng, CL; Leong, JC; Young, RT. Vitamin D status among patients with fractured neck of femur in Hong Kong. *Bone*, 11:365-8, 1990.

161.- Quesada, JM; Jans, I; Benito, P; Jiménez, JA; Bouillon, R. Vitamin D status of elderly people in Spain. *Age-Ageing*, 18:392-7, 1989.

162.- Quesada, JM. 25-hidroxivitamina D o prohormona de la tercera edad. Variación estacional. Relación con la edad. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 17:65-8, 1982.

163.- Raisz, LG; Kream, BE. Regulation of bone formation. *N Engl. J Med.*, 309:29-33, 1983.

- 164.- Reeve, J et al. Long-term treatment of osteoporosis with 24,25 dihydroxycholecalciferol. *Acta Endocrinol*, 101:636-40, 1982.
- 165.- Retief, DH; Dreyer, CJ. Effects of neural damage on the repair of bony defects in the rat. *Arch Oral Biol*, 12:1035-9, 1967.
- 166.- Rhinelander, FW. Tibial blood supply in relation to healing. *Clin Orthop*, 105:34-81, 1974.
- 167.- Rhinelander, FW; Phillips, RS; Steel, WM; Beer, JC. Microangiography in bone healing. II. Displaced closed fractures. *J Bone Joint Surg*, 50-A:643-62, 1968.
- 168.- Rhinelander, FW; Baragry, RA. Microangiography in bone healing. I. Undisplaced closed fractures. *J Bone Joint Surg*, 44-A:1273-98, 1962.
- 169.- Riggs, BL; Seeman, E; Hodgson, SF; Taves, DR; O'Fallon, WM. Effect of the fluoride/calcium regimen on vertebral fracture occurrence in postmenopausal osteoporosis: Comparison with conventional therapy. *New Engl J Med*, 306:446-50, 1982.
- 170.- Riggs, BL; Melton III; LJ. Evidence for two distinct syndromes of involutional osteoporosis. *Am J Med*, 75:899-901, 1983.
- 171.- Riggs, BL. Formation-stimulating regimens other than sodium fluoride. *Am J Med*, 95(5A):62S-68S, 1993.
- 172.- Riis, BJ; Thomsen, K; Christiansen, C. Does 24R,25 (OH)₂ vitamin D₃ prevent postmenopausal bone loss?. *Calcif Tissue Int*, 39:128-132, 1986.
- 173.- Robinovitch, SN; McMahan, TA; Hayes, WC. Increased soft tissue thickness over the hip lowers femoral impact force during simulated falls on the hip. *Transactions of the 40th annual meeting of the Orthopaedic Research Society*, 19:528, 1994.
- 174.- Rodan, GA; Martin, TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption.- A hypothesis. *Calcif Tiss Int*, 33:349-53, 1981.
- 175.- Roig, D; Serrano, S; Mariñoso, ML. Osteomalacia. En: Serrano, S; Aubia, J; Mariñoso, ML (Eds.). *Patología ósea metabólica*. Ed Doyma, Barcelona, pp. 119-40, 1990.
- 176.- Roodman, GD; Ibbotson, KJ; McDonald, BR; Kuehl, TJ; Mundy, GR. 1,25 dihydroxyvitamin D₃ causes formation of multinucleated cells with several osteoclasts characteristics in culture of primate marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:8213-7, 1985.
- 177.- Rudman, D et al. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *New Engl J Med*, 323:1-6, 1990.

- 178.- Ruegsegger, P; Dambacher, MA; Ruegsegger, E; Fisher, JA; Anliker, M. Bone loss in premenopausal and postmenopausal women. *J Bone Joint Surg*, 66-A:1015-23, 1984.
- 179.- Saha, S; Lakes, RS. The effect of soft tissue on wave-propagation and vibration tests for determining the in vivo properties of bone. *J Biomech*, 10:393-9, 1977.
- 180.- Sarmiento, A; Schaeffer, JF; Beckerman, L; Latta, LL; Enis, JE. Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing. *J Bone Joint Surg*, 59-A:369-75, 1977.
- 181.- Schapira, D; Lotan-Miller, R; Barzilai, D; Silbermann, M. The rat as a model for studies of the aging skeleton. *Cells materials*, supp 1:181-8, 1991.
- 182.- Segre, CV; Niatt, HD; Habener, J; Pot, JT. Metabolism of parathyroid hormone: Physiology and clinical significance. *Am J Med*, 56:774-9, 1974.
- 183.- Serrano, S; Mariñoso, ML. Bases histológicas de la histomorfometría ósea. En: Serrano, S; Aubia, J; Mariñoso, ML (Eds.). *Patología ósea metabólica*. Ed Doyma, Barcelona, pp. 56-69, 1990.
- 184.- Serrano, S; Mariñoso, ML. Osteomalacia. *Histopatología*. En: Serrano, S; Aubia, J; Mariñoso, ML (Eds.). *Patología ósea metabólica*. Ed Doyma, Barcelona, pp. 131-40, 1990.
- 185.- Serrano, S; Mariñoso, ML. Histomorfometría ósea. En: Serrano, S; Aubia, J; Mariñoso, ML (Eds.). *Patología ósea metabólica*. Ed Doyma, Barcelona, pp. 71-89, 1990.
- 186.- Seymour, DG; Stone, M. Prospects for treating osteoporosis in older people. *J Roy Soc Med*, 87:26-30, 1994.
- 187.- Shapira, D; Mokadi, S; Juhn, A; Kabala, A; Silbermann, M. Calcium and vitamin D enriched diet increases and preserves axial mineral content in aging laboratory rats. *Cell Mater*, 4:155-64, 1994.
- 188.- Shapira, D; Linn, S; Sarid, M; Mokadi, S; Kabala, A; Silbermann, M. Calcium and vitamin D enriched diets increase and preserve vertebral mineral content in aging laboratory rats. *Bone*, 16:575-82, 1995.
- 189.- Sherman, SS; Hollis, BW; Tobin, JD. Vitamin D status and related parameters in a healthy population: the effects of age, sex and season. *J Clin Endocrinol Metab* 71:405-13, 1990.
- 190.- Silver, J. Regulation of parathyroid hormone synthesis and secretion. En: Coe, FL; Favus, MJ (editores): *Disorders of bone and mineral metabolism*. Raven Press, New York, 1991. pp. 83-106.

- 191.- Simmons, DJ; Kunvin, AS. Autoradiographic and biochemical investigations of the effect of cortisone on the bones of the rat. *Clin Orthop*, 55:201-15, 1967.
- 192.- Simon, WR. The rat as an animal model for the study of senile idiopathic osteoporosis. *Acta Anat*, 119:248-50, 1984.
- 193.- Slätis, P; Rokkanen, P. The normal repair of experimental fractures. A histo-quantitative study of rats. *Acta Orthop Scand*, 36:221-9, 1965.
- 194.- Slovik, DM; Adams, JS; Neer, RM; Holick, MF; Potts, JT. Deficient production of 1,25-dihydroxyvitamin D in elderly osteoporotic patients. *New Engl J Med*, 305:372-4, 1981.
- 195.- Slovik, DM; Daly, MA; Potts, JT; Neer, RM. Renal 1,25 dihydroxyvitamin D, phosphaturic and cyclic-AMP responses to intravenous synthetic human parathyroid hormone (1-34) administration in normal subjects. *Clin Endocrinol*, 20:369-75, 1984.
- 196.- Slovik, DM; Neer, RM; Potts, JT. Short-term effects of synthetic human parathyroid hormone (1-34) administration on bone mineral metabolism in osteoporotic patients. *J Clin Invest*, 68:1261-71, 1981.
- 197.- Slovik, DM; Rosenthal, DI; Doppelt, SH et al. Restoration of spinal bone in osteoporotic men by treatment with human parathyroid hormone (1-34) and 1,25 dihydroxyvitamin D. *J Bone Miner Res*, 1:4-7, 1986.
- 198.- Tam, CS; Heersche, JNM; Jones, G; Murray, TM; Rasmussen, H. The effect of vitamin D on bone in vivo. *Endocrinology*, 118:2217-24, 1986.
- 199.- Tardivel, S; Banide, H; Porembska, Z; Aymard, P; Dupuis, Y; Lacour, B. Different forms of alkaline phosphatase in adult rat femur. Effect of vitamin D₃-deficient diet and of a sorbitol-enriched diet. *Calcif Tissue Int*, 50:433-8, 1992.
- 200.- Tilyard, MW; Spears, GFS; Thomson, J; Dovey, S. Treatment of postmenopausal osteoporosis with calcitriol or calcium. *New Engl J Med*, 326:357-62, 1992.
- 201.- Tonna, EA; Cronkite, EP. The periosteum: Autoradiographic studies on cellular proliferation and transformation utilizing tritiated thymidine. *Clin Orthop*, 30:218-33, 1963.
- 202.- Toury, R; Stelly, N; Boissonneau, E; Convert, M; Dupuis, Y. Relationship between vitamin D status and deposition of bound calcium in skeletal muscle of the rat. *Biol Cell*, 69:179-89, 1990.
- 203.- Tsai, KS; Heath III, H; Kumar, R; Riggs, BL. Impaired vitamin D metabolism with aging in women in women. Possible role in pathogenesis of senile osteoporosis. *J Clin*

Invest, 73:1668-72, 1984.

204.- Tsoukas, CD; Provvedini, DM; Manolagas, SC. 1,25-dihydroxyvitamin D₃: a novel immunoregulatory hormone. *Science*, 224:1438-42, 1984.

205.- Turner, CH; Burr, DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*, 14:595-608, 1993.

206.- Uhland, AM; Kwiecinski, GG; DeLuca, HF. Normalization of serum calcium restores fertility in vitamin D-deficient male rats. *J Nutr*, 122:1338-44, 1992.

207.- Utvag, SE; Grundnes, O; Reikeras, O. Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand*, 65:559-63, 1994.

208.- Volpin, G; Rees, JA; Ali, SY; Bentley, G. Distribution of alkaline phosphatase activity in experimentally produced callus in rats. *J Bone Joint Surg*, 68-B:629-34, 1986.

209.- Von Knorring, J; Slätis, P; Weber, TH; Helenius, T. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone in patients with femoral neck fracture in southern Finland. *Clin Endocrinol*, 17:189-194, 1982.

210.- White, AA; Panjabi, MM; Southwick, WO. The four biomechanical stages of fracture repair. *J Bone Joint Surg*, 59-A:188-92, 1977.

211.- Wong, GL et al. 1,25 dihydroxycholecalciferol and parathormone: effects on isolated osteoclast-like and osteoblast-like cells. *Science*, 197:663-6, 1977.

212.- Yanagawa, N; Lee, DBN. Renal handling of calcium and phosphorus. En: Coe, FL; Favus, MJ (Eds.). Disorders of bone and mineral metabolism. Raven Press, New York, 1991, pp 3-40.