

*Rev. Esp. de Cir. Ost.*, 14, 1-15 (1979)

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA  
DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Centro Coordinado de Anatomía y Patología Médica del C. S. I. C.

Director Prof. Dr. V. SMITH-AGREDA

## Estimulación antero-hipofisaria en la rata blanca adulta y su repercusión en el callo de fractura diafisario-femoral

ISMAEL ESCRIBA ROCA

### RESUMEN

El presente trabajo estudia la hipófisis de la rata blanca adulta tras radiación adeno-hipofisaria con luz ultravioleta y su repercusión sobre el callo de fractura diafisario-femoral. En este estudio hemos utilizado métodos morfológicos, histoquímicos, histométricos, estadísticos y ultraestructurales.

El estímulo adenohipofisario, cuya máxima expresión morfológica se centra en las «células de la radiación», determina una activación de las primeras fases del proceso reparador óseo del callo de fractura diafisario femoral; pero esta misma activación de las células osteoformadoras provoca una «modulación» condroblástica, dando lugar a un retardo en la osificación endondral periostal.

Descriptores: Callo de fractura. Estimulación hipofisaria. Estimulación osteogénica.

### SUMMARY

**Adult white rat's hypophysis is studied after ultraviolet light irradiation of the fracture healing of the femoral diaphysis. Morphological, histochemical, histometric, statistical and ultrastructural methods are used in our study.**

**The adenohipophysis stimulation, with its morphological expression in the «irradiation cells», determines an activation of the first phases of bone formation in the femoral diaphysis fracture healing; these bone formation cells will produce a condroblastic «modulation» which will produce a delay in the periostal endochondral ossification.**

**Key words: Fracture healing. Hypophysis stimulation. Osteogenic stimulation.**

Resumen tesis doctoral: «Aportaciones en las transformaciones experimentales del sustrato antero-hipofisario tras la estimulación adenal en la rata blanca adulta y su repercusión en el callo de fractura diafisario-femoral».

### Introducción

Como es sabido, multitud de productos han sido administrados al animal de experimentación y aun al hombre, con la idea de hallar alguno que influyera favorablemente en el proceso de consolidación de las fracturas; a la vez que descartara aquéllos que lo retrasaran o alteraran notablemente.

En cuanto al primer aspecto de la cuestión, existen autores contemporáneos (15, 68) que niegan rotundamente la existencia de fármaco alguno que active el proceso reparador óseo. Pero desde que BOURDE (5), publicara la positividad de sus resultados, tras inyección intrafocal de extractos hormonales antehipofisarios, parece ser que el efecto acelerador de ciertas hormonas en el proceso de consolidación ósea es el único capítulo que puede aportar aspectos positivos al problema; sin descartar por ello el estar sujeto a una verdadera discusión.

Así, el propósito de este trabajo ha sido analizar el efecto que una estimulación antehipofisaria total determinaría sobre el proceso de la consolidación ósea en fracturas experimentales no estabilizadas. Siguiendo la línea de investigación iniciada en nuestro Departamento en 1970, sobre estimulación hipofisaria mediante la radiación ultravioleta y que puede encuadrarse en ese grupo (sujeto a discusión) que podemos genéricamente denominar como «acción hormonal antehipofisaria y callo de fractura».

Guiados siempre por una mentalidad morfológica, la estimulación directa antehipofisaria presenta cuatro grandes ventajas en nuestro estudio. La primera, estudiar más profundamente las células «de la radiación» que describiera GARCÉS (21). La segunda, comprobar la repercusión de esta irradiación hipofisaria sobre el callo de fractura diafisario femoral experimental

(estudio sin antecedente bibliográfico alguno). La tercera, que con este método operativo evitamos toda interferencia en los resultados, debida al empleo de la vía parenteral para cualquier sustancia química; y cuarta, la experiencia que en nuestro departamento se posee en las glándulas hipofisarias, suprarrenales y tiroideas con el mismo proceder experimental.

Basándonos en los anteriores hechos, iniciamos nuestro trabajo con las siguientes líneas directrices: 1.º Estudio de la curva ponderal de peso. 2.º Estudio clínico y macroscópico del callo de fractura. 3.º Estudio morfológico hipofisario. 4.º Estudio morfológico del callo de fractura. 5.º Estudio histométrico y estadístico del callo de fractura. 6.º Estudio histoquímico de la hipófisis y del callo de fractura. 7.º Estudio a microscopía electrónica del lóbulo anterior hipofisario. Este estudio, lo hemos realizado comparativamente entre un grupo experimental y otro control.

### **Acción de las hormonas antehipofisarias y dependientes sobre el callo de fractura**

Para GOMAR (24), son tres los factores esenciales que rigen el normal proceso de consolidación fracturaria: Movilidad, vascularización e infección en el foco de fractura; pero no es menos cierto que factores como la edad o acción hormonal entre otros, favorecen o enlentecen este proceso. Nuestro trabajo se concreta en un tema que aunque ha sido objeto de vivo interés en las últimas décadas, presenta hoy en día plena actualidad. La relación entre terapia hormonal y callo de fractura, ha sido abordada en numerosos estudios precedentes, investigándose el efecto de las distintas hormonas antehipofisarias o derivadas sobre el proceso de consolidación fracturaria.

*STH*: Parece ser que es PANKRATIEW

(54), el primero en emplear extractos del lóbulo anterior hipofisario (pituítina) asociados a extractos óseos, en inyección subcutánea o intraperitoneal en el conejo, observando una aceleración en la consolidación, estimada en un 30 ó 50 por 100. La utilización clínica de la hormona aislada, se inicia con el trabajo de LABORIT y colaboradores (37), siendo de destacar que el efecto de la STH sobre el tejido mesenquimal, permite obtener brillantes resultados en los retardos de consolidación con más de cuatro meses de evolución. Por otra parte, SHEPANECK (59) es mucho más escéptico, dudando del poder osteogénico de la STH en el foco de fractura. Estudios posteriores realizados con la hormona, tanto en la vertiente clínica (8, 10, 48, 52) como en la experimental (28, 41, 66, 69), vienen a confirmar el efecto estimulador que esta hormona posee sobre el proceso de consolidación ósea. Pero sin duda alguna, es KOSKINEN (34), el que realiza un trabajo experimental modelo sobre la influencia de la STH en las fracturas de los huesos largos de la rata; su conclusión es la siguiente: «En los animales del grupo STH, se produjeron trastornos que muestran a la hormona como inductora de una osteogénesis vigorosa». Hechos experimentales que el mismo autor (35), ratifica en 60 pacientes tratados con una asociación de STH y TSH, al obtener en el grupo control un 13'5 por 100 de pseudoartrosis contra el 1'5 por 100 en el grupo tratado.

*TSH*: Podemos asegurar, que efectos similares a los descritos para la STH en el proceso de consolidación han sido demostrados para la TSH. Las primeras experiencias sobre la estimulación osteogénica en la consolidación ósea son contradictorias (6, 64). Dudas que son posteriormente clarificadas merced a FONTAINE y colaboradores (17), manifestando que bajo la influencia de la tiroxina se estimula lo-

calmente el proceso reparador óseo, sin alteración alguna en el mismo. Acción estimuladora que alcanza su máxima intensidad en la asociación de esta hormona con la STH, hechos verificados reiteradamente (34, 35, 41, 66), pudiendo afirmarse que los efectos de esta asociación son complementarios.

*ADRENALINA*: La adrenalina es la primera hormona que se sintetiza en estado de pureza, esto ocurre en 1901. Nueve años más tarde (9), estudian sus efectos en el callo experimental del perro, llegando a la conclusión de que su efecto era favorable en el proceso de consolidación fracturaria. Sin embargo, estudios posteriores (4, 32, 33, 43) han demostrado, que tanto la necrosis experimental de la médula suprarrenal como la administración en exceso de adrenalina, determinan un «stop» evidente en la osteogénesis reparadora, favoreciendo la aparición de verdaderos retardos de consolidación fracturaria.

*DOCA*: El efecto que esta hormona determina en el proceso de consolidación ósea ha sido clarificado con los trabajos de FONTAINE y cols. (17). Estos autores, tras administrar a perros con fractura de tibia de 850 a 2.540 mmg. de la hormona, concluyen: «La DOCA provoca una decalcificación anormal en los extremos fracturarios, favoreciendo la presencia de cartílago hialino en el foco de la fractura, lo que determina un retardo de consolidación».

*ACTH y CORTISONA*: Se sabe desde hace tiempo que en pacientes tratados durante largos períodos con ACTH o cortisona el proceso de cicatrización resulta enlentecido. Siendo la fractura una herida en un tejido conjuntivo de alta diferenciación (24), no es de extrañar, que el proceso de reparación ósea resulta enlenteci-

do. Este hecho, negado en 1952 por KEY, ODELL y TAYLOR (31), en la rata; ha sido confirmado posteriormente en numerosos trabajos de experimentación (12, 18, 30, 36, 60). Pero quizá sean KOSKINEN (34) y STOREY (63), los que mejor nos han demostrado el efecto que sobre la consolidación ósea determina la administración de cortisona o ACTH. Para el primero «la cortisona retarda el proceso reparador en todas sus fases, inhibiéndose el callo endostal, aumentando el tejido fibroso y existiendo una mayor inestabilidad focal»; el segundo (63) insiste en un manifiesto retraso en el crecimiento endocrinal y en una mayor resorción de los extremos fracturarios.

**ESTROGENOS y ANDROGENOS:** Desde que MARSIGLIA (45), iniciara el estudio de las hormonas gonadales en el proceso de consolidación fracturaria, las publicaciones y aportaciones al tema han sido numerosas. La revisión de estos trabajos nos pone de manifiesto la ineficacia de la terapéutica estrogénica en la osteogénesis reparatriz (6, 29, 49, 55), aunque, puntualizan SAID (58) y SOLIMAN (62), es de desear una actividad estrogénica fisiológica durante el proceso de consolidación ósea. En cuanto a la terapia androgénica, parece ser que ésta favorece en cierto modo la osteogénesis reparatriz (1, 22, 40, 50, 55). Quizá la utilización clínica de la terapéutica androgénica queda limitada a pacientes ancianos, conclusión que ya fue puesta en evidencia por BAILO y SINIGAGLIA (3).

### Material y métodos

1. *Animal y casuística.* — El animal por nosotros utilizado ha sido el «Mus Norvegicus» o rata blanca común. Esta elección no ha sido arbitraria sino condicionada por una serie de factores entre los

que cabe destacar su resistencia a las infecciones, su gran prolificidad, la abundancia de tejido cartilaginoso en el callo de fractura y, sobre todo, el acceso relativamente sencillo a la lámina basilar ya que su anatomía así lo permite. En nuestras experiencias hemos utilizado 64 animales; a todos ellos se les fracturó el fémur derecho. 32 de ellos sufrieron irradiación hipofisaria (grupo experimental) y al resto sólo se les expuso la hipófisis (grupo control). El total de nuestros animales ha sido dividido en tres grupos; el primero, destinado al estudio morfológico y clínico (40 animales), el segundo, al estudio histoquímico (16 animales) y el tercero, al estudio ultraestructural (8 animales). A todos ellos se les dividió en cuatro series, dependiendo del tiempo de evolución entre las intervenciones y la autopsia; ésta se realizó a los 7, 14, 21 y 31 días; series A, B, C y D, respectivamente. Cada serie ha estado constituida por animales de la misma camada y pesos comprendidos entre 250 y 500 gramos y en idénticas condiciones de alimentación y habitabilidad.

2. *Técnicas quirúrgicas.* — Tras anestesiar al animal con Nembutal por vía intraperitoneal y dosis de 25 a 30 mgrs. por kilo de peso, procedemos a provocar la fractura diafisaria femoral mediante una exposición femoral externa paralela al vaso externo (51). (Ningún tipo de inmovilización ha sido utilizado). Una vez suturada la piel pasamos a realizar la exposición hipofisaria. Planteado el problema de irradiar la hipófisis con radiación ultravioleta decidimos utilizar la técnica de exposición hipofisaria descrita por GARCES (21), que es modificación del abordaje cervical anterior de SMITH (61). Esta técnica nos ha dado resultados plenamente satisfactorios, al tiempo que la mortalidad ha sido prácticamente nula.

3. *Irradiación ultravioleta.* — La irradiación ultravioleta se ha realizado con una lámpara Quarzlampen-Hanau, con una serie de parámetros inmutables entre los que destacan la interposición del filtro de Willamita con el fin de que sólo actúe la radiación de 2.537 Å, el tiempo de radiación de 5 minutos, la ausencia de luz solar y una distancia entre el foco y objeto (hipófisis) de un metro. La dosis de radiación por animal, ha sido tabulada con el dosímetro de LATARGET (38) siendo siempre constante ( $450 \text{ ergios/mm}^{-2}/\text{seg.}^{-1}$ ).

4. *Estudio de la curva ponderal de peso.* — Este estudio ha sido realizado con las jaulas metabólicas para ratas Panlab, Sociedad Anónima, éstas permiten el pesaje diario de los animales así como el de sus excretas e ingestas.

5. *Estudio clínico de la estabilidad fracturaria.* — Una vez anestesiado el animal, la estabilidad ha sido cotejada manualmente. La resistencia a la angulación en los planos anteroposterior y lateral ha sido valorada en cruces, la inestabilidad total en ambos planos significa 4 cruces y si la resistencia es superior esta cotación disminuye.

6. *Autopsia y obtención de piezas.* — La autopsia y obtención de las piezas de estudio ha seguido la misma sistemática en nuestros 64 animales. Estas se practicaron a los 7, 14, 21 y 31 días. Previa anestesia con éter sulfúrico, practicamos una laparotomía media y una toracotomía bilateral que nos permiten canular el ventrículo izquierdo del animal y realizar un lavado del sistema cardiovascular y la perfusión-fijación adecuada al estudio a practicar. Terminada la fijación decapitamos al animal para practicar posteriormente la hipofisectomía y desarticulamos el fémur derecho que una vez limpio pasa, al igual

que la cabeza del animal, a los pocillos con el fijador adecuado.

7. *Procesado de las piezas.* — Todas nuestras piezas han seguido el proceso habitual de todo laboratorio histológico: Fijación, deshidratación, diafanización, inclusión... etc. De todas formas haremos algunas puntualizaciones.

— Fijación: En el estudio morfológico utilizamos el líquido de HALMI (27).

En el estudio histoquímico se empleó la formalina neutra tamponada de LILLIE (40).

En el estudio ultraestructural empleamos el glutaraldehído.

— Decalcificación: Para las piezas fijadas en Halmi el ácido tricloroacético al 5 por 100 en solución acuosa. Las piezas fijadas en formalina neutra y glutaraldehído fueron decalcificadas en solución acuosa de ácido nítrico al 75 por 100.

— Inclusión: Hemos utilizado paraplast agregado en acromolecular plástico de la Sherwood Medical I. N. C., Olivest, St. Louis Missouri.

— Corte: En microscopía luz hemos utilizado un microtomo Jung A. G. de deslizamiento vertical y en electrónica un ultratomo L. K. B. Ultramicrotome tipo 8.802-A.

8. *Métodos de tinción.* — Los métodos de tinción que nos han permitido el logro de imágenes objetivas sobre las que fundamentar nuestro estudio han sido:

— Piezas fijadas en líquido de Halmi (*estudio morfológico*).

1. Métodos histológicos generales:

a) Tricrómico de Masson variante de GOLDNER (23).

b) Policromo en dos tiempos F-1 de CABANES (7).

c) Coloración de PAPANICOLAU.

## 2. Métodos histológicos especiales:

a) Cromohematoxilina-floxina de GOMORI (25).

b) Tricrómico en un tiempo de GABE y MARTOJA (20).

— Piezas fijadas en formalina neutra de LILLIE (40) (*estudio histoquímico*).

a) Reacción al PAS de Mc. MANUS (44).

b) PAS acetilación reversible de GABE y MARTOJA (19).

c) Coloración de RAVETTO (57).

d) Azul de toluidina variante de LISON (42).

e) Aldehído-tionina PAS orange G de EZRIN y MURRAY (14).

— Piezas fijadas en glutaraldehído (*estudio ultraestructural*).

a) Coloración de azul de toluidina alcalino para cortes en plástico.

Las observaciones a microscopía luz se han realizado con un microscopio Wild-M 20 y otro de cámara Ultraphot-III de la casa Zeiss y el estudio de las imágenes ultraestructurales con un microscopio electrónico Carl Zeiss Modelo E. M. Q. A.

9. *Estudio histométrico*. — Este estudio lo hemos realizado aplicando a nuestras preparaciones del callo de fractura el método histológico porcentual de UOTILA (67); el método semicuantitativo de FLODERUS (16) para la densidad celular y un método citocariométrico general de estudio citométrico. En este estudio se ha considerado «corte patrón» a aquel que fuera perpendicular al callo a nivel centromedular. El contaje tisular porcentual se ha centrado en el hueso neoformado, en el cartílago hialino y fibroso, en el lecho vascular y en el tejido fibroso. La densidad celular y la citometría las hemos aplicado

a células mesenquimales, al cartílago fibroso e hialino y a los osteoblastos activos. En el contaje porcentual de UOTILA (67), ha sido indispensable el microscopio de proyección Zeiss con frente luminoso de rayos ultravioleta y objetivo de 10 x; mientras que en los otros dos métodos citométricos hemos utilizado el microscopio de discusión Reichert 341.686 con objetivo de 60 x.

Todos estos resultados numéricos han sido sometidos al test de Student. Con 20 animales experimentales y 20 testigos, en series de 10, por lo que nos hemos movido con 8 grados de libertad por serie y hemos tomado como significativos valores de  $P < 0.01$ .

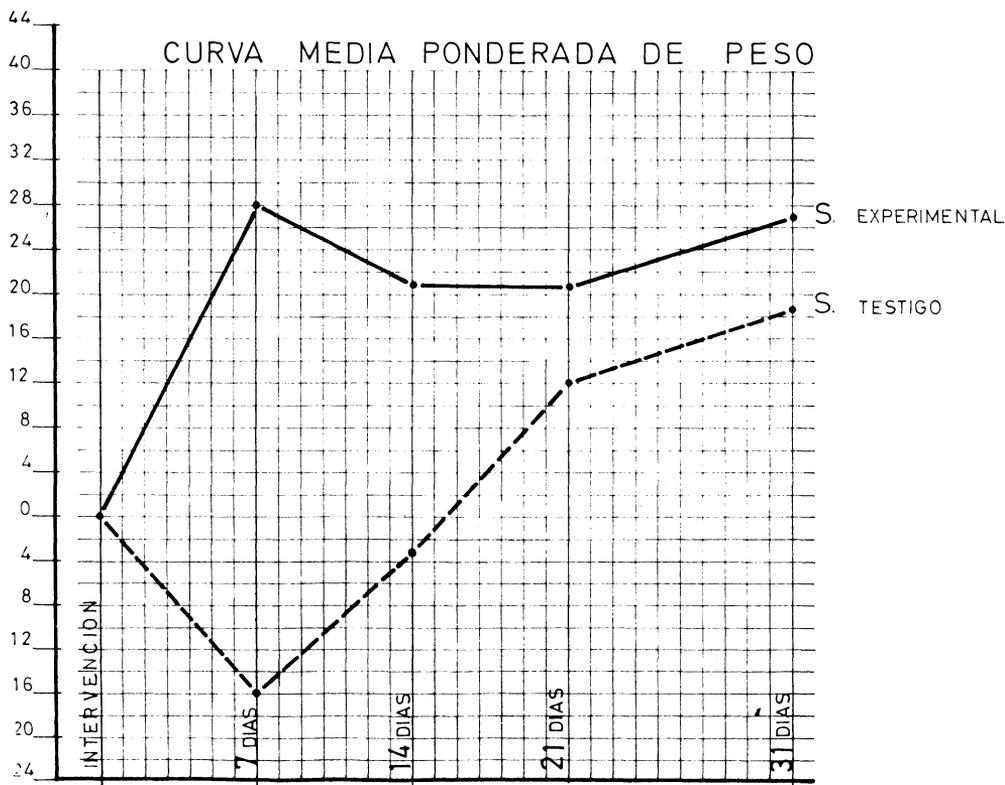
### Resultados

1. *En la curva media ponderal de peso*. — El estudio aislado de la curva ponderal de peso nos ha permitido el estudio de la media en los grupos control y experimental de las cuatro series objeto de la experiencia. El resultado del mismo queda plasmado en la figura 1 (gráf. 1), estudio gráfico de los siguientes hallazgos:

*Serie A:* El peso total de los animales testigos en la primera semana, disminuye respecto a la suma inicial en 79 gr. Mientras que la serie experimental, aumenta en 140 gr. Lo que supone una diferencia global a favor de los animales estimulados en 219 gr.

*Serie B:* A los 14 días, el incremento en la serie estimulada se mantiene en 120 gramos, de los que 105 se deben a un balance positivo y 15 gr. al déficit de la serie control.

*Serie C:* Aquí queda plenamente demostrada la gran recuperación en la serie testigo. Con una diferencia sustancial respecto al anterior de 87 gr. Mientras que



GRÁFICA 1.— Representación gráfica de las curvas medias ponderales en los grupos control y experimental a lo largo de toda la experiencia. Obsérvese el paralelismo entre ambas curvas a partir de la segunda semana del experimento.

la serie experimental, persiste monótonamente uniforme.

*Serie D:* En esta serie, el paralelismo observado en la precedente, persiste. Ya que la diferencia entre ambas es de 42 gramos, mientras que en la serie anterior era de 32 gr. Diferencia de 10 gr. que en el cómputo total (10 animales) carece en absoluto de significación.

2. *En la estabilidad clínica del foco de fractura:* El estudio comparativo de la estabilidad en el foco de fractura nos ha puesto de manifiesto una extrema igualdad en las series experimentales y testigos de 7 y 14 días. Las diferencias mayores las hemos obtenido a los 21 y 31 días, con

31 cruces para la serie  $C_I$  contra 23 de la  $C_T$  y con 32 para la  $D_I$  contra 20 para la  $D_T$ . Estos resultados nos orientan hacia una inestabilidad superior para los animales experimentales en la tercera y cuarta semana de la experiencia.

3. *En el estudio macroscópico del callo de fractura:* El resultado de este examen nos ha puesto de manifiesto dos diferencias, a nuestro entender marcadas, entre las series control y experimentales. La primera es una mayor abundancia de hematomas capsulados en la serie experimental respecto a la control (9 contra 2). La segunda ha sido la apreciación subjetiva de un mayor volumen de los callos experimen-

tales, hecho objetivado mediante cortes transversales al eje longitudinal del callo fracturario.

4 y 5. *En el estudio morfológico hipofisario:* El estudio a microscopía luz y electrónica de las hipófisis irradiadas, ha puesto de manifiesto una hiperactividad generalizada de las mismas respecto a las testigo y cuyo máximo exponente ha sido la «célula de la radiación» (13) (figs. 1 y 2).

6. *En el estudio morfológico del callo de fractura.*—El estudio morfológico comparativo del callo de fractura entre nuestro grupo control y experimental, siguiendo el normal transcurrir de las anteriores etapas del proceso histológico, ha puesto de manifiesto los siguientes hechos:

1.º En las cuatro series del grupo experimental nos ha parecido observar un mayor grosor en el «cambium periostal»,

aumento de tamaño debido fundamentalmente al mayor tamaño y quizá al mayor número de las células mesenquimales de la capa interna (fig. 3).

2.º Del mismo modo, en nuestras cuatro series experimentales hemos creído apreciar una mayor cantidad de cartílago hialino, cuyos núcleos poseen a veces un pericondrio denso y evidente (fig. 4), la hipertrofia celular de los condrocitos en las series experimentales es intensa y uniformemente repartida (fig. 5), siéndolo mucho más anárquica en las series control.

7. *En el estudio histoquímico del callo de fractura.*—Los resultados de la aplicación de métodos histoquímicos al callo de fractura, podemos resumirlos con los obtenidos tras la acetilación reversible a la reacción del PAS. Método que nos ha puesto de manifiesto una mayor positividad en las series experimentales en las tres primeras semanas de la experiencia; a la vez

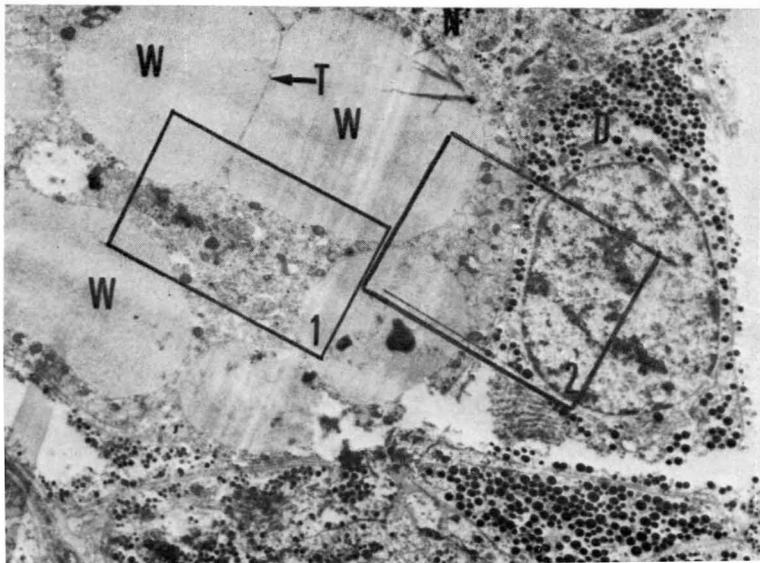


FIG. 2.—Experimental de 21 días. Lóbulo anterior hipofisario. «Célula de la radiación». En este caso se halla muy evolucionada, obsérvese la vacuola gigante y sus tabiques de separación, que a estos aumentos parecen restos citoplásmicos comprimidos entre dos presiones. Escalón 1. 1.700 ×.

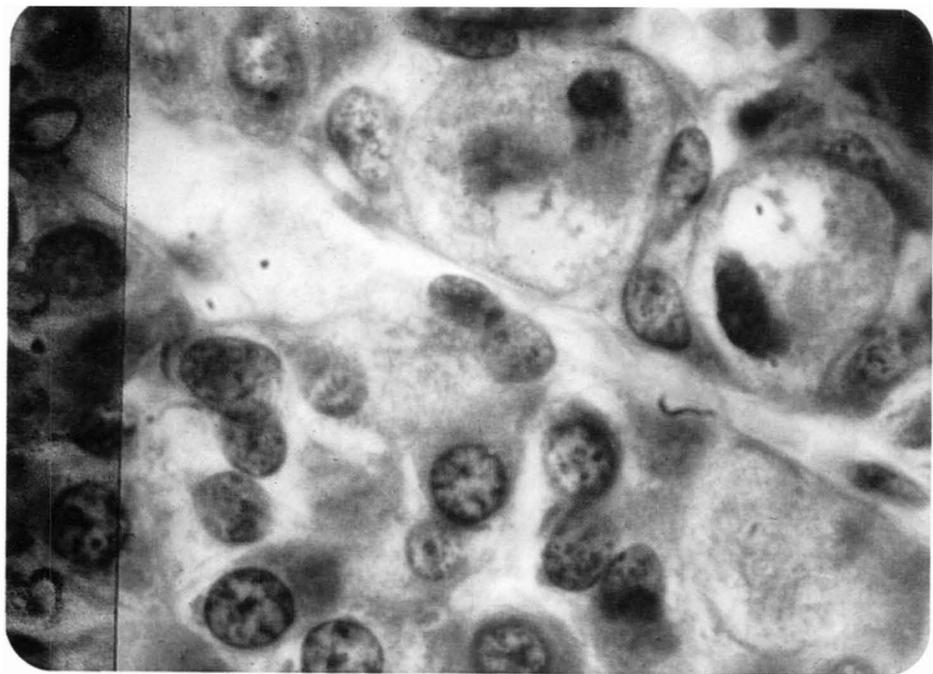


FIG. 1.—Experimental de 7 días. Lóbulo anterior hipofisario. Obsérvese el gran tamaño de las células de la radiación, su situación yuxtavascular y la constricción del sinusoide vascular por las mismas. Policromo de Cabanes. 500 × inmersión.



FIG. 5.—Experimental de 14 días. Callo de fractura (osificación endocondral). Condrocitos hiperplásicos. Método de Cabanes. 500 × inmersión.

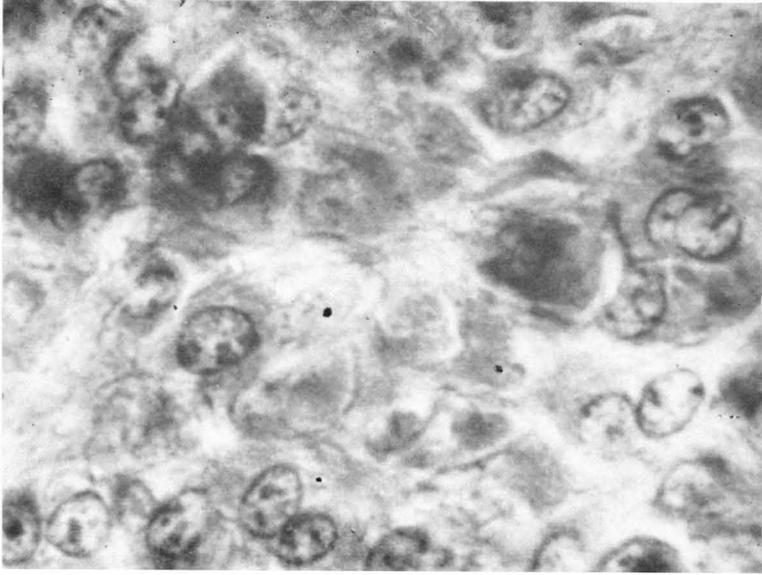


FIG. 3. — Experimental de 14 días. Callo de fractura (capa osteogénica de Ollier). Obsérvese el gran número y tamaño de las células mesenquimales. Método de Cabanes. 500 × inmersión.

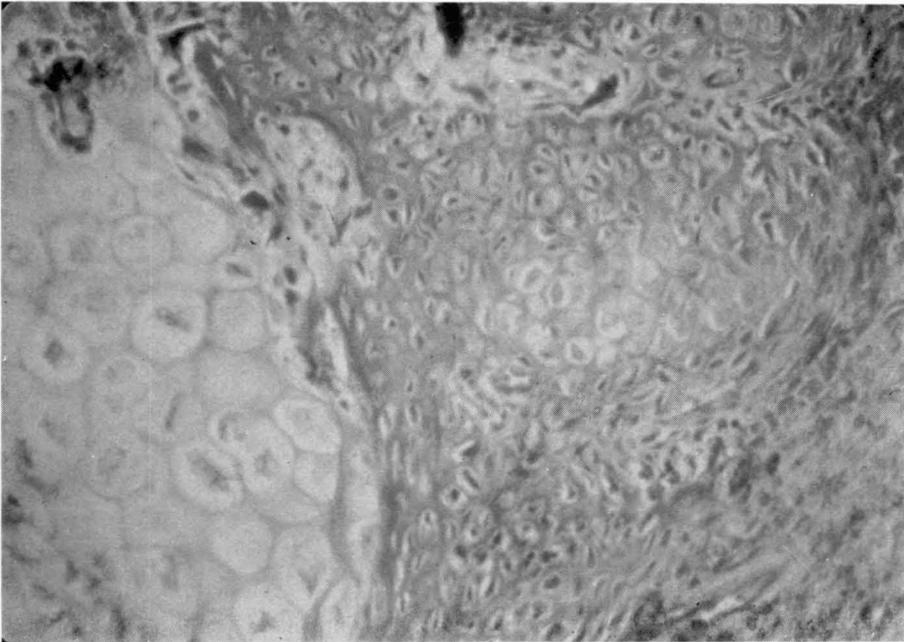


FIG. 4. — Experimental de 21 días. Callo de fractura (osificación endocondral). Esta figura nos muestra una zona de cartilago "Activado" con escasa penetración vascular. Método de Cabanes. 30 ×.

que nos orienta a imputar la mayor positividad del grupo experimental a sustancias de naturaleza glucídica.

8. *En el estudio histométrico y estadístico.* — La aplicación bioestadística del test de Student a los métodos histométricos utilizados en nuestro trabajo, ha supuesto un contingente inapreciable de datos numéricos objetivos, que vienen a ratificar los hechos constatados en el estudio morfológico del callo de fractura. Entre las 76 tablas estudiadas, reseñaremos tres que a nuestro juicio clarifican las diferencias histológicas apreciadas a microscopía luz en el callo de fractura de nuestros animales control y experimentales.

— Medición tisular porcentual en el cartílago hialino: La cantidad de cartílago hialino porcentuado en las series experimentales a lo largo de la experiencia, ha sido superior al porcentuado en el grupo control. Estas diferencias han sido altamente significativas en las cuatro series ( $P < 0,001$ ). (Fig. 6) (Graf. 2).

Serie A:  $\bar{X}_1$ : 23'5140  $\pm$  0'4033 por 100

$\bar{X}_2$ : 38'3780  $\pm$  0'2917 —

Serie B:  $\bar{X}_1$ : 31'1880  $\pm$  0'6413 por 100

$\bar{X}_2$ : 41'4300  $\pm$  0'3436 —

Serie C:  $\bar{X}_1$ : 25'2280  $\pm$  0'4937 por 100

$\bar{X}_2$ : 43'5200  $\pm$  0'3519 —

Serie D:  $\bar{X}_1$ : 13'2840  $\pm$  0'3714 por 100

$\bar{X}_2$ : 47'8160  $\pm$  0'3584 —

En donde  $\bar{X}_1$  es la media del grupo control y  $\bar{X}_2$  la del experimental.

— Medición de la densidad celular en las células mesenquimales por  $\text{mm}^3$ : El conteo celular por  $\text{mm}^3$  en las cuatro series del grupo experimental ha sido superior al del grupo control, con diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$ ).

Serie A:  $\bar{X}_1$ : 2.218'2956 : 857'9639 Cel.  $\times$   $\text{mm}^3$   
 $\bar{X}_2$ : 3.919'8252 : 695'2732 Cel.  $\times$   $\text{mm}^3$

Serie B:  $\bar{X}_1$ : 868'5536 : 177'4580 Cel.  $\times$   $\text{mm}^3$   
 $\bar{X}_2$ : 6.370'0312 : 443'3018 Cel.  $\times$   $\text{mm}^3$

Serie C:  $\bar{X}_1$ : 1.414'8013 : 71'6916 Cel.  $\times$   $\text{mm}^3$   
 $\bar{X}_2$ : 3.415'4111 : 93'1437 Cel.  $\times$   $\text{mm}^3$

Serie D:  $\bar{X}_1$ : 1.452'3532 : 52'5880 Cel.  $\times$   $\text{mm}^3$   
 $\bar{X}_2$ : 2.233'6049 : 63'2788 Cel.  $\times$   $\text{mm}^3$

— Medición tisular porcentual en la neoformación vascular: El resultado de las mediciones histométricas en el lecho vascular neoformado, ha puesto de manifiesto una diferencia evidente entre la primera fase de la experiencia (hasta los 14 días), con valores superiores para el grupo experimental, y la segunda fase (de 14 a 31 días), en donde la mayor proporción de neoformación vascular ha correspondido al grupo control.

Serie A:  $\bar{X}_1$ : 4'0920  $\pm$  0'0866 por 100  
 $\bar{X}_2$ : 13'5540  $\pm$  0'4732 —

Serie B:  $\bar{X}_1$ : 9'0760  $\pm$  0'1545 por 100  
 $\bar{X}_2$ : 17'9100  $\pm$  0'2718 —

Serie C:  $\bar{X}_1$ : 15'3120  $\pm$  0'2780 por 100  
 $\bar{X}_2$ : 15'1300  $\pm$  0'8837 —

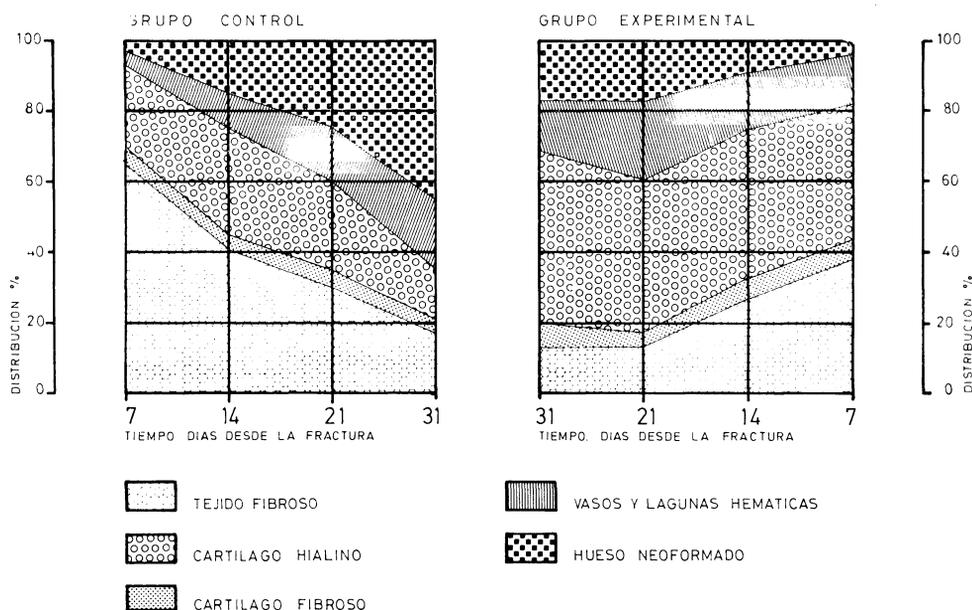
Serie D:  $\bar{X}_1$ : 17'3200  $\pm$  14'4140 por 100  
 $\bar{X}_2$ : 14'4140  $\pm$  0'2632 —

### Discusión

En un trabajo previo publicamos y defendimos (13), que la radiación ultravioleta originaba una evidente activación funcional adenohipofisaria.

Una vez establecida esta premisa y según el patrón de estudio del capítulo de resultados, estudiemos sus efectos: Comencemos con el análisis de la curva ponderal de peso, cuyas medias han arrojado un

## — HISTOMETRIA —



GRÁFICA 2. — Resultados cuantitativos obtenidos con el método histológico de Uotila. Las gráficas corresponden al volumen de los distintos componentes del callo de fractura en tantos por cien. En el grupo control y en el experimental.

marcado aumento en la primera y segundas semanas de la experiencia a favor del grupo experimental. Hecho que a DÍAZ MAYO (11) le sorprendió al hallarlo asociado a una activación tiroidea y que nosotros trataremos de esclarecer. Como se desprende del estudio adenal en nuestras series experimentales, el lóbulo anterior hipofisario se halla en período de hiperactivación; hiperfunción que afecta a cada una de sus hormonas dependientes. A este respecto, recordemos que LI y EVANS (39) consiguen duplicar el peso de sus ratas adultas tras la administración de extractos antehipofisarios. Sabemos del anabolismo proteico de la STH (GORDON y cols., 26). Sabemos que tras la radiación, existe una activación de la ACTH y derivadas (21), hormonas que a altas dosis producen obesidad; pero si estas consideraciones pue-

den resultar algo ambiguas, no lo es el que KEY y cols. (31) observen tras la administración de 3 mg. de cortisona un marcado aumento en el peso de sus ratas, que ellos atribuyen al aumento en la ingesta de los animales experimentales respecto al grupo control. Sobre la acción anabolizante de los andrógenos, huelga todo comentario. Respecto a la TSH, que sin duda está activada (11); recordemos que SOLLMAN (62) especificó claramente que sólo en dosis muy altas de TSH se consigue provocar hipertiroidismos con cuadros de adelgazamiento. Hipertiroidismo que en modo alguno objetivó DÍAZ MAYO (11).

En cuanto al mayor número y volumen de los hematomas capsulados del grupo experimental, podríamos explicarlo como consecuencia de una mayor neoformación

vascular, debida a la acción de la STH y TSH (34, 47). Hipervascularización que unida a una activa movilidad en el foco fracturario, determinaría según TRUETA (65) la ruptura vascular y la presencia de hematomas. Teoría que en nuestro caso es sugestiva si recordamos que histométricamente la neoformación vascular en las series experimentales de 7 y 14 días fue muy superior a las del grupo control; precisamente en el período que hallamos mayor número de hematomas capsulados. Pero también está activada la ACTH, y es de sobra conocida su acción depresora en la neoformación vascular, hecho que nosotros hemos hallado histométricamente a partir de la segunda semana de la experiencia. Pero quizá, la opinión más esclarecedora en esta cuestión la aportan RAGAN y cols. (56) que atribuyen la formación de estos hematomas a un enlentecimiento en la reabsorción de los mismos por una activación y acción de la ACTH.

La mayor población y tamaño en las células de la capa interna de OLLIER (53) en nuestro grupo experimental, hecho constatado a microscopía luz y avalado por la cariometría y la densidad celular estadísticamente positivas; así como la mayor cantidad de cartilago hialino confirmado tanto cariométrica como histométricamente en nuestras series experimentales; en ambos casos, cuya mayor positividad ha sido observada a los 14 días de la experiencia, nosotros atribuimos estos hechos a la acción combinada de la STH, TSH y andrógenos siguiendo la opinión reiterada de multitud de autores (2, 37, 34).

Pero a partir de la segunda semana, todos nuestros «índices de actividad» decrecen sistemáticamente en el grupo experimental, destacando entre ellos la histometría del hueso neoformado que sólo es superior a la serie control en la primera semana de la experiencia. Sin embargo, es mucho más llamativo el aumento del car-

tílogo hialino a lo largo de toda la experiencia, hecho comprobado cariométrica e histométricamente. Quizá, aparte de la activación hormonal, este hallazgo se deba a un déficit en la penetración vascular; ya que sólo en las dos primeras semanas hallamos una neoformación vascular superior en la serie experimental. De este modo queda enlentecida la osificación endocranal, esencial en el proceso reparador óseo según nuestro proceder, por ser diafisario y desplazado.

Así pues: «La radiación ultravioleta hipofisaria nos orienta hacia una posible hiperfunción generalizada en el lóbulo adenohipofisario, más intensa en las dos primeras semanas de la experiencia; hiperfunción que en lo que respecta a su acción sobre el callo de fractura determina una activación en las primeras fases del proceso reparador, pero posiblemente merced a esta misma activación hipofisaria, el callo sufre una marcada modulación condroblástica que no se acompaña de la correcta penetración vascular, dando lugar a un retardo en la osificación endocranal perióstica, que según GOMAR (24) es esencial en la consolidación de las fracturas diafisarias desplazadas en los roedores.

### Conclusiones

1. Hemos realizado utilizando métodos morfológicos, histoquímicos, histométricos, estadísticos y ultraestructurales, un estudio en la hipófisis de la rata blanca adulta tras estimulación hipofisaria observando alteraciones morfológicas en la misma y su repercusión sobre el callo de fractura diafisario femoral.

2. La estimulación adenohipofisaria (realizada con una lámpara de rayos ultravioleta y con una dosis de energía de  $450 \text{ ergios/mm}^{-2}/\text{seg.}^{-1}$ ), creemos provoca un estímulo generalizado en la misma, cuya

máxima expresión funcional se centra en las «células de la radiación» y que el estudio de la curva ponderal de peso nos muestra como positiva en las dos primeras semanas de la experiencia.

3. Células de la radiación que merced a métodos morfológicos, histoquímicos y ultraestructurales, clasificamos como de ascendencia gonadotrófica.

4. Hemos apreciado una mayor positividad a la reacción de Gomori en el lóbulo posterior hipofisario de nuestras ratas estimuladas.

5. Estimulación global hipofisaria que tras el estudio macroscópico, microscópico e histoquímico del callo de fractura diafisario, determina una activación en las primeras fases del proceso reparador; pero posiblemente, esta misma activación de las células con capacidad osteoformadora, determine una marcada «modulación» condrolástica, dando lugar a un retardo en la osificación endocranal periosteal.

### BIBLIOGRAFIA

- 1 AMANTE, S. y BIDONE, E. (1950): Azione del dipropionato di androstendiolio sulla formazione del callo nelle fracture sperimentali. *Min. Chir.*, 8, 779-784.
- 2 ASLING, C. W.; SIMPSON, M. E.; LI, C. H., y EVANS, H. M. (1950): Differences in the response to growth of rat's proximal and distal tibial epiphyses, *Anat. Rec.*, 107, 399-407.
- 3 BAILO, P. y SINIGAGLIA, D. (1955): Ormoni sessuali e terapia tisulare nelle fratture sperimentali. *Minerva. Chir.*, 10, 1230-139.
- 4 BACIU, C. (1959): L'évolution di cal osseux après scléros de la medullesurrenalé et aministration d'adrenaline en excés. Recherches expérimentales. *Lyon. Chir.*, 55, 503-514.
- 5 BOURDE (1939): Traitement des retars de consolidation osseuse par l'hormonotherapie antehypophysaire intra-focale. *Mén. Acad. de Chir.*, 65, 202-208.
- 6 BRUSH, H. V. (1945): The effect of thyroxin and stilbestrol on healing fractures in the rat. *Am. J. Anat.*, 76, 339-373.
- 7 CABANES, J., IRANZO, C. J., PÉREZ, M. J. y TECLAS, J. A. (1978): "Nuevo método policromo en dos tiempos". *An. Anat. n.º Ext.* V. 25, 99-108.
- 8 CALO, A. y PERIA, G. (1959): L'azione de STH nella guarigione delle fratture. *Minerva ortop.*, 10, 549-557.
- 9 CARNOT, P. y SLAVU, G. L. (1910): Influence de L'adrénaline sur la réparation osseuse et l'évolution du cal. *Soc. Biol. Paris.*, 68, 832.
- 10 CORDEBAR-GUILLEMANN (1956): L'action de l'hormone somatropo sur le consolidation osseuse. *Notes, de technique Chirurg.* 16, 64.
- 11 DÍAZ MAYO, M. (1974): Aportaciones al conocimiento de las transformaciones experimentales del sustrato anatómico del tiroides tras irradiación ultravioleta hipofisaria en la rata albina. Tesis. Valencia.
- 12 DUTHIE, R. B. y BARKER, A. N. (1955): Autoradiographic study of mucopolysaccharide and phosphatase complexes in bone growth and repair. *J. Bone, Jt. Surg.*, 37, b, 304-323.
- 13 ESCRIBÁ, I. y MARTÍNEZ, F. (1978): Estudio de las variaciones ultraestructurales de las células adenohipofisarias tras la estimulación con rayos ultravioleta. *An. Anat. Ext.-V-25*, 115-127.
- 14 EZRIN, C. y MURRAY, S. (1963): The cells of the human adenohipophysis in pregnancy thyroid disease and adrenal cortical disorders, in Benoit, J. y Lage. *Cytologie de l'adenohipophyse*. Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique. n.º 128, Paris.
- 15 FERNÁNDEZ SABATER, A. (1972): Biología de la consolidación fracturaria. *Medicina Clínica*, 58, 318-335.
- 16 FLODERUS, S. (1944): Untersuchungen über den Bau der muschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse. *Acta pat. microbiol. Seand, Suppl.*, 53.
- 17 FONTAINE, R., CHEVALLIER, A., KLEIN, M., MANDEL, D., WIEST, E. y GRIES, M. (1952): Action de la thyroxine sur l'évolution des fractures experimentales chez le chien. *Lyon. Chir.*, 47, 23-36.
- 18 FONTAINE, R., MANDEL, P., WIEST, E., EBELGRIES, A. y BURCKARD, J. (1954): Influence des différentes hormones et spécialement de la desoxycorticostérone, de la cortisone et de l'A. C. T. H. sur la consolidation des fractures expérimentales. *Lyon Chir.*, 49, 513-544.
- 19 GABE, M. y MARTOJA, R. (1956): Detección histoquímica de propiedades comunes en radicales y funciones, in GABE, M. *Techniques Histologiques*. París, Masson. Pág. 428-430.

- 20 GABE, M. y MARTOJA, R. (1957): Coloraciones topográficas *in* Gabe, M. *Techniques Histologiques*. Paris, Masson. 230-232.
- 21 GARCÉS, V. (1971): Aportaciones al conocimiento de las transformaciones experimentales del substrato enocrino suprarrenal tras radiaciones ultravioleta hipofisarias. Tesis Doctoral. Valencia.
- 22 GATTA, L. y SOLAZZI, F. (1962): Influenza del decanoato di norandostenolone sull'evoluzione delle fratture sperimentali. Studio istologico. *Arch. Sci. Med.*, 114, 261-272.
- 23 GOLDNER, J. (1938): Modification of Masontrichrome technique for routine laboratory purposes. *Am. J. Path.*, 14, 237-243.
- 24 GOMAR, F. (1973): *Patología quirúrgica osteoarticular*. Valencia. Ed. Saber.
- 25 GOMORI, G. (1939): A differential stain for cell types in the pancreatic islets. *Amer. J. Pathol.*, 15, 497-500.
- 26 GORDON, G. S., BENNET, L. L., LI, C. H. y EVANS, H. M. (1948): The effect of dictay protein content upon the nitrogen retention and weight gain produced by the hypophyseal growth hormone. *Endocrinology*, 42, 153-160.
- 27 HAIMI, M. S. (1952): Cortisone and action of exogenous thyrotropin in hypophysectomized rats. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 80, 175-176.
- 28 HEROLD, H., HURVITZ, A. y TADMOR, A. (1971): The effect of growth hormone on the healing of experimental bone defects. *Acta Orthop. Scandinav.*, 42, 377-384.
- 29 HILLS, R. G. y WEINBERG, J. A. (1941): Influence of estrin of callus formation. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 68, 238-247.
- 30 HULTH, A. y OLERUD, S. (1964): Early fracture callus in normal and cortisone treated rats. A study by a combinations of tetracycline labelling, microangiography and microradiography. *Acta. Orthop. Scand.* 34, 1-23.
- 31 KEY, A., ODELL, R. T. y TAYLOR, L. W. (1952): Failure of cortisone to delay or to prevent the healing of fractures in rats. *J. Bone Joint Surg.*, 34, A 665-674.
- 32 KOBAYASHI, T. (1928): L'evolution des fractures chez les animaux surrénalectomisés. *Nipon Geka Gakkai Zasshi.*, 28.
- 33 KOSDOBA, A. S. (1932): Experimentelle untersuchungen über die Heilung von knochenbrücken bei Nebennierenhyperfunction. *Arch. Klin. Chir.*, 169, 96-106.
- 34 KOSKINEN, E. V. (1959): The repair of experimental fractures under the action of growth hormone, thyrotropin and cortisone. A tissue analitic, roentgenologie and autoradiographic study *Ann. Chir. Gybea. Tenu.*, 48, sup. 90.
- 35 KOSKINEN, E. V. (1963): The effect of growth hormone and thyrotropin on human fracture healing. *Acta orthop. Scand. Suppl.*, 62, 1-67.
- 36 KOWALEWSKI, K. (1958): Incorporation of radiosulphur into the dermal connective tissue of hypothyroid rat. *Acta Endocrin.*, 38, 124-128.
- 37 LABORIT, H., FAURE, A., DUCHESNE, G. G., DECHEN, G. y BASTIT, G. (1953): Essai d'utilisation d'une somatotrophine hypophysaire en pathologie générale. Etude biologique. Indications. Premiers résultats en thérapeutique chirurgicale. *La Press Med.*, 61, 1.085-1.087.
- 38 LATARGET, R., MORENNEY, P. y BERGES, R. (1953): Un appareil simple pour la dosification du les radiations U. V. emettees pour les lampares germicides. *Ann. Institute Pasteur.*, 1704-85, 174-185.
- 39 LI, C. H. y EVANS, H. M. (1948): The biochemistry of pituitary growth hormone. *In Pincus, G. Recent Progress in Hormone Research*. Academic Press Ins., New York, 3, 3-44.
- 40 LILLYE, L. (1948): Fijación de tejidos y fijadores comunes más frecuentes. *In Mc. Manus y Mowry, R. Técnica Histologica*. Madrid. Aitka, S. A. p. 28.
- 41 LINDHOIM, R.; LINDHOIM, S., y PAASIMANKI, J. (1967): Fracture healing and mast cells. Action of combined growth hormone and thyrotropin. *Acta. Orthop. Scand.*, 38, 129-132.
- 42 LISON, L. (1935): Sur la determination du ph intracellulaire par les colorante vitaux indicateurs; L'erreur métachromatique. *Protoplasma.*, 24, 453-465.
- 43 LUCHESE, G. (1934): L'influenza delle surrenali sulla formazione del callo osseo. *Policlin. Sez. Chir.*, 41 (XI), 579-592.
- 44 MC MANUS, J. F. (1948): Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.*, 23, 99-108.
- 45 MARSIGLIA, G. (1922): Il ritardo nella consolidazione della fratture. *Arch. Ital. Chir.*, 5, 197.
- 46 MAURIZIO, A. (1965): Effecto del tratamiento sistémico o local con steroidi corticales e androgeni sol callo osseo sperimentale. *Arch. Ortop.*, 78, 285-291.
- 47 MIKKONEN, L.; LAMPIAHO, K., y KULONEN, E. (1966): Effect of thyroid hormones, somatotrophin, insulin and corticosteroids on sythesis of collagen in granulation tissue both in vivo and in vitro. *Acata. Endocr.*, (kob.) 51, 23-39.
- 48 MISOL, S.; SAMAN, N., y PONSETI, I. V. (1971): Growth hormone in delayed fracture union. *Clin. Orthop.*, 74, 206-208.
- 49 MOFFAT, W. L. y FRACIS, W. C. (1955): Estrogen in bone repair. *Surg. Gyn. Obst.*, 101, 311-316.
- 50 MOSTI, (1939): L'azione dell'ormone testi-

- colare sulla consolidazione delle fratture nei vecchi. *Ann. It. Chir.*, 18, 281-298.
- 51 NAVARRO, A. (1970): Reparación de las fracturas en hueso denervado. *Rev. Esp. de Cir. Ost.*, 5, 26, 77-132.
- 52 NUSCHENPICKEL, H. (1971): Experiences in treating pseudoarthrosis with sotropin H. *Beitr. Orthop. Trauma.*, 18, 85-87.
- 53 OLLIER, L. (1867): *Traité experimental et clinique de la regeneration des os*. Paris. Masson.
- 54 PANKRATIEW, S. (1939): Citado por Bourde, Y. en *Traitement des retards de consolidation osseuse par l'hormonotherapie antehypophysaire intrafocale*. *Med. Acad. Chir.*, 202, 19-39.
- 55 POLLOCK, G. A. (1940): The effect of theclin on fracture repair. *Proc. Mayo Clin.*, 115, 209-214.
- 56 RAGAN, G.; HOWES, E. L.; PLOTZ, C. M.; MEYER, K.; BLUNT, J. W., y LATTES, R. (1950): The effect of ACTH and cortisone on connective Tissue. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 26, 251-254.
- 57 RAVETTO, G. (1964): Histoquímica, In Martoja y Martoja, R. *Técnicas de Histología Animal*. 1.<sup>a</sup> ed. Barcelona, Torray-Masson. Pag. 182-183.
- 58 SAID, A. H. (1964): Adrenal and plasma corticosteroids and ascorbic acid content during bone fracture healing. *Nature (London)* 204. 386-7.
- 59 SHEPANEK, L. A. (1953): The effect of endocrine substances (ACTH and growth Hormone) on Experimental Fracture. *Surg. Gynec. Obst.*, 96, 200-204.
- 60 SINGH, R. H. (1963): Certain biological studies on the effect of cortisone on healing of fractures. *Indian J. Med. Res.*, 51, 1.028-1.036.
- 61 SMITH, P. E. (1930): Hypophysectomy and replacement therapy in rat. *Amer. Jour. Anat.*, 45, 205-273 .
- 62 SOLLIMAN, T. A. (1957): *Manual of Pharmacology*. 8.<sup>a</sup> ed. Philadelphia. W. Saunders.
- 63 STOREY, E. (1960): The effect of cortisone on normal and fractured bone in the rat. *Aust. Nz. J. Surg.*, 30, 36-44.
- 64 TAUBENHAUS, M. y AMROMIN, G. D. (1950): The effects of the hypophysis, thyroid, sex steroids and the adrenal cortex upon granulation tissue. *J. Lab. et Clin. Med.*, 36, 7-18.
- 65 TRUETA, J. (1958): La vascularisation des os et l'ostéogenése. *Rev. Chir. Orthop.*, 44, 3-23.
- 66 UDUPA y GUPTA, L. P. (1965): The effect of growth hormone and thyroxine in healing of fractures. *Indiane J. Med. Res.*, 53, 623-628.
- 67 UOTILA, U. (1940): Einfaches verfahren zur Bestimmung des und gewichts des Schilddrüsenkolloids. *Acta Soc. Med. Fenn. Duodecim. Ser. A*.
- 68 VITTALI, H. P. (1971): *Osteopatías Histología y Clínica*. Ed. por Sandoz.
- 69 ZADEK, R. E. y ROBINSON, R. A. (1961): The effect of growth hormone on healing of experimental long bone defects. *J. Bone Joint. Surg.*, 43, 11-261.