

Estudio experimental de la consolidación de fracturas en la desnutrición proteica.

Utilización de calcitonina en ratas desnutridas

R. GUARNIERO, T. E. P. DE BARROS, C. A. DE FREITAS, C. JUNQUEIRA, A. PEDRINELLI, M. DE ANDRADE y P.R. DOS REIS

Facultad de Medicina de la Universidad de Sao Paulo. Sao Paulo. Brasil.

Resumen.—Los autores estudian el papel de la Calcitonina en la consolidación de fracturas experimentales producidas en la tibia izquierda de 65 ratas albinas adultas. Los animales se dividían en cuatro grupos. El grupo A compuestos por 20 animales con una dieta normal y recibiendo 5 U/Kg de peso de Calcitonina diaria por vía intramuscular; el grupo B por 20 animales alimentados con una dieta no proteica y recibiendo Calcitonina diariamente y a la misma dosis que en el grupo A; el grupo C es el grupo de control, compuesto por 15 animales alimentados con dieta normal y sin medicación; por último el grupo D, también de control, compuesto por 10 animales alimentados con dieta no proteica y sin medicación. A los componentes de la dieta no proteica se añadió fécula de maíz (Maizena^R) que fue el origen calórico. Las fracturas fueron protocolizadas de forma que fueron similares en lo que respecta a su localización en diáfisis así como su forma y trazo; se escogieron las tibias para nuestro estudio debido a la facilidad con que dichas fracturas podían realizarse a mano. En todos los grupos los 2 animales fueron sacrificados a las 3 semanas de provocada la fractura. Durante este intervalo, los animales fueron alimentados con la dieta asignada a cada uno de los grupos, con o sin la administración de inyecciones intramusculares de calcitonina. Los animales de cada grupo se situaron en la misma caja, con agua «ad libitum» y sin restricción de movimientos. El hueso fue estudiado macroscópicamente, radiológicamente y microscópicamente mediante técnicas histológicas e histomorfométricas con piezas teñidas con hematoxilina-eosina. Todas las preparaciones fueron estudiadas por microscopía óptica. Los resultados llevaron a los autores a la conclusión de que la curación de la fractura en hueso largo curaba más rápido y el callo era cualitativamente mejor en animales tratados con Calcitonina, cuando eran comparados con los grupos de control.

EXPERIMENTAL STUDY ON THE CONSOLIDATION OF FRACTURES. THE ROLE OF CALCITONIN IN RATS WITH RESTRICTION PROTEIN DIET

Summary.—The authors studied the role of *Calcitonin* in the consolidation of experimental fractures produced in the left tibiae of 65 adult Albino rats. The animals were divided in four groups: *Group A:* 20 animals on a normal diet, receiving *Calcitonin* 5 U/kg body weight, intramuscular daily; *Group B:* 20 animals fed on a no-protein diet and receiving *Calcitonin* in the same dosage as Group A and daily; *Group C:* Control group- 15 animals on normal diet and without any medication; and *Group D:* Control group- 10 animals on no-protein diet and without any medication. To the components of the non-protein diet was added maize starch (Maizena^R) which was the calory-source. The fractures were standardized to meet the conditions of the experiment such as fractures should be similar concerning both their localization in the diaphyses and their shape and trace; tibiae were chosen for our study due to the readiness with which handmade fractures can be produced. In all groups the animals were killed three weeks after the fractures had been carried out. During this interval,

Correspondencia:

Dr. ROBERTO GUARNIERO
Rua Ipacarai, 68
Sao Paulo - Capital
Brasil 04011-020

animals were fed on the diet assigned to their respective groups, with or without administration of intramuscular injections of *Calcitonin*. Animals in each group were placed in the same cage, with water *ad libitum* and no restriction to movements. The bone healing was studied macroscopically, radiologically, and microscopically through histologic and histomorphometric techniques with the samples stained with hematoxylin-eosin. AD slices were studied by optic microscopy. The results led the authors to the conclusion that long bone fracture healing progressed faster and the calli were qualitatively better in animals treated with *Calcitonin*, when compared to the controls.

INTRODUCCIÓN

La Calcitonina es considerada como una hormona que podría actuar favorablemente en la consolidación de las fracturas estimulándola y acelerando el proceso (1, 2). No obstante, trabajos experimentales llevados a cabo para demostrar esta eficacia no muestran efectos significativos de esta hormona en el proceso de consolidación (3-5).

Los posibles beneficios de la calcitonina sobre la consolidación son consecuencia de su efecto inhibitorio sobre la actividad osteoclástica, quedando estimulada por tanto la actividad osteoblástica (1, 2, 6, 7).

En este trabajo experimental procuramos evidenciar el efecto de esta hormona en el formación del callo óseo en fracturas de huesos largos en ratas sometidas a la administración intramuscular de calcitonina sintética de salmón.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 65 ratas albinas adultas de raza Wistar de ambos sexos, con un peso inicial que variaba entre 200 y 390 gr. divididas en cuatro grupos (tabla I).

El primer grupo (grupo A) estaba compuesto por 20 animales, alimentados con dieta normal. Después de realizadas experimentalmente las fracturas, estos animales permanecían alimentados con esta misma dieta y recibiendo una inyección intramuscular diaria de calcitonina a dosis de 5 UI/Kgr/día, hasta sacrificarlas a las 3 semanas de producida la fractura.

El segundo grupo (grupo B) estaba compuesto también por otros 20 animales, alimentados con una dieta sin proteínas (tabla II) durante los 15 días anteriores a provocarles las fracturas. Estos animales permanecían con la misma dieta y recibiendo inyecciones intramusculares dia-

Tabla I: Diseño del experimento. 65 animales.

Grupo	Número	Dieta	Medicación*	Sacrificio**
A	20	Normal	+	3 semanas
B	20	No-proteica	+	3 semanas
C	15	Normal	—	3 semanas
D	10	No-proteica	—	3 semanas

* Calcitonina 5 UI/Kgr peso/día IM

** Después de la fractura experimental

rias de calcitonina, en dosis de 5 UI/Kgr/día, sacrificándolas también a las 3 semanas de provocadas las fracturas.

El tercer grupo (grupo C) estaba compuesto por 15 animales alimentados con dieta normal durante 3 semanas, hasta que fueron sacrificadas y servían como control en este experimento sin recibir calcitonina.

El cuarto grupo (grupo D) lo componían 10 animales, mantenidos con una dieta sin proteínas durante un periodo de 15 días, antes de provocarles las fracturas. Estos animales permanecían con esta misma dieta para servir como control, sin recibir calcitonina y fueron sacrificados a las 3 semanas de producidas las fracturas.

Se escogieron ratas adultas como animales de experimentación porque tienen algunas ventajas, tales como el bajo coste y fácil manutención en jaulas colectivas; fácil producción de fracturas experimentales en huesos largos con características similares en cuanto a localización y forma del trazo. Esta fractura experimental en la rata muestra una rápida curación y no es necesario mantener una inmovilización externa. A los animales les fue permitida la actividad normal sin restricciones en cuanto a deambulación.

La dieta no proteica dada a los animales de los grupos B y D se describe en la tabla II. A sus componentes se añadió fécula de maíz (Maizena^R) como aporte calórico. Esta es una dieta habitual para la malnutrición experimental (8).

Antes de realizar las fracturas los animales fueron pesados. Los animales fueron anestesiados con éter etílico para la producción de la fractura y fueron sacrificados en todos los grupos, a las 3 semanas mediante una sobredosis de un agente anestésico.

Tabla II: Composición de la dieta no proteica.

Composición	Gramos
MgSO ₄	94.500
NaCl.....	240.000
KCl.....	120.000
FeSO ₄ (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₆ H ₂ O.....	21.600
CaSO ₄ ó CaCl ₂	1.200
MnSO ₄	1.200
ZnSO ₄	1.500
K.....	0.063
CaHSO ₄	720.000
Acido Benzoico.....	30.000
Fécula de Maíz c.s.p.	30.000.000
TOTAL (30 kgr. dieta)	1.230.063

Tabla III: Peso medio (gr) de los animales (Grupos A y C).

Grupo	Inicial	Sacrificio
A	269,25	321,95
C	228,47	266,67
Grupo A x Grupo C: Inicial	z=4,48 (*)	
Sacrificio	z=3,73 (*)	

(*) Significativo p<0,05

Tabla IV: Peso medio (gr) de los animales (Grupos B y D).

Grupo	Inicial	2-semanas	Sacrificio
B	359,58	331,20	285,00
D	291,60	224,60	189,30
Grupo B x Grupo D: Inicial	z=4,00 (*)		
2 semanas	z=4,36 (*)		
Sacrificio	z=4,18 (*)		

(*) Significativo p<0,05

Criterios de valoración

El material fue estudiado en lo referente a los cambios de peso sufridos por el animal durante el experimento, valoración radiológica del proceso de consolidación, y valoración macroscópica e histológica del callo de fractura.

— *Valoración del peso:* en los animales de los grupos A y C el pesaje fue realizado el día de producción de las fracturas y cuando se sacrificaron los animales. En el grupo B y D se pesaron al comienzo del periodo de la dieta no proteica, al llevarse a cabo la fractura y el día de sacrificio (tablas III y IV).

— *Valoración radiológica:* una vez sacrificados los animales, fueron disecadas sus patas traseras y posteriormente estudiadas radiográficamente. Se utilizaron proyecciones radiográficas laterales, puesto que la proyección anteroposterior resulta difícil el obtenerla sin desarticular la rodilla (9).

— *Valoración macroscópica:* se valoró manualmente la movilidad en el foco de fractura y se establecieron grados sobre una escala que variaba de 0 a 2 (10, 11). La fractura consolidada sin movilidad en el foco durante el test manual fue etiquetada como grado 0; cuando había total movilidad en el foco recibía el grado 2; mientras que cuando la movilidad era intermedia se puntuó como grado 1.

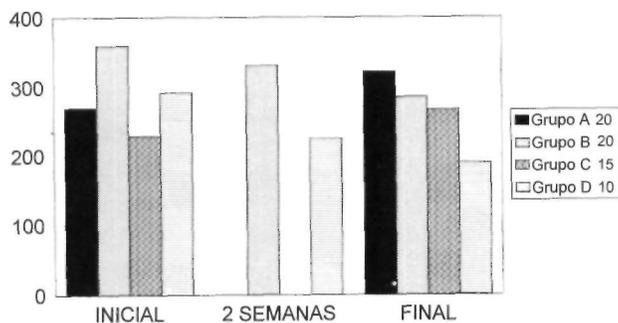


Figura 1. Gráfico mostrando la variación en peso medio de los animales al comienzo y final del periodo experimental.



Figura 2. Imagen radiográfica ampliada. Piezas de los animales del grupo A. Observar el callo externo.

— *Valoración histológica:* las piezas se fijaron con formalina el 10%, decalcificadas con ácido nítrico al 7% e incluidas en parafina. Se obtuvieron las preparaciones microscópicas y se estudiaron tras ser teñidas con hematoxilina-eosina. Todas las preparaciones fueron observadas mediante microscopía óptica. La valoración histológica ayudó a determinar la cantidad de tejido fi-

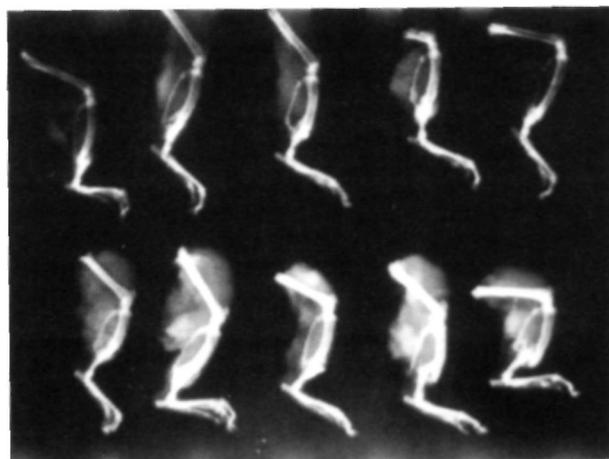


Figura 3. Valoración radiográfica. Piezas de los animales del grupo B.

Tabla V: Valoración macroscópica.

Grado	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
0	20 (100%)	10 (52.6%)	8 (53.3%)	0 (0)
1	0 (0)	8 (42.1%)	7 (46.6%)	4 (40%)
2	0 (0)	1 (5.2%)	0 (0)	6 (60%)
χ^2	20 40*	19 7.05*	15 7.60*	10 5.60

(*) Significativo $p < 0.05$

Tabla VI: Valoración histológica. Fibrosis.

Grado	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+ / +++	18 (100%)	15 (78.9%)	8 (53.3%)	2 (20%)
+++ / +++++	0 (0)	4 (21%)	7 (46.6%)	8 (80%)

GRUPO A X GRUPO C $\chi^2=10.66$ Significativo $p < 0.05$
 GRUPO B X GRUPO D $\chi^2=9.39$ Significativo $p < 0.05$

broso, cartilaginoso y óseo presentes en las muestras para la histomorfometría.

— *Análisis estadístico:* para el análisis estadístico fueron utilizados tests no-paramétrico. Así, la variación del peso de los animales fue comparada por el test señal, análisis de la varianza de Friedman y el U-test no paramétrico de Mann-Whitney; para el análisis macroscópico fue utilizado el test del chi-cuadrado (χ^2) y para el análisis histológico fueron utilizados el test no paramétrico de Friedman y el U-test de Mann-Whitney (8).

RESULTADOS

— *Variación del peso:* en las tablas 3 y 4 así como en la figura 1 se observa la variación del peso de los animales en los diferentes grupos, al comienzo y final del período experimental y el día de producción de la fractura experimental, así como su análisis estadístico.

— *Valoración radiológica:* notamos un callo óseo de mejor calidad en las muestras de los animales de los grupos A y B que recibieron calcitonina

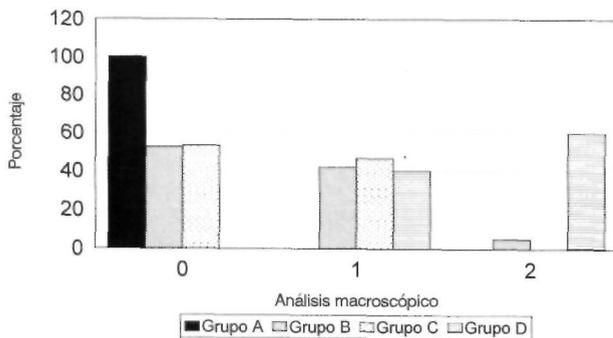


Figura 4. Gráfico mostrando el resultado de la valoración macroscópica.

Tabla VII: Valoración histológica. Cartilago.

Grado	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+ / +++	16 (88.8%)	9 (47.3%)	4 (26.6%)	8 (80%)
+++ / +++++	2 (11.1%)	10 (52.6%)	11 (73.3%)	2 (20%)

GRUPO A X GRUPO C $\chi^2=13.27$ Significativo $p < 0.05$
 GRUPO B X GRUPO D $\chi^2=2.88$ No significativo

Tabla VIII: Valoración histológica. Hueso.

Grado	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+ / +++	0 (0)	10 (52.6%)	5 (33.3%)	10 (100%)
+++ / +++++	18 (100%)	9 (47.3%)	10 (66.6%)	0 (0)

GRUPO A X GRUPO C $\chi^2=7.07$ Significativo $p < 0.05$
 GRUPO B X GRUPO D $\chi^2=6.87$ Significativo $p < 0.05$

Tabla IX: Análisis histomorfométrico (%).

Tejido	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Fibrosis	9.44	20.60	17.10	57.70
Cartilago	16.78	44.50	23.10	19.60
Hueso	73.78	34.90	59.80	22.80
χ^2	31.00 (*)	16.80 (*)	12.20 (*)	8.60 (*)

(*) Significativo $p < 0.05$

na comparados con los controles. Las figuras 2 y 3 ilustran alguno de estos aspectos.

— *Valoración macroscópica:* los resultados del test macroscópico se muestran en la tabla 5 y figura 4. En el grupo A se observa consolidación total en todas las muestras, mientras que en el grupo C este resultado fue únicamente alcanzado en el 53,33% de las piezas (diferencia estadísticamente significativa). En los animales del grupo B, la consolidación ocurrió en el 52,63% de las muestras, mientras en el grupo D no se observó consolidación total, resultado este último estadísticamente significativo.

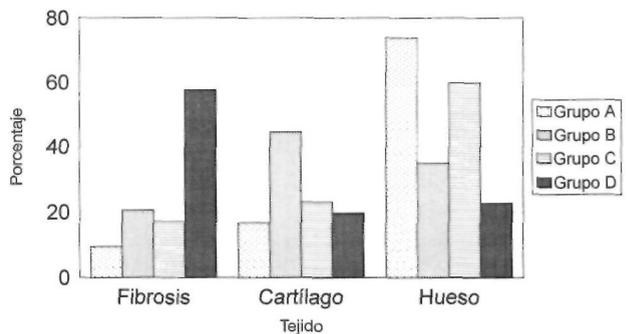


Figura 5. Gráfico mostrando el resultado de la valoración microscópica. Análisis Histomorfométrico.

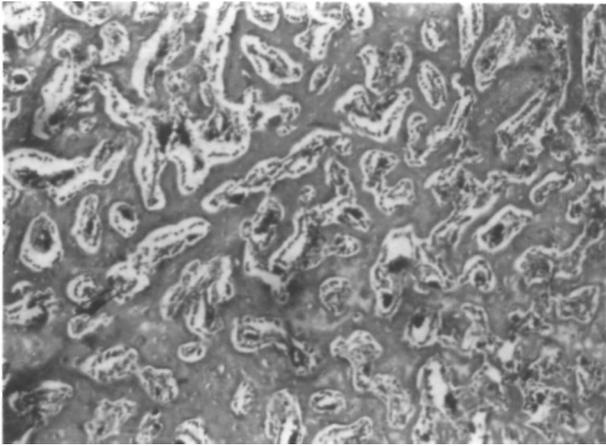


Figura 6. Aspecto microscópico. Tejido óseo. Grupo A (Hematoxilina-eosina x 120).

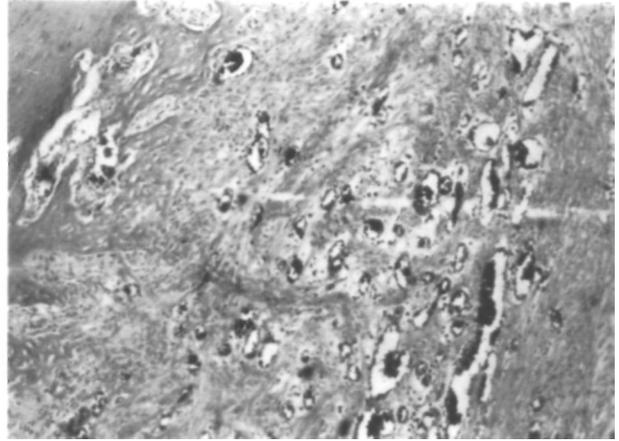


Figura 7. Aspecto microscópico. Tejido fibroso. Observar la congestión vascular. Grupo A (hematoxilina-eosina x 120).

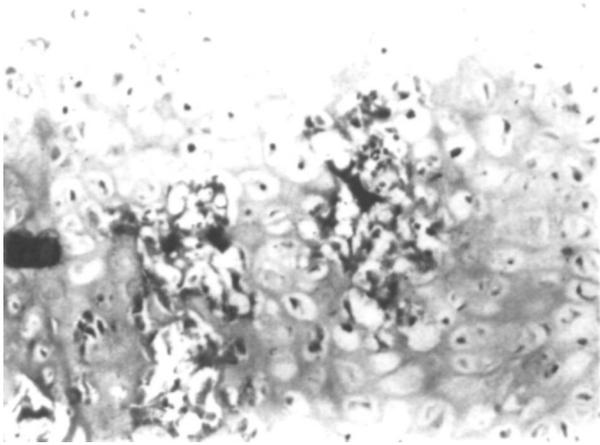


Figura 8. Aspecto microscópico. Tejido cartilaginoso. Observar la congestión vascular. Grupo A (Hematoxilina-eosina x 120).

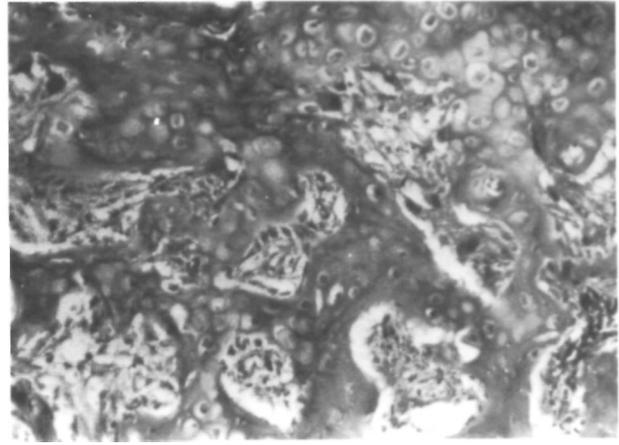


Figura 9. Aspecto microscópico. Tejido cartilaginoso. Observar la congestión vascular. Grupo B (Hematoxilina-eosina x 120).

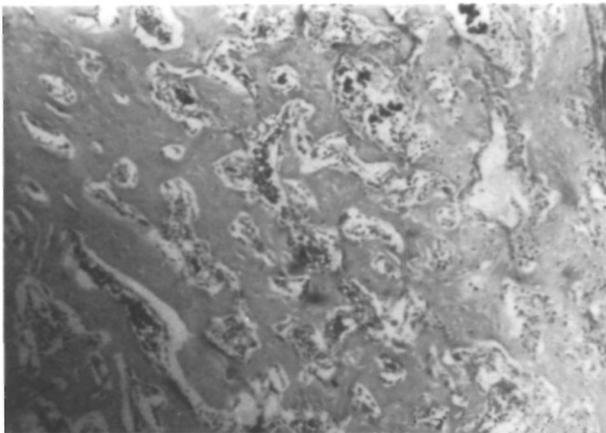


Figura 10. Aspecto microscópico. Tejido óseo. Grupo B (Hematoxilina-eosina x 120).

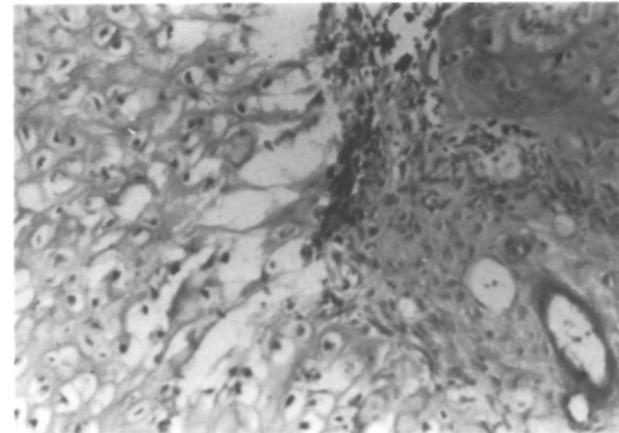


Figura 11. Aspecto microscópico. Tejidos óseos y cartilaginosa. Grupo B (Hematoxilina-eosina x 120).

— *Valoración histológica:* el resultado de la valoración con respecto a cantidades de tejido fibroso, cartilaginosa, ósea y análisis histomorfométrico de las piezas se muestra en las tablas 6, 7, 8 y 9 y fi-

gura 5. Verificamos que la formación de tejido óseo se favoreció en aquellas muestras de animales que recibieron calcitonina, tanto en dietas normales como no proteica. El tejido fibroso aparecía en

grandes cantidades en las muestras de los animales del grupo de control, mientras la presencia de tejido cartilaginoso era similar entre los grupos. En las figuras 6, 7, 8, 9, 10 y 11 se muestran los principales hallazgos del análisis histológico.

Por el análisis histomorfométrico verificamos cantidades decrecientes de tejido óseo en los grupos A (73,78%), grupo C (59,80%), grupo B (34,90%) y grupo D (22,80%).

En relación al tejido fibroso comprobamos cantidades decrecientes en grupo D (57,70%), grupo B (20,60%), grupo C (17,10%) y grupo A (9,44%).

Con respecto a la cantidad de tejido cartilaginoso fueron observadas cantidades similares en todos los grupos, siendo mayor en el grupo B.

DISCUSIÓN

La consolidación ósea es un fenómeno fisiológica de significado actual ya que existen muchas dudas y problemas todavía no resueltos respecto al proceso de curación.

Los estudios sobre fracturas producidas experimentalmente deberían ser similares para poder realizar comparaciones, como han señalado muchos autores (5, 12 y 13). Deben ser similares con respecto a su forma, trazo y localización. En nuestro modelo se realizaron fácilmente mediante osteoclasia manual, consiguiendo así el mismo trazo y localización, no ofreciendo dificultades para el modelo experimental conforme a las observaciones de Urist y MacLean (14).

En nuestro modelo no se utilizó fijación metálica con objeto de facilitar el estudio de la formación del callo en cada pieza, sin interferencia de la síntesis y sin reacción tisular que interfiera el proceso de curación, hecho ampliamente admitido en la literatura (5, 13, 15-17).

Coincidimos con Aro y cols. (9, 18) que la etapa más importante en la consolidación ósea es la forma-

ción de un puente óseo intacto entre los fragmentos óseos fracturados. Según estos autores, las fracturas experimentales en las tibias de rata alcanza el estadio de osificación tras un intervalo de cuatro semanas. Basándonos en estas observaciones decidimos que los animales fueran sacrificados tres semanas después de la producción de las fracturas, puesto que así sería posible el estudio de forma satisfactoria de todo el periodo precoz de regeneración del callo de fractura.

Los resultados macroscópicos muestran que las piezas de los animales del grupo A, alimentados con dieta normal y a los que se administró calcitonina, ya mostraban consolidación ósea a las tres semanas. Estas observaciones están de acuerdo con otros trabajos previos (1, 6, 7) que señalaban la formación de mayores callos de fractura en los animales que recibían calcitonina comparándolos con el grupo de control. Esto es debido a la desproporción entre formación de tejido óseo y reabsorción.

Los resultados de la valoración de los componentes tisulares en las distintas piezas, mostraba la formación de grandes cantidades de tejido óseo en las fracturas de los animales de los grupos A y B.

Durante la formación del callo se produce un aumento de la síntesis proteica y de colágena por parte de los condroblastos y osteoblastos, así como multiplicación de las células osteogénicas y su diferenciación a osteoblastos (17, 19). La acción de la calcitonina sería el favorecer la actividad osteoblástica, secundariamente a la inhibición de la reabsorción, pero añadimos con Delling y cols. (1) y basándonos en este estudio que no podemos establecer con certeza esta acción y es posible que pudiera ocurrir un aumento en la neoformación ósea.

Es imposible un estudio similar en ser humano por la naturaleza de esta investigación y las innumerables variables que se verían envueltas, influenciando así los resultados. Mientras que basándonos en estudios realizados en animal de laboratorio, tenemos evidencias para afirmar la acción favorable de la calcitonina sobre la consolidación de las fracturas.

Bibliografía

1. **Delling G, Schaffer A, Ziegler R.** The effect of calcitonin on fracture healing and ectopic bone formation in the rat EN Calcitonin 1969, Proc Second International Symposium. London. Heinemann Medical Books 1979.
2. **Duriez J.** Calcitonine et fracture. Ann Chir 1979; 33: 3-7.
3. **Ekeland A, Underdal T.** Effects of salmon calcitonin on synthesis and mineralization of collagen in rats. Acta Orthop Scand 1983; 54: 470-8.
4. **Ewald F, Tachdjian MO.** The effect of thyrocalcitonin on fractured humeri. Surg Gynecol Obstet 1967; 125: 1075-80.
5. **Guarniero R.** An experimental study of compression osteosynthesis. Thesis. University of São Paulo School of Medicine 1981.
6. **McKibbin B.** The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg 1978; 60B: 150-62.

7. **Schatzker J, Chapman M, Haeri GB, Fornasieri VL, Sumner-Smith G, Williams C.** The effect of Calcitonin of fracture healing. *Clin Orthop* 1979; 141: 303-6.
8. **Modolin M LA, Bevilacqua RG, Margarido NF, Lima-Gonçalves E.** Cicatrização das feridas abertas na desnutrição com hipoproteinemia. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 1982; 37: 275-8.
9. **Aro H, Erola E, Aho AJ.** Determination of callus quantity in 4 week-old fractures of the rat tibia. *J Orthop Res* 1985; 3: 101-8.
10. **Herd CW, Griffith RB, Dudrick SJ.** The positive impact of nutritional support on fracture healing. En: *Abstracts VI ASPEN Congress*. San Francisco 1982.
11. **Heard CW, Griffith RB, Dudrick SJ.** The effects of nutrition on fracture healing. *Orthopaedic Trans* 1982; 6: 102.
12. **Koberle G.** Physical and biological studies in bone tissue. Thesis. University of São Paulo School of Medicine. Ribeirão Preto 1974.
13. **Guarniero R, Peixinho M, Oliveira NRB de, Camarago OF, Barros TEP, Rodrigues R.** An experimental study of compression osteosynthesis: histological basis. *Acta Ortop Latinoam* 1983; 10: 117-58.
14. **Urist MR, McLean FC.** Bone repair in rats with multiple fractures. *Am J Surg* 15: 685-95.
15. **Camargo JN Jr.** An experimental comparative study on the morphology and cellular population dynamics of the consolidation callus of long bone fractures treated with and without intramedullary osteosynthesis. Thesis. University of São Paulo School of Medicine 1972.
16. **Guarniero R, Barros TEP, Camargo OP de, Oliveira NRB, Peixinho M.** An experimental study on cortical espongization (stress-protection) using metallic plates. *Rev Bras Ortop* 1986; 21: 149-52.
17. **Guarniero R, Barros TEP, Camargo OP de, Pecora JR, Oliveira NRB de.** Tissue reaction to implant material. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 1986; 41: 190-3.
18. **Aro H, Erola E, Aho AJ, Penttinen R.** Healing of experimental fractures in denervated limb of the rat. *Clin Orthop* 1981; 155:211-8.
19. **Haw AW.** Histology. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan 1967.