

Patología experimental del hueso: La inyección intraosea de acetato de plomo como modelo experimental

P. Herranz y G. Herranz

RESUMEN

La inyección de acetato de plomo en la cavidad medular del fémur de conejo en crecimiento, provoca una secuencia de cambios perfectamente reproducibles, que hacen de este procedimiento un modelo experimental para el estudio de la reactividad del complejo hueso-médula ósea. Estos cambios consisten, en primer lugar, en una necrosis distribuida en amplios focos que afecta a la médula ósea, al aparato metafisario de crecimiento, a la compacta cortical, y al endostio, con infiltración plomo-calcárea de los territorios necrosados.

La reacción del hueso está compuesta, en primer lugar, por fenómenos de reabsorción (osteoclástica, oncótica y conjuntiva). La remoción de los precipitados plomo-calcáreos por la actividad macrofágica es estudiada en relación con el posible efecto de la estimulación paratiroidea. La placa epifisaria es inhibida temporalmente tras la inyección de acetato de plomo, para reasumir posteriormente su crecimiento. La neoformación ósea es ubicuitaria, pues se observa deposición endóstica, perióstica, intersticial, libre en la cavidad medular (en torno a detritus celulares), sobre las trabéculas de la esponjosa. Se analizan los factores que pueden poner en marcha esta activa osteogénesis.

El estudio microscópico de las enfermedades del hueso constituye uno de los campos más fascinantes de la Patología, pues en ellas se manifiestan de modo singular las capacidades de reacción, adaptación, crecimiento y transformación de una compleja población celular, la cual, ya en condiciones normales muestra un dinamismo único. Un factor que

contribuye a extender ampliamente las capacidades reactivas de este notable derivado del mesénquima es su estrecha relación con la médula ósea, tal como se manifiesta por ejemplo en la entidad denominada osteomielosclerosis. Sólo en tiempos recientes se ha intentado, con dudoso éxito, la producción experimental de este cuadro patológico (Selye, Gab-

biani, Tuchweber), mediante la inyección intravenosa de acetato de plomo en la rata. Al querer extender este procedimiento al conejo, observamos que era prácticamente imposible obtener un grado apreciable de ostemielosclerosis administrando el acetato de plomo por vía endovenosa, por lo que optamos por la alternativa de aplicarlo directamente al hueso mediante su inyección en la cavidad medular. El cuadro morfológico resultante viene a constituir un inventario prácticamente completo de la reactividad del hueso a una injuria, ilustrando de modo ejemplar las interacciones y relaciones entre involucro óseo y contenido medular. Tal como se irá mostrando a lo largo de este trabajo, este experimento, de gran sencillez técnica, posee un valor demostrativo sobresaliente de las alteraciones regresivas y reactivas de la unidad osteo-medular que puede hacerlo de gran utilidad como modelo didáctico y, posiblemente, también como modelo experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon conejos de la variedad gigante de España, cuyo peso al comienzo de la experiencia osciló entre 700 y 1.000 gr. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales y recibieron como alimentación un pienso compuesto seco. La temperatura del establo se mantuvo entre 18 y 20° C.

Los animales recibieron como único tratamiento inyecciones intraóseas, en la diáfisis femoral, de una solución al 50 % de acetato de plomo ($(\text{CH}_3 - \text{COO})_2 \text{Pb} + 3\text{H}_2\text{O}$) Merck, en agua destilada, a razón de 175 mgr. por kilogramo de peso e inyección, según el siguiente plan:

Grupo I. Se aplicaron inyecciones los días 1 y 3 de la experiencia, en las diáfisis femorales derecha e izquierda respectivamente. Los animales fueron sacrificados en grupos de 2 los días 3 (tras

una sola inyección), 6, 15, 30 y 50 de comenzado el experimento.

Grupo II. Cuatro animales recibieron tres inyecciones en el fémur derecho los días 1, 5 y 9, para ser sacrificados los días 30 y 50 de la experiencia.

La solución de acetato de plomo se preparaba inmediatamente antes de ser administrada y presentaba una ligera opalescencia. Los animales eran preparados mediante anestesia con pentobarbital sódico y depilación a nivel del punto a inyectar. Para la inyección se utilizaban agujas de las empleadas para la punción lumbar (de 60 mm. de longitud y calibre 10/18) con las que se perforaba la cortical diafisaria hasta alcanzar la cavidad medular. Antes de la inyección lenta de la sal de plomo se procedía a aspirar por medio de una jeringa a fin de comprobar que la cavidad medular había sido alcanzada.

Con objeto de comparar los cambios observados en los animales sometidos a los efectos del acetato de plomo, se estudiaron preparaciones similares de 5 conejos de la misma raza, de edad y peso similar, mantenidos en idénticas condiciones pero a los que no se administró dicho compuesto.

Inmediatamente después de matar a los animales mediante un golpe en la nuca se practicaba la autopsia completa, incluyendo siempre ambos fémures y húmeros y glándulas paratiroides. Los huesos largos se cortaban transversalmente con una sierra en cinco fragmentos: tres correspondientes a la diáfisis y dos que comprendan las epífisis con la región metafisaria adyacente y la porción más extrema de la diáfisis. Los fragmentos de huesos eran fijados durante 24 horas en formol al 10 % en un puffer de fosfato de pH 7,4 para ser trasladados a continuación a una solución decalcificante, consistente en una solución de ácido nítrico al 5 % en formol al 10 %. Para

acelerar la decalcificación se renovaba la solución de nítrico-formol, manteniéndola en agitación continua y a una temperatura de 38° C. El tiempo necesario para obtener una decalcificación correcta era de 20-24 horas. Tras un lavado en una corriente de agua de grifo y eventual paso de los bloques por una solución de carbonato de litio (Bargmann, 1959) se realizó la inclusión en parafina. Los cortes fueron teñidos sistemáticamente por las siguientes técnicas: Hematoxilina-eosina, hematoxilina-floxina, hematoxilina fosfotúngstica de Mallory según la modificación de Putschler, Sweat y Doss⁹¹ y tricrómico de Mallory. En los casos en que se juzgó oportuno, se obtuvieron preparaciones teñidas por las técnicas de la reticulina (Gordon y Sweet)⁴⁰, ácido perródico-Schiff-hematoxilina, azul de toluidina y la demostración histoquímica del plomo por medio del rodizonato sódico (Pearse)⁸⁴, tras decalcificación en una solución de sulfato sódico al 10 % en ácido sulfúrico al 10 %. Finalmente se montaron preparaciones sin teñir para el examen con luz polarizada.

RESULTADOS

Grupo I

1. Hallazgos a las 72 horas.

Como era de esperar, el cuadro morfológico está dominado por intensos fenómenos regresivos, consistentes en necrosis y calcificación. Su distribución no es homogénea, mostrando mayor intensidad en la zona metadiáfisaria. El cartílago de crecimiento, las trabéculas de la esponjosa primaria y la médula ósea contienen numerosos focos de necrosis calcificada, de tamaño que oscila entre 0,3 y 0,6 mm. de diámetro, que tienden a confluir en algunos casos. Estos focos necróticos dan positiva la reacción para el plomo por medio del rodizonato sódico (figs. 1, 2 y 3).

La necrosis afecta también a la cortical diafisaria, observándose desaparición y retracción de los osteocitos en los sistemas laminares fundamentales internos, junto con áreas de micropetrosis en la substancia intercelular del hueso. La penetración de la sal de plomo puede seguirse a lo largo de algunos conductos de Volkmann y haversianos. Está señalada por la presencia de finos depósitos lineares, refringentes, de color verde amarillento que incrustan la superficie de estos conductos y la zona normalmente ocupada por el endostio. Este se ha desprendido en grandes extensiones a causa de hemorragias que lo separan de la cortical. Los vasos nutricios muestran también depósitos cristalinos en la porción externa de la advertencia, mientras que en las áreas que limitan con los focos de necrosis los sinusoides medulares aparecen dilatados, a veces trombosados o con incrustación calcárea de su pared.

Las lesiones en la epífisis y en el hueso contralateral son muy ligeras y se reducen a focos de necrosis muy pequeños en la médula ósea con indemnidad de las estructuras del hueso.

2. Hallazgos a los 6 días.

En los animales que recibieron dos inyecciones, una en cada fémur, sólo son de destacar las alteraciones presentes en el hueso inyectado el día 1, en el que se combinan a los cambios regresivos las primeras manifestaciones de reacción del tejido óseo. La mitad interna del tubo diafisario es asiento de una fuerte reabsorción osteoporótica a la vez que las lagunas óseas de las extensas zonas necrosadas aparecen ya vacías y notablemente ensanchadas. En la cara subperióstica del tallo diafisario se observa la coexistencia de una viva reabsorción osteoclástica con el inicio de deposición de hueso perióstico, pero este último rasgo es todavía poco intenso y aparece limitado a los extremos proximal y distal de



Fig. 1.—Vista panorámica de la extremidad proximal de fémur en la que puede observarse la amplia distribución de la necrosis inducida por la inyección de acetato de plomo. Dentro de las áreas de necrosis se reconocen los focos de calcificación. Obsérvese que casi la totalidad de las trabéculas de osificación endocondral han sido alcanzadas por el proceso de necrosis. (72 horas después de la administración de acetato de plomo).

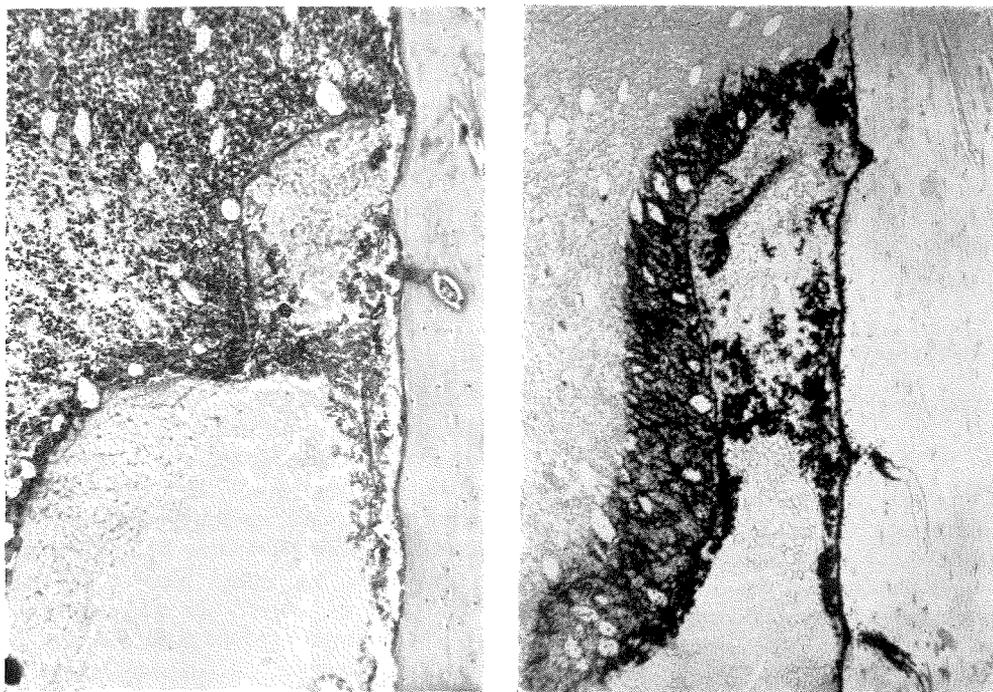


Fig. 2.—Se observa la presencia de un arrancamiento del endostio a causa de una hemorragia y la abundancia de precipitados de la sal de plomo que reviste la superficie desnuda del hueso compacto, se extiende por los conductos de Volkmann y por las zonas de necrosis medular. Los osteocitos aparecen todavía presentes en las lagunas óseas (M. E.) (72 h.).

En B, tras la decalcificación en ácido sulfúrico-sulfato sódico y coloración con rodizonato sódico, se observa la presencia de plomo en forma de un material intensamente negro en la fotografía (rojo escarlata en la preparación original). El fondo ha sido teñido ligeramente con verde luz. (72 horas después de la administración de acetato de plomo).

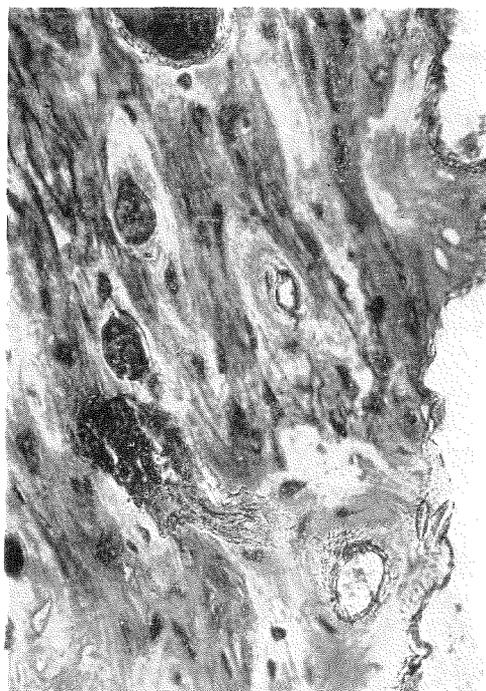


Fig. 3.—Detalle de la afectación de la compacta diafisaria. Calcificación masiva de los espacios haserianos y del contenido de las lagunas. La estructura de la sustancia intercelular parece indicar que se han calcificado las estructuras fibrilares y no la sustancia fundamental. (72 horas después de la administración de acetato de plomo).

la diáfisis. La remoción de hueso en la cara endostal se acompaña de una intensa fagocitosis del ribete plúmbico lo cual es manifiesto también en los depósitos amorfos o cristalinos de la región metafisaria y de la cavidad medular. Los macrófagos aparecen aislados o en masas considerables, con el citoplasma repleto de gránulos de color amarillo-verdoso, que muestran una reacción fuertemente positiva para el PAS y con el rodizonato sódico. Los precipitados calcáreos, tan abundantes a los 3 días, se han reducido apreciablemente de tamaño.

A partir de las zonas indemnes del endostio se inicia una activa neoformación ósea que resulta en la formación de finas

espículas de osteoide apuestas sobre la superficie endóstica de la cortical o también a una cierta distancia de ella, en los casos en que el endostio resultó despegado por la hemorragia. Es interesante señalar que las espículas se depositan tanto en contacto con hueso viable como sobre el hueso necrosado y que, aunque en menor medida, existe también aposición ósea en contacto con las trabéculas de la esponjosa primaria.

En la cavidad medular, además de los procesos de remoción del material necrótico calcificado, y de la fagocitosis de la sal de plomo, se advierte una más

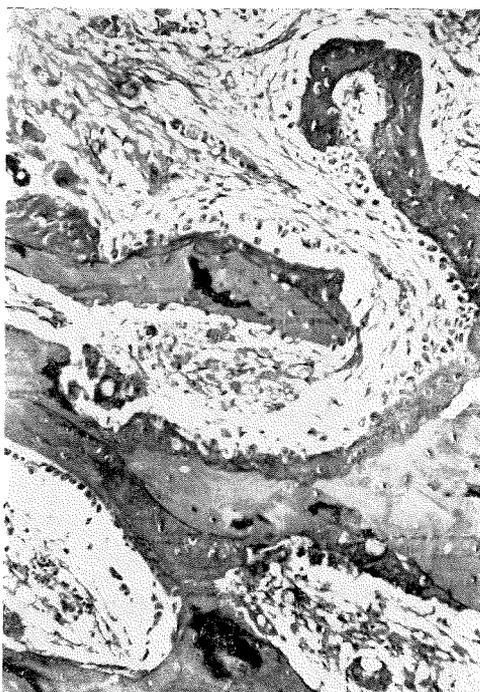


Fig. 4.—Los hallazgos en la zona de osificación endocondral varían notablemente de unas áreas a otras. En la fotografía vemos la aposición de un hueso fibrilar joven sobre las trabéculas preexistentes. Ello parece estar claramente en relación con la preservación o destrucción total del tejido medular. Junto a la presencia de abundantes macrófagos se observa una médula fibrosa. (15 días después de la administración de acetato de plomo).

clara delimitación de las áreas necróticas, una proliferación de elementos de tipo fibroblástico y una acumulación creciente de macrófagos que toman en algunas pocas ocasiones la forma de células gigantes de cuerpo extraño. En la advertencia de los vasos nutricios es particularmente intensa la infiltración de elementos macrofágicos.

3. Hallazgos a los 15 días.

El fémur de uno y otro lado inyectados con tres días de diferencia, presentan un cuadro histológico similar. El examen histológico muestra una acentuación de



Fig. 5.—La formación de endofitos de origen endóstico es evidente en la figura. En ella, entre la compacta diafisaria y el hueso neoformado se interpone una ancha banda de fibrosis. Ello es debido al desplegamiento del endostio que, de modo sistemático, ocurre tras la inyección de acetato de plomo. Obsérvese la notable recuperación de la médula ósea hematopoyética. H. E. (15 días después de la administración de acetato de plomo).

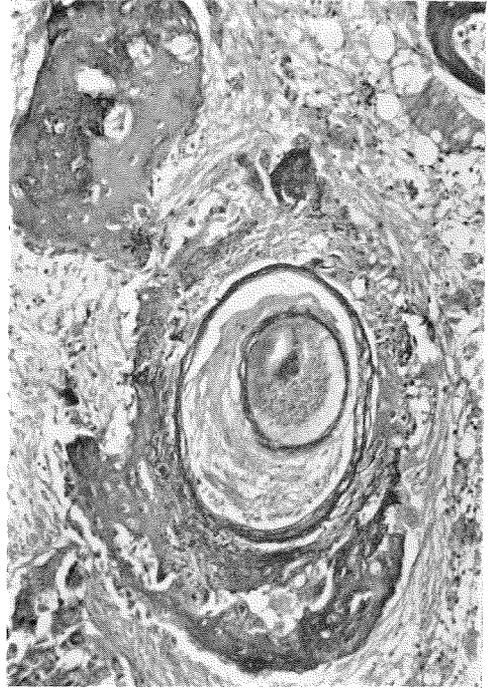


Fig. 6.—Una curiosa imagen es la que ofrece la arteria nutricia en la cual, aparte de la calcificación parietal, la trombosis y la recanalización, se observa el desarrollo de espículas óseas depositadas por osificación conjuntiva sobre detritus celulares. Estos de modo constante muestran una fuerte positividad cuando se colorea con el PAS, como en la presente figura (15 días después de la administración de acetato de plomo).

los procesos ya señalados a los 6 días. La osteoporosis de la mitad interna de la cortical ha alcanzado su máximo desarrollo gracias a la actividad osteoclástica, pero se inicia en algunos puntos el proceso de reconstrucción de osteonas, a nivel de la compacta diafisaria osteoporótica. La neoformación ósea es patente también a nivel del periostio y cobra gran incremento sobre las trabéculas metafisarias, donde parece ya terminada la remoción de las áreas necróticas. No es infrecuente observar que las espículas de hueso neoformado contienen en su interior restos de hueso endocondral preexistente. Sin embargo, la máxima actividad

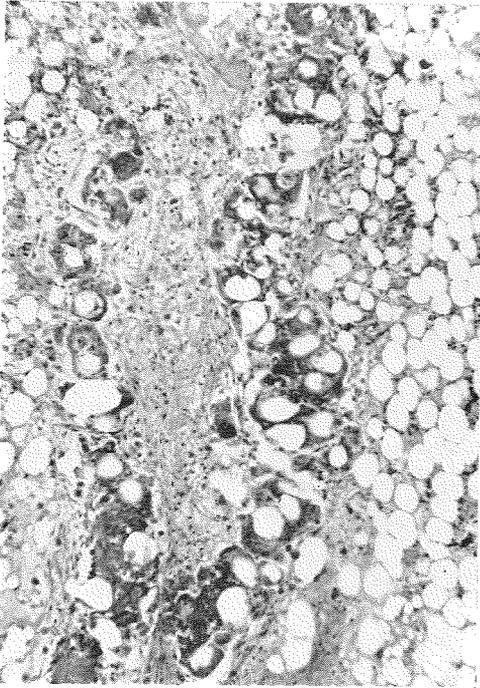


Fig. 7.—La osificación autóctona que tiene lugar, independientemente de las estructuras óseas preexistente, en el interior de la cavidad medular se organiza en torno a detritus celulares, entre los que son muy frecuentes los perfiles de células adiposas. Se puede apreciar claramente cómo las paredes celulares sirven de cimiento a la aposición directa del hueso. (15 días después de la administración de acetato de plomo).

osteogénica tiene lugar a nivel del endostio, constituyéndose extensas excrecencias endofíticas formadas por trabéculas ampliamente ramificadas que aparecen incluidas en un tejido conectivo fibrilar ricamente vascularizado.

En el resto de la cavidad medular se observa un cuadro sumamente variado: junto a una marcada disminución del tamaño de las áreas necróticas y una recuperación prácticamente total de extensas zonas de tejido hematopoyético, se encuentran parcelas en las que la médula es fibrosa, y, finalmente, campos en los que de modo autóctono, sin conexión

alguna con las paredes del hueso, se ha producido una viva osteogénesis. Estos focos de osificación se encuentran contiguos a masas de material necrótico, calcificado y fuertemente PAS positivo, o en la adventicia de los vasos nutricios. El material necrótico puede contener los perfiles de células adiposas sobre los que la aposición ósea se verifica directamente, con el resultado de formarse espículas de aspecto criboso.

4. Hallazgos a los 30 y 60 días.

Durante este tiempo, los cambios anteriormente descritos progresan de modo notable, configurándose definitivamente por una parte, la ocupación creciente del espacio medular por la fibrosis, los en-

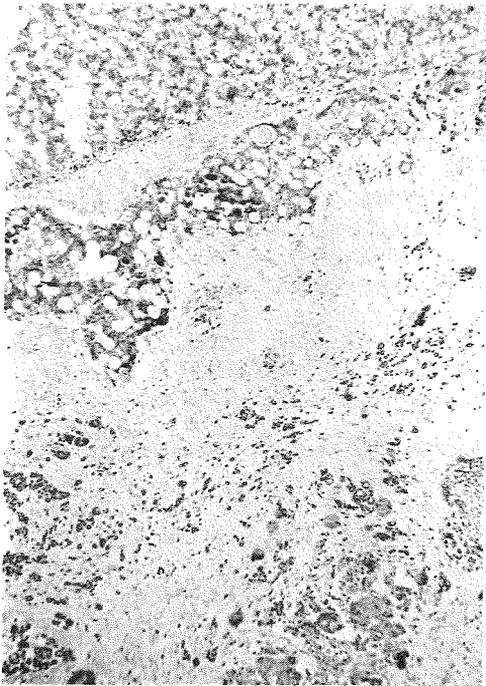


Fig. 8.—La persistencia de las alteraciones regresivas provocadas por la inyección de plomo es evidente a los 30 días. Es patente la presencia de gran número de macrófagos con pigmento plúmbico fagocitado, así como la intensa fibrosis.

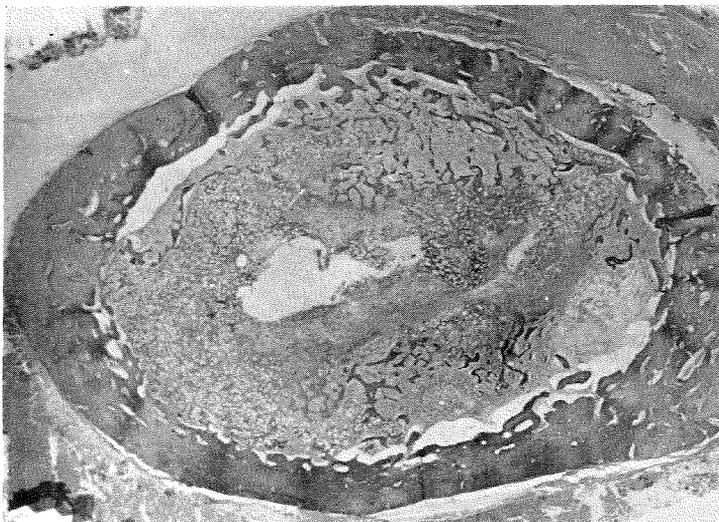


Fig. 9.—Vista panorámica de un corte transversal de la diáfisis. Se aprecia claramente la formación de hueso subperióstico (abajo y a la izquierda), la reconstrucción de la compacta, la abundante deposición de hueso endóstico, la fibrosis medular de amplios distritos y la presencia de médula ósea hematopoyética en zonas bastante amplias, sobre todo a la derecha. Esta imagen representa el promedio de las alteraciones observadas a los 50 días de la inyección de acetato de plomo. (50 días después de la administración de acetato de plomo).

dofitos de origen endóstico y, la formación autóctona de hueso en relación con el conectivo de la adventicia vascular. Por otro lado, el periostio, en medida mucho menor que el endostio, da origen a excrescencias endofíticas de distribución irregular que se remodelan en sentido haversiano. La reconstrucción de la compacta cortical en su porción interna es ya completa a los 30 días y sólo se distingue de lo normal en el carácter fibroso de la matriz ósea.

La novedad más sobresaliente que se manifiesta en esta fase es la aparición de un desdoblamiento de la zona de proliferación condroblástica, con interposición de una banda de osificación endocondral. Esta doble línea de crecimiento está irregularmente constituida, pero en general responde a la ordenación siguiente a partir de la diáfisis: una primera zona de trabéculas de la esponjosa primaria fuertemente engrosadas a causa de un proceso de aposición del tipo descrito en fases anteriores; una placa de cartílago metafisario, de grosor irregular; una nue-

va zona de osificación endocondral que origina trabéculas finas de orientación cambiante, que en algunos puntos queda inhibida en su maduración, estableciendo puentes de cartílago con la placa metafisaria primitiva. Finalmente se observa un cartílago metafisario de rasgos prácticamente normales que se continúa con la placa epifisaria y la epífisis.

En la cavidad medular prosiguen los procesos de osificación endóstica, la remoción de la sal de plomo que resulta en la aparición de extensos acúmulos de macrófagos de contenido refringente cristalino, y la ulterior evolución y crecimiento de las espículas de hueso neoformado en torno a los vasos y sobre las masas de médula ósea necrótica.

Los cambios son, lógicamente más acentuados a los 60 días que a los 30 de iniciado el experimento. La afectación asimétrica del cartílago metafisario da por resultado una angulación notable de la epífisis con respecto a la diáfisis.

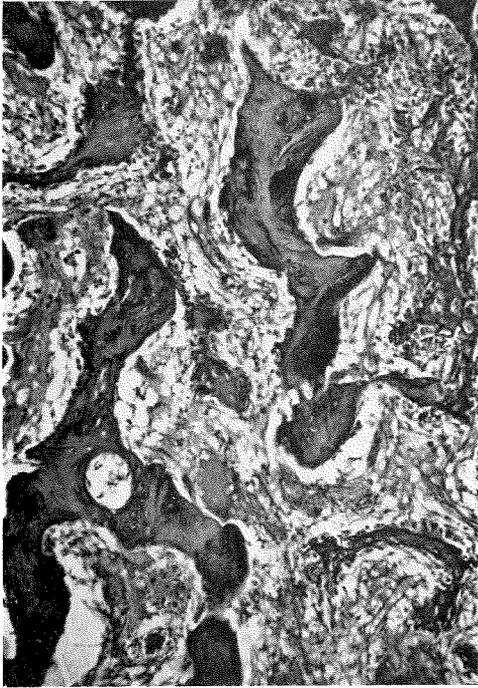


Fig. 10.—Imagen que ilustra la notable fibrosis de la médula y el diferente signo que a los 50 días toma la osificación de origen endóstico. Hay trabéculas neoformadas que ya han cesado en su crecimiento y que aparecen desprovistas de ribete osteoblástico. Junto a ellas, en otras se observan imágenes de activa proliferación osteoblástica, con osificación en pleno florecimiento.

Grupo II

Estos animales recibieron tres inyecciones intraóseas de acetato de plomo en el fémur derecho y fueron estudiados a los 30 y 60 días de iniciado el tratamiento.

En esencia los hallazgos son similares a los descritos en el grupo anterior, con la diferencia de que la necrosis afectó prácticamente a la mayor parte de la médula ósea y a la cortical diafisarias. En consecuencia, los fenómenos de reconstrucción eran comparativamente más extensos, lo cual se ponía de manifiesto de modo preferente en la masiva proliferación de hueso perióstico, que contrasta

con la pobreza que muestra la formación de endofitos de origen endóstico. La osteogénesis sobre los detritus celulares PAS positivos de la cavidad medular era también muy intensa y las modificaciones de la esponjosa primaria y de la zona metafisaria no se distinguían prácticamente de los animales del grupo anterior. Otro dato notable es la conversión fibrosa casi total, a los 60 días, de la médula ósea, en la que apenas se han conservado más que algunos pequeños focos de tejido hematopoyético.



Fig. 11.—Extremidad inferior del fémur derecho del conejo 18. La asimetría del efecto del acetato de plomo ha inhibido totalmente el crecimiento y la diferenciación de la placa metafisaria a la izquierda, en tanto que no ha influido prácticamente en el crecimiento del hueso a la derecha. Se observa de este modo un gradiente de detención del crecimiento que disminuye de izquierda a derecha, que resulta en una angulación anormal de la epífisis con respecto a la diáfisis. (50 días después de la administración de acetato de plomo).

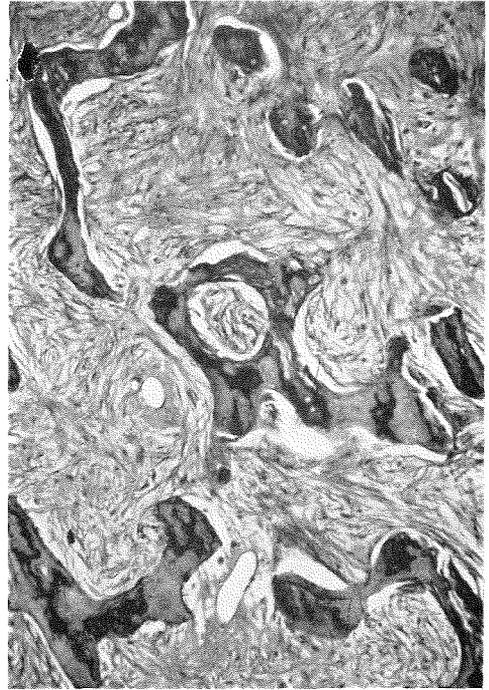
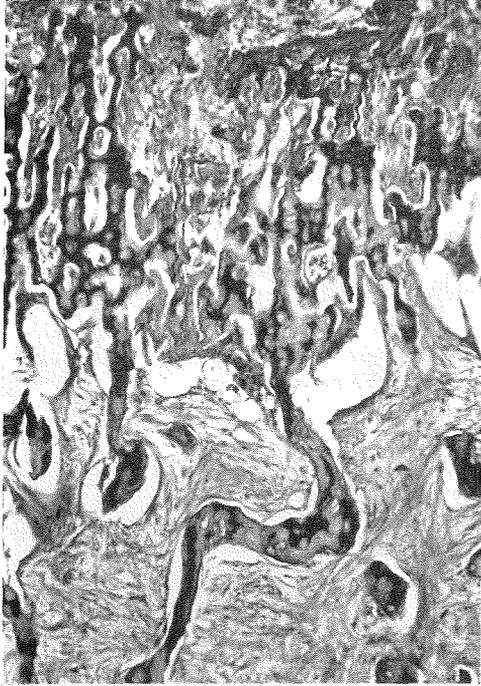


Fig. 12.—Fibrosis muy intensa en todos los espacios entre las trabéculas metafisarias. No existen signos de proliferación osteoblástica en esta zona en la que prácticamente se ha extinguido la actividad del cartilago de crecimiento. (50 días después de la administración de acetato de plomo).

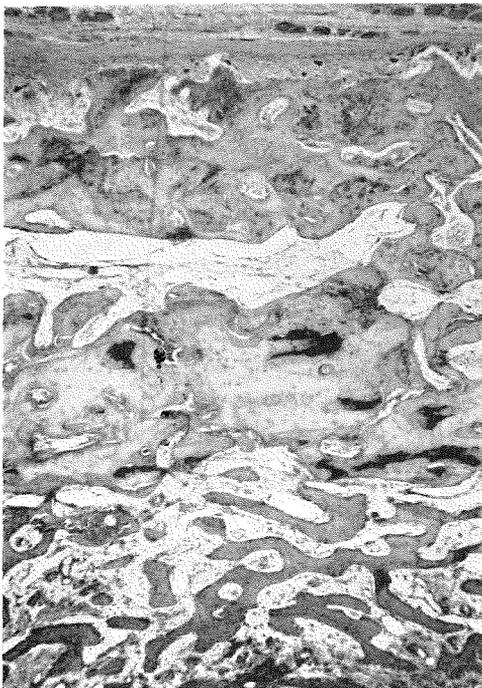


Fig. 13.—Región yuxtametafisaria de la cortical femoral. En esta microfotografía se muestra la variabilidad en el desarrollo de la neoformación ósea subperióstica y endóstica y los diferentes grados de reabsorción de la compacta primitiva que en algunos puntos ha dejado de existir. Los endofitos alcanzan aquí un desarrollo preponderante mientras que el hueso subperióstico posee un espesor menor en la región diafisaria media. (60 días después de la administración de acetato de plomo).

DISCUSIÓN

Los fenómenos histológicos observados tras la administración intraósea de acetato de plomo cursan según una secuencia claramente definida que comprende las siguientes fases:

1. Necrosis. Prácticamente todos los elementos constitutivos del hueso pueden quedar lesionados irreversiblemente por la acción necrosante del acetato de plomo: médula ósea diafisaria y epifisaria, placa de crecimiento metafisario, cortical, vasos, etc. Sin embargo, la distribución de la necrosis es parcelar, alternando áreas que han permanecido indemnes junto a otras en las que la necrosis total se hace patente más o menos pronto.

2. Muy precozmente se observa la yuxtaposición de fenómenos de remoción de los tejidos necróticos a signos histológicos de reacción proliferante de tejido óseo, en la cual participan todas las estructuras del hueso.

La cronología de estas alteraciones está según las observaciones precedentes, claramente definida y ofrece un grado elevado de reproductibilidad, por lo que puede constituir un modelo experimental para estudiar la reactividad de las estructuras óseas, tanto desde un punto de vista de la dinámica celular como de la respuesta del hueso como órgano.

1. *La necrosis.*

El efecto que domina el cuadro histológico en los días inmediatos a la administración intraósea del acetato de plomo es la necrosis. Los diferentes componentes celulares e intercelulares expresan este hecho de modo distinto. Donde alcanza su mayor extensión es en la médula ósea, donde sobre el fondo homogéneo de detritus celulares resultante de la necrosis de coagulación, tanto de los elementos hematopoyéticos como de las cé-

lulas adiposas y de la textura fibrilar, se superpone una calcificación focal ampliamente diseminada. Las sales de plomo, y concretamente el acetato, tienen un efecto calcificante directo¹⁰⁶, cuando se depositan en el seno de los tejidos. Lo cual ha sido explicado por Selye¹⁰⁵ postulando que los calcificadores directos atraen calcio a ciertas estructuras (particularmente las fibras conectivas y las células adiposas) de modo similar a como un mordiente es capaz de preparar un tejido para captar un colorante. Lo mismo ocurre en focos más o menos extensos que atrapan trabéculas de la esponjosa primaria, un espesor variable de la placa cartilaginosa epifisaria, la compacta diafisaria y la médula de las epífisis.

Merece un comentario detallado la morfología de los cambios de la cortical necrosada. En primer lugar, la calcificación. Es evidente que no se trata ni de adsorción de calcio sobre la zona de aposición osteoide de alto contenido en mucopolisacáridos ácidos ni de la mineralización del hueso maduro que, por el contrario fija sales de calcio con gran firmeza²³. Se trata de una incrustación plomo-calcárea de los espacios haversianos y de los conductos de Volkmann que se extiende hasta alcanzar las lagunas óseas e incluso a la substancia intercelular, particularmente a las fibras colágenas. Este fenómeno que también puede observarse en el hueso humano, especialmente después de los 70 años en que puede afectar hasta un 15 % de la cortical, ha sido denominado micropetrosis por Frost³¹. La fuerte basofilia de estas estructuras puede ser indicativa de la presencia de abundantes fosfatos en ellos²³.

La presencia de necrosis en el tejido óseo se fundamenta sobre el hallazgo de picnosis nuclear y autólisis de los osteocitos que da origen a lagunas vacías. La matriz ósea desvitalizada se distingue por

una acidofilia creciente en comparación con el hueso normal⁸². En el material procedente de los animales del grupo I A ninguno de estos rasgos era reconocible y no se hicieron patentes hasta días más tarde, en los animales del grupo I B.

Un hallazgo frecuente ha sido la presencia de hemorragias subendósticas que desprenden la membrana de su inserción normal en la cara interna del hueso diafisario. Ello es de fácil explicación: la porción de la cortical próximo al conducto medular, en la que predominan las necrosis, está muy abundantemente irrigada. La presencia de necrosis en los elementos vasculares de los conductos haversianos y de Volkmann es evidente desde el primer momento y la hemorragia, junto con la trombosis, son las consecuencias obligadas. En la patología experimental esta hemorragia endóstica es observada de modo constante tras la aplicación de calor⁹⁷, ultrasonidos^{58, 79}.

2. *La reabsorción del hueso necrótico.*

La reabsorción del hueso necrótico es muy diferente según se trate de una necrosis aséptica o infectada. En este último caso se produce una delimitación del hueso muerto que se convierte de este modo en un secuestro. En el caso de la necrosis ósea aséptica se ponen en juego diferentes mecanismos que van a conducir a la sustitución progresiva del hueso muerto por hueso neoformado o por tejido conjuntivo.

El primer signo de reabsorción que se observa es la cortical necrótica es el aumento de tamaño de las lagunas óseas que, ya en los animales inyectados seis días antes, aparecen desprovistas de osteocitos. Estas lagunas presentan dimensiones superiores al doble de las que exhiben ordinariamente osteocitos viables. Su borde suele ser ligeramente basófilo.

Por otra parte, la textura de la cortical aparece notablemente reducida a cau-

sa del ensanchamiento de los canales haversianos y de la aposición de vasos que desde la médula penetran a través de canales perforantes de Volkmann y ramificándose abundantemente crean un grado muy marcado de osteoporosis en la vertiente cortical que mira a la médula.

Finalmente, la actividad reabsortiva está representada por la presencia de numerosos osteoclastos que se localizan de modo preferente, por no decir exclusivo, en las superficies condrales libres, es decir, en la zona de contacto del periostio con las trabéculas más periféricas de la esponjosa primaria, el cual es un lugar, en condiciones normales y mientras el hueso crece, de exaltada actividad osteoclástica.

El análisis de esta actividad reabsortiva plantea la interesante cuestión referente a la relación osteocito-reabsorción de hueso, por un lado, y, por otro, la posibilidad de que el tejido conectivo de los espacios medulares participe en la remoción del hueso.

La idea, según la cual el osteocito es una célula comprometida en la doble función de depositar y remover tejido óseo, no es nueva, pero ha sido revalorizada recientemente gracias a los trabajos de Lipp⁷⁶, de Belanger y col.¹⁰.

La aparición de basofilia¹⁰¹ o la PAS positividad intensificada en los bordes de las lagunas óseas^{24, 54}, que han sido observados en los conejos de los Grupos I-B y I-C del presente trabajo, son considerados rasgos típicos de este tipo de reabsorción, para la que Belanger y col.⁹ propone la denominación de osteolisis. En favor de este postulado están el hecho de que los osteocitos comprometidos en la reabsorción de hueso presentan un elevado contenido en fosfatasa alcalina¹⁰⁰, aminopeptidasa⁷⁸ y otros fermentos proteolíticos. Por medio del microscopio electrónico, Belanger y col.¹⁰ han mostrado la presencia de vesículas osmiófi-

las, probablemente lisosomas, en el citoplasma de osteocitos alojados en lagunas notablemente ensanchadas y confluentes con las vecinas y cuya organización citoplásmica era muy diferente de la presentada por los osteocitos recientemente ingresados en el interior de los sistemas laminares, los cuales mostraban una gran similitud estructural con los osteoblastos (riqueza en retículo endoplásmico rugoso). Puede aquí señalarse de paso que Follis²⁹ sostenía la posibilidad de que los mismos osteoblastos podían, en determinadas fases de su actividad, reabsorber el hueso en lugar de ponerlo.

Contemplamos así confirmado, con argumentos histoquímicos y ultramicroscópicos, el concepto de oncosis que von Recklinghausen creó en 1910 para designar este tipo de reabsorción ósea y que ha sido revalorizado modernamente.

La cuestión relativa a la reabsorción por parte del tejido conjuntivo aparece mucho menos aclarada. En este caso no se trata de una reabsorción intersticial, la oncosis u osteolisis, sino de una demolición en superficie, similar a la atribuida a los osteoclastos. Ham⁴⁷ distingue tres tipos de superficies de las estructuras óseas, es decir, aquellas que no están en contacto con tejido óseo: las superficies sobre las cuales hay deposición de nuevo hueso, las que son asiento de reabsorción osteoclástica y las superficies en reposo, esto es, aquellas en las que no está en curso ni la aposición ni la remoción de hueso, y que aparecen revestidas por células aplanadas, sin la basofilia característica de los osteoblastos. Pues bien, algunos autores admiten que en estas superficies, en las que faltan osteoblastos y osteoclastos puede realizarse una reabsorción de hueso. El ejemplo más típico de la reabsorción reptante que se observa en el reemplazamiento de los trasplantes de hueso¹⁸. El establecimiento de una reabsorción por tejido conjuntivo sin osteoclastos ha sido señalada por

Starr¹¹⁰ como la causa del retardo en la consolidación de las fracturas e incluso de la formación de pseudoartrosis. Gorham^{41, 42, 44} han invocado, como resultado de los exámenes de material clínico y experimental, el papel decisivo que la proximidad de vasos hiperémicos (ya sea por estasis como por hemangiomas difusa) tiene sobre la reabsorción del hueso, sin el concurso de osteoclastos. Por otra parte, Fell y Mellanby²⁷ han podido comprobar en un estudio sobre cultivos *in vitro* enriquecidos en vitamina A cómo se produce una disolución notable de los huesos embrionarios sin la participación de osteoclastos.

El tercer aspecto de la reabsorción ósea al que hay que prestar atención es a la aparición de una cantidad anormalmente elevada de osteoclastos. Ya se indicó en la descripción de los hallazgos que su número estaba francamente crecido en la zona de las superficies condrales libres, en las que en condiciones normales suelen ser muy abundantes ya que, en el hueso en crecimiento, ésta es un área de intensa remodelación del hueso^{3, 64}. Eran también muy abundantes en las trabéculas metafisarias centrales y en menor número, están también presentes en la cara endóstica cortical. Con respecto a su evolución temporal, el máximo de la actividad osteoclástica se observó entre los días 6 y 15, siendo antes prácticamente inexistente y declinando después de modo claro, pues a los 30 días no se observó una osteoclastosis superior a lo normal.

Aunque existen muchos puntos pendientes de aclaración definitiva relativos al origen, función, destino y duración de la acción de los osteoclastos^{49, 63, 92}, una cuestión que debemos plantearnos se refiere a las causas de aumento del número de los osteoclastos. Hoy día se acepta de modo general que los osteoclastos no representan una estirpe fija y separada de células, sino que se diferencian a partir de elementos precursores a medida

que las circunstancias lo exigen⁴⁹, lo cual ha sido repetidamente demostrado por medio del marcaje con timidina trititada^{115, 124}. Cuales puedan ser estas células precursoras es un asunto sobre el que no se ha llegado a un acuerdo, habiéndose señalado que podrían ser los osteoblastos^{114, 115}, los osteocitos, células mesenquimales⁶², células de naturaleza indeterminada^{8, 57}. Young¹²⁵, como consecuencia de sus investigaciones creó el concepto de célula osteoprogenitora de la cual hace derivar todos los elementos esqueléticos, concediendo al osteoclasto una gran capacidad de renovación, en el sentido de crecer por incorporación de núcleos, a la vez que pueden simplificarse e incluso desaparecer por una postulada pérdida de núcleos. El acuerdo es más unánime sobre la cuestión de cuál es el modo de originarse este tipo celular, habiéndose desestimado que la mitosis o la amitosis constituyan el mecanismo de su formación y aceptándose que se forman por la fusión de células uninucleadas, e incluso que este proceso es reversible, de tal manera que un proceso de fusión puede originar individuos de menor tamaño^{5, 49}. Lipp⁷⁷ sostiene que para la reabsorción ósea no es necesario que exista ninguna transformación celular, pues el osteoblasto puede ser modulado para reabsorber hueso, convirtiéndose así en un osteoclasto mononucleado, para el cual propone la denominación de osteoliocito.

Hay un aspecto relativo a esta compleja cuestión de la génesis de los osteoclastos en la que ciertas observaciones del material presentado pueden permitir hacer algunas sugerencias. Se trata del hallazgo de células multinucleadas en contacto con hueso, con morfología evidentemente osteoclástica en cuyo citoplasma existe un pigmento que responde positivamente a la reacción del rodizonato sódico y que participan por ello en los rasgos característicos de los osteoclastos y de las células macrofágicas multinucleadas del ti-

po de cuerpo extraño. Se puede pensar que sean, simplemente, osteoclastos que al reabsorber las zonas de hueso que están revestidas por un ribete de precipitado cristalino que contiene plomo, han acumulado este material en su citoplasma y después de perforar esta capa continuarán su acción demoledora sobre el hueso. O bien, que se trata de células macrofágicas ordinarias que tanto pueden fagocitar un material extraño como reabsorber hueso. No hay que olvidar que, entre las teorías que quieren explicar el origen del osteoclasto, se cuenta la que postula una ascendencia histiocitaria, lo cual fue ya propuesto por Pommer⁸⁶ y Lacoste⁷¹. Hancox^{48, 49} considera que esta es, por muchas razones, una hipótesis muy razonable.

Sean las células precursoras, de cualquiera de los tipos señalados, o de varios de ellos a la vez, el hecho es que los osteoclastos han aumentado en número. El estímulo para esta producción exaltada de osteoblastos puede ser explicada, en los animales examinados, por un doble camino: que se haya producido una estimulación directa de las células precursoras o que el efecto se haya producido en el hueso mismo, el cual responde emitiendo estímulos que provocan la aparición de los osteoclastos. Hoy día se admite que la primera posibilidad es muy poco verosímil, pues se ha acumulado una gran masa de pruebas que tienden a demostrar que si no existe una alteración de las sales de calcio o en la matriz no colagénica del hueso no se promueve la producción de osteoclastos. Hoy sabemos que el plomo se deposita en el hueso, substituyéndose al calcio como fosfato plúmbico insoluble, quizá incorporando en la estructura cristalina del apatito², de la cual es removido junto con el calcio. Tanto el depósito como la movilización se verifican a nivel del hueso trabecular⁶¹ y los factores que regulan la deposición y movilización del calcio en

el hueso, actúan sobre el plomo en el mismo sentido¹³.

Es posiblemente esta alteración de la constitución mineral de hueso, en la que el plomo reemplaza al calcio, el factor que provoca la aparición de la osteoclasia. Rutishauser, Brocard y Bianchi, determinaron que en cobayo se manifestaba una osteoclasia a nivel del maxilar inferior ya francamente desarrollada a las 7 horas de administrar una inyección de cloruro de plomo, aunque no pudieron afirmar que se tratase de un efecto directo sobre el hueso o a través de una mediación por medio de una activación de las paratiroides.

Como es bien sabido, la hormona paratiroidea es el regulador fisiológico de la actividad osteoclástica, tal como lo demuestra la enfermedad ósea de von Recklinghausen, en la cual el factor causal es una adenoma paratiroideo, o la inyección experimental de extractos paratiroides⁵³. En los animales de nuestra experiencia se demostró una franca hiperplasia paratiroidea en los grupos sacrificados a los 15 y 30 días. Sin embargo, en ese momento, el número de osteoclastos no estaba significativamente elevado tanto en los huesos inyectados como en los no inyectados. Esta coincidencia un tanto inesperada podría explicarse tentativamente del siguiente modo: podría postularse que el calcio que la hormona paratiroidea moviliza no fuese el del esqueleto exclusivamente sino, e incluso preferentemente, el que pudiera removerse de los depósitos calcáreos presentes en las áreas de necrosis. Realmente es un hecho un tanto insólito que se produzca una desaparición tan rápida como la que hemos observado del calcio depositado en los focos necróticos del hueso, ya que estamos acostumbrados a pensar que los focos de calcificación tienden a persistir de modo indefinido. La actividad macrofágica que se observa difusamente en la médula ósea, pero que

se manifiesta muy intensamente en la reabsorción del plomo, podría haber sido el instrumento encargado de reabsorber el calcio junto con el plomo y contribuir así a restablecer la normalidad metabólica. Recuérdese que el origen macrofágico —histiocitario de los osteoclastos es uno de sus posibles orígenes— y podría suponer que los macrófagos fueran, en estas condiciones, susceptibles de ser activados por la parathormona. En caso de ser aceptable esta hipótesis, podría postularse igualmente que la calcificación masiva de la médula necrótica observada en los primeros 6 días estaría acompañada de una activación osteoclástica, ya que la avidez por el calcio de los focos de necrosis provocaría una transmineralización, en el sentido de un desplazamiento de las sales de calcio del esqueleto a los tejidos necrosados. Una vez que éstos estuvieran saturados, ya no movilizarían más calcio del esqueleto, sino de los focos de calcificación distrófica que constituiría probablemente una forma más fácilmente asequible de calcio para la neoformación de hueso y para compensar la probable hiperfosfatenia causada por el daño renal.

Al tratar de los cambios vasculares, haremos referencia a la posibilidad de que ellos hayan intervenido en la génesis de la reabsorción osteoclástica.

3. *Alteraciones a nivel de la placa epifisaria.*

En este apartado se prestará atención solamente a aquellos rasgos específicos del aparato de crecimiento longitudinal del hueso, ya que todo lo relativo a la aparición del hueso neoformado se trata en la sección de osteogénesis.

Las alteraciones de la placa epifisaria comprenden en primer lugar una necrosis focal con incrustación plomo-calcárea, que es seguida de un proceso de remoción. Pero lo más importante es el trastorno de la maduración que implica una

inhibición de crecimiento longitudinal del hueso de carácter transitorio, que se detecta desde el comienzo de la experiencia hasta un momento comprendido entre los 15 y los 30 días. En este momento se observa la aparición de una doble línea de crecimiento: la una, que representa los restos más o menos preservados de la que existía en el momento de la inyección de acetato de plomo; la otra que es el resultado del crecimiento y maduración de la zona basal del cartílago epifisario, dotada de valor morfogenético y que asume desde el momento de su formación el papel de disco epifisario eficaz. A causa de la intensidad irregular con que se ha afectado esta estructura, es también irregular la capacidad de hacer crecer al hueso en longitud, circunstancia que se demuestra con gran precisión en el conejo 18.

¿Cuál es la interpretación que puede darse de este fenómeno? Es esta una cuestión importante, pues gran parte de las imprecisiones existentes en torno a la naturaleza de la osteopatía metálica procede de considerar unilateralmente que sea similar a uno de dos modelos típicos de la patología ósea: al raquitismo o a la osteodistrofia fibrosa cuando, en realidad, como ocurre en nuestros animales, las dos pueden combinarse.

Eger y Laup²² al revisar la patología del raquitismo inducido por el estroncio, analizaron a fondo la cuestión. La revisión de la bibliografía les mostró, limitando la discusión al plomo, que éste ha sido alineado entre los metales inductores de una alteración raquitoide por algunos¹⁰⁴, mientras que otros⁹³ lo consideran como un típico productor de osteitis fibrosa generaliza, cosa que posteriormente han sostenido Selye, Gabiani y Tuchweber¹⁰⁶ y Starcich, Chizzola y Rastelli¹¹¹.

En la clínica humana predomina la alteración raquítica en los niños^{31, 19}, y es típico observar en ellos, una vez que

ha cesado la exposición al plomo, que se reanuda el crecimiento y en tal momento aparece una "línea de plomo" de densidad aumentada en la radiografía. Este hecho, que ha sido comprobado histológicamente por Follis³¹ y Bennet¹¹, se ha reproducido en nuestros animales de los grupos: I 4, I 5, II 1 y II 2. Y han sido observados también por Hass, Brown, Eisenstein y Hemmens⁵⁰ en conejos intoxicados crónicamente con acetato de plomo por vía oral.

Sissons¹⁰⁷, ha revisado la morfología y función de la placa epifisaria, al tratar de las alteraciones patológicas de esta importante estructura constituida por elementos tan complejos, que han de integrarse de modo muy ajustado para que el crecimiento en longitud del hueso se realice normalmente.

Ante los múltiples factores que pueden perturbar el desarrollo del cartílago de crecimiento, es difícil señalar patrones de reacción característicos. En el caso de nuestros animales creemos que se trata de una inhibición transitoria del crecimiento y la diferenciación que se recupera más o menos perfectamente y que se debe a la destrucción de numerosos elementos de todas las capas de la estructura que necesitan un plazo de tiempo para recuperarse, dejando como secuela una banda de cartílago inhábil para recuperar su capacidad de crecimiento y diferenciación que persiste en forma de una "línea de crecimiento".

En consecuencia, la alteración observada no es estrictamente raquítica, en la que lo esencial es el impedimento de la osificación endocondral con una aceptable preservación de la proliferación condral¹¹³, ni tampoco puede inscribirse en el círculo de las alteraciones líticas del aparato de crecimiento de tipo de las inducidas por la inyección de papaína²⁵ y de aquellos mecanismos que traen consigo una fuerte activación de los lisosomas como son la misma papaína, la vitamí-

na A y la cortisona^{28, 108}. Las semejanzas más próximas son las observadas, por un lado, en las situaciones de deficiencia nutritiva general³⁰ o al estado resultante de una alineación defectuosa de la epifisiolisis infantil o de una intervención experimental o quirúrgica en la que se interpone un fragmento de hueso en el borde metafisario, con lo cual resulta un cierre prematuro parcial y excéntrico de la placa epifisaria, que al continuar su crecimiento en la parte no cerrada resulta en una deformidad angular progresiva de la epífisis^{17, 59}.

4. Neoformación de hueso.

Ha sido este uno de los aspectos más expresivos desde el punto de vista morfológico en la reacción del hueso o la inyección de plomo. Los primeros signos de neoformación ósea se observan a los 6 días de practicada la inyección y prosigue vigorosamente durante todo el tiempo de las observaciones realizadas. Todas las estructuras del hueso contribuyen a esta osteogénesis reactiva: el tallo diafisario, en el que, tras la reabsorción de las zonas necrosadas que se traduce en forma de una osteoporosis, configura nuevos sistemas haversianos, el periostio, que da origen a pequeñas excrescencias exofíticas o a una capa continua subperióstica de gran espesor; el endostio construye abundantes endofitos que, en algunos casos, obturan amplios campos de la cavidad medular; sobre las trabéculas de la esponjosa primaria se depositan espículas, en ocasiones muy abundantes; finalmente, en plena cavidad medular e independientemente de las estructuras óseas preexistentes, se forma hueso en torno a los residuos de necrosis de la médula ósea y a la adventicia arterial.

Los puntos que se plantean en la interpretación de estos hallazgos son de variada naturaleza. En relación con la neoformación de hueso que se puede atribuir a los elementos normalmente esqueletóge-

nos (hueso diafisario, endo y periostio, hueso esponjoso metafisario) se trata fundamentalmente de determinar cuál pueda ser el estímulo para la iniciación de esta osteogénesis. En el caso de la osificación independiente de estructuras osteoformadoras, había que dilucidar, por una parte, qué estímulo la pone en marcha y, por otra, qué células adquieren la capacidad de formar hueso.

En los últimos años se ha tratado de profundizar experimentalmente en la naturaleza y condicionamiento del proceso de la osteogénesis. En general, se puede afirmar que la osteogénesis es el resultado de la actividad del osteoblasto, el cual es una célula que ha sido modulada para la síntesis de la matriz ósea^{6, 126}. Pero es necesario determinar cuáles son las respuestas a muchas preguntas sobre cuál es el origen de estas células, ya que si admitimos su origen mesenquimal, hay que discernir si todos los elementos del mesénquima son capaces de formar hueso o sólo algunas poseen un potencial esquelotógeno y cuáles son los factores ambientales que pueden poner en acto ese potencial y pueden frenarlo una vez activado, y en qué consiste justamente ese potencial osteogénico.

Este conjunto de problemas se replantea siempre que vemos constituirse hueso, ya sea en condiciones normales y patológicas. La morfología de la osificación nos es hoy bien conocida, tanto a nivel de la microscopía convencional^{47, 82, 90}, como de la microscopía electrónica^{16, 65, 66 y 68} y de la histoquímica^{12, 87, 89} y, sin embargo, no está claro de ningún modo cuáles son los factores que determinan que en un momento dado el mecanismo bioquímico de la célula se coordina para la formación de esta compleja muestra de sustancia fundamental y fibras que puede mineralizarse. Se conoce la influencia de factores tales como la tensión de oxígeno, las tensiones o presiones, potenciales eléctricos, etc., que son capaces de estimular

a las células con la información genética necesaria, activando selectivamente a los genes implicados. Esta interacción de factores genéticos con los microambientales ha sido revisada en sendos artículos por Young¹²⁷ y Voogd van der Straaten¹²⁴.

De las observaciones que hemos realizado en este trabajo, los puntos que merecen una mayor atención son los siguientes:

1. Qué factores han determinado la reactivación osteoformadora a los niveles donde ésta ocurre normalmente.
2. Qué origen puede atribuirse a las células osteoformadoras que manifiestan su actividad específica en niveles donde normalmente no existen.

1. Son muchos los agentes que pueden activar a elementos quiescentes o inducir a elementos potenciales con el resultado común de la neoformación del hueso. Pritchard⁸⁸ señaló que los estímulos operantes en condiciones normales, dentro y fuera del período de crecimiento del hueso, pueden ser de índole mecánica, nutricional, hormonal y circulatoria. Por otra parte, cualquier estímulo patológico, de índole traumática, o metabólica puede despertar la actividad de las células del blastema osteogénico que hasta ese momento no habían sido estimuladas. La necrosis del hueso ha sido considerada como uno de los más activos provocadores de la osteogénesis cuando es de tipo aséptico. En lugar de formar un secuestro es reforzada por aposición de hueso endóstico y perióstico y reemplazada lentamente por hueso vivo. Esto no se realiza a través de una reabsorción fibrosa u osteoclástica de modo exclusivo como han afirmado Rouiller y Majno⁹⁷, sino que en el proceso colabora igualmente un reemplazamiento intersticial parcial que sobre porciones todavía necróticas es capaz de aponer hueso nuevo, como hemos visto en algunas ocasiones que

ocurría en nuestros animales, cosas también comprobadas por Urist y Johnson¹²¹. Es más: se considera que el proceso normal de remodelamiento de la cortical, con reabsorción y reconstrucción de sistemas haversianos tiene como estímulo creencial la muerte de los osteocitos^{33, 52}. El hecho de que normalmente se atribuye la muerte celular a la deficiencia en la nutrición y ésta, en el hueso, está íntimamente ligada a un buen aporte sanguíneo, ha traído consigo la introducción de factores circulatorios como determinantes tanto de la reabsorción como de la deposición del hueso.

Rutishauser ha revisado la importancia del componente vascular en el desarrollo de la patología del hueso. Especialmente aquellas circunstancias en las que se desarrolla un éstasis crónico condicionan el desarrollo de la aposición ósea con tal de que la situación no sea tan extrema que se produzca la necrosis total del hueso. La secuencia de fenómenos, con disminución de la hemopoyesis, proliferación reticular que ahoga a sinusoides y células adiposas, activación osteoblástica sobre el hueso sano y formación de espiculas óseas en conexión con las trabéculas esponjosas preexistentes, son las consecuencias que la trombosis vascular por la inyección de trombina. Estos cambios son paralelos a los descritos por Stodtmeister y Sandkuhler¹¹² como consecutivos a la mielitis serosa que termina en el cuadro de la osteomielosclerosis, idea de la que también participa Rohr.

En fin de cuentas, sean las consecuencias de la necrosis, sea ya directamente causada por el plomo o secundaria a los trastornos circulatorios, está claro que junto a la reabsorción se produce una marcada aposición ósea en todos los niveles donde previamente existan células con capacidad osteoformadora.

2. Uno de los hallazgos más interesantes que hemos hallado es el relativo a la neoformación de hueso sobre los depósi-

tos necróticos presentes en el interior de la médula ósea, lo cual sugiere de entrada un proceso de inducción sobre células competentes que son moduladas a formas de hueso.

No es nuevo el fenómeno, pues se ha descrito con reiteración que el trasplante de médula ósea a lugares distintos de su emplazamiento normal, conduce a la formación de hueso^{20, 32, 72}. El orden de las células que se diferencian a osteoblastos no parece definitivamente aclarado, pues es difícil obtener la seguridad de que los fragmentos medulares transplantados carezcan de osteoblastos del hueso del que han sido tomados. Por otra parte, la población celular medular tan heterogénea, pues comprende células hemopoyéticas, reticulares y elementos del endostio, se ha considerado por algunos como una mezcla de líneas celulares capaces de transformaciones mutuas dentro de ciertos límites^{15, 61}. Hasta ahora no se ha decidido de modo claro la cuestión, ya que es difícil elegir entre las posibles alternativas de un efecto inductor del tejido vecino sobre células medulares diferenciadas, de un desenmascaramiento de la propensión inherente de la médula para formar hueso o del desarrollo por el propio tejido medular transplantado de un sistema autoinductor que conduce a la diferenciación osteoblástica^{39, 46, 75, 120, 122}. Burwell¹⁵, piensa que ciertas sustancias liberadas por la necrosis de la médula ósea y del propio hueso tendrían un efecto osteogénico.

Las imágenes observadas por nosotros, en las que repetidamente se iniciaba la formación de hueso en contacto con material fuertemente PAS positivo que rodeaba e impregnaba los detritus celulares, merece una breve consideración.

Este material estaba fuertemente impregnado de calcio, por lo que, en cierto modo, imitaba la composición del cartílago calcificado, que posee una marcada tendencia a ser substituido por tejido

óseo⁷³, como ocurre en los cartílagos traqueales de los individuos de edad avanzada, y en otras circunstancias⁵⁶.

Eger²³ y Knese⁶⁸, afirman que, el proceso de mineralización del hueso se realiza por la absorción de calcio sobre un osteocito ligeramente PAS positivo, con gran contenido de mucopolisacáridos ácidos y que revela una unión laxa de calcio con el sustrato, mientras que en fase más avanzada la sustancia fundamental es fuertemente PAS positiva (abundantes mucopolisacáridos neutros) y ha fijado muy fuertemente el calcio. Es concebible, pues, que todas aquellas estructuras que contengan una cierta riqueza en mucopolisacáridos que por sí mismos funcionan como excelentes captadores de calcio, puedan actuar como inductores de la formación de hueso cuando entran en contacto con células de hecho o potencialmente osteogénicas.

El hueso neoformado es preferentemente de tipo plexiforme y sólo en las grandes formaciones periósticas, el hueso plexiforme inicial aparece contiguo a hueso más reciente de tipo laminar formando el revestimiento interno de los conductos haversianos que están configurándose y que transforman la arquitectura espicular radial inicial en una neocortical osteónica. Knese y V. Harnack⁶⁷ han demostrado electromicroscópicamente la identidad de constitución de uno y otro tipo, con la diferencia de la distinta abundancia de osteocitos jóvenes, poliédricos, muy semejantes a los osteoblastos que son más numerosos en el hueso plexiforme que en el laminar. Por otra parte, Schwarz y Pahlke¹⁰³ han observado cambios en la periodicidad de las fibras colágenas en el hueso a medida que madura.

5. *Alteraciones vasculares.*

Como se ha señalado en cada uno de los grupos de animales, las alteraciones vasculares eran un hallazgo constante.

Todos los vasos aparecen más o menos afectados en los lugares donde ha ocurrido la necrosis. Necrosis parietal con calcificación y trombosis de la arteria nutricia, gran ectasia de los sinusoides, calcificación de la pared de los mismos, hemorragias de los vasos diafisarios que desprenden el endostio de su inserción en mayor o menor longitud, etc.

Estos hechos plantean la cuestión relativa a su significación en la génesis de los cambios, tanto regresivos como progresivos, que se desarrollan en el hueso tras la inyección intraósea de acetato de plomo.

En primer lugar, hay que afirmar que aunque los fenómenos de destrucción vascular son muy extensos, no alcanzan totalmente al hueso. Debe recordarse que a un hueso largo llegan arterias independientes: epifisarias, metafisarias, periósticas y la arteria nutricia principal. Por ello, el hecho repetidamente comprobado de la anulación de la arteria nutricia puede ser compensada de modo más o menos adecuado por el aporte sanguíneo a través de las otras.

Dejando aparte ciertas cuestiones de menor significación, cual pueden ser las consecuencias morfológicas de la insuficiencia vascular arterial que trae consigo una necrosis y la reacción osteoformadora reactiva a la necrosis —asunto ya estudiado anteriormente— vamos a prestar atención aquí a la significación que los trastornos circulatorios poseen como moduladores de la reactividad constructiva o destructiva del hueso.

La importancia de la vascularización ha sido realizada en grados diferentes. Trueta¹⁷, ha establecido una teoría que coloca al endotelio en el punto central de la histogénesis ósea, con lo cual a su significación de mecanismo auxiliar del metabolismo se añade la de ser el material plástico para la morfogénesis. Por otra parte, Leriche y Policard⁷⁴, Gorham y

Stout⁴³, Gorham y West⁴⁴, han propuesto del régimen más o menos vivo de la circulación del hueso o la presencia de vascularización anormalmente desarrollada son factores determinantes de la actividad formadora o destructora de hueso. De acuerdo con este principio, y dejando aparte otros factores de importancia causal, se puede afirmar que la reabsorción de hueso va acompañada por hipermia mientras que la neoformación de hueso se asocia a una disminución de la circulación local⁹⁸.

Teniendo en cuenta que en el material del presente trabajo la neoformación de hueso predominó en los animales del grupo I a nivel del endostio, en tanto que en los del grupo II prevaleció la neoformación de hueso perióstico, podemos preguntarnos si este modo de ver las cosas puede ser aceptado. No cabe duda que en el caso de los animales del grupo I a pesar de la extensión de las lesiones necróticas, los daños tisulares causados por una sola inyección en cada uno de los fémures han tenido menor extensión que en el caso de los animales del grupo II en que se aplicaron tres inyecciones sucesivas en el mismo hueso. Por tanto, se puede suponer que en estos últimos la circulación diafisaria estuviera mucho más perjudicada, con lo que no sería congruente la conclusión de que aquí la endofitosis ósea tenía una justificación. Tampoco se encuentra una justificación a la proliferación ósea de origen perióstico en los animales del grupo II. Pero es más: los estudios sobre la microcirculación de los huesos han revelado que la cortical diafisaria se nutre fundamentalmente a partir de los vasos medulares, al menos en su mitad interna, que constituyen un sistema de aporte muy desarrollado y activo^{14, 95, 80}. Como la necrosis de los osteocitos es considerada como una lesión que puede ser causada por la isquemia⁷⁰, habría que suponer que precisamente los vasos que desde la médula nutren la cortical diafi-

saria interna habrían de favorecer la aposición ósea en lugar de haber determinado la aparición de una osteoporosis muy intensa.

Un factor que debe ser tenido en cuenta es la extraordinaria rapidez con que se produce la proliferación capilar y el remodelamiento del árbol vascular dentro de la médula ósea, el cual es capaz de rescatar amplios distritos de territorios de necrosis, y que, desde un punto de vista patológico general, tiene la categoría de un tejido de granulación, el cual es determinado a una diferenciación osteogénica o conectiva en dependencia de factores que serán estudiados más adelante.

Desde el punto de vista clínico y experimental, se ha prestado una atención preferente al estudio de la necrosis isquémica de las epífisis, dado su frecuente incidencia en la clínica humana. El aparato de crecimiento longitudinal del hueso es una estructura dual en lo relativo a su aporte vascular^{51, 119, 126}. Según los vasos que sean destruidos a causa de un traumatismo o una intervención quirúrgica o experimental, se producirá una inhibición de la proliferación del cartilago (si se interrumpe la circulación procedente de la epífisis) o cesa momentáneamente la osificación endocondral (si los vasos metafisarios son inutilizados), que es recuperada rápidamente a causa de la revascularización procedente del espacio medular. Ya se analizó el carácter mixto (inhibición tanto de la proliferación como de la osificación) por lo que habría que postular una doble perturbación circulatorio, circunstancia para la que no faltan datos de apoyo.

En conjunto, el papel de los trastornos de la circulación en la génesis de los fenómenos observados no puede deslindarse con claridad de los efectos directos necrosantes del acetato de plomo. Con toda seguridad ambos contribuyen al resultado final de modo directo e indirecto,

pero no es posible discernir la responsabilidad de cada uno en el proceso.

6. *El destino del plomo inyectado.*

El destino del rodizonato sódico ha permitido seguir la distribución y evolución del plomo detectable histoquímicamente. Esta técnica, empleada según el proceder señalado por Lillie⁷⁶ y perfeccionada por Pearse⁸¹, tras la decalcificación con ácido sulfúrico-sulfato sódico es específica para el plomo.

Tras una primera fase en que encontramos el material rodizonato positivo libre, disperso, fundamentalmente en las áreas de necrosis y adherido a la superficie endóstica y a las paredes óseas de los conductos de Volkmann y de Havers, se inicia una progresiva captación del mismo por elementos histiocitarios que pueden, en parte, fundirse para constituir células gigantes. Es interesante la evolución morfológica que experimenta el material fagocitado, que de una forma inicial difusa o finamente granular, se transforma en masas cada vez mayores que pierden color a la vez que ganan en refringencia y carácter cristalino. Este cuadro morfológico se puede observar en su expresión máxima en los macrófagos y células gigantes de los granulomas subcutáneos en los animales del grupo III.

Las características histoquímicas de estas células captadoras de plomo son igualmente interesantes. La reacción con el PAS es en principio débilmente positiva y se va haciendo más fuerte (grupos I 3 y I 4) para debilitarse notablemente a los 50 días (grupo I 5) en que el material fagocitado adquiere un carácter cristalino.

La historia natural y las características histoquímicas de los complejos pigmentarios que forman los metales pesados al ser captados por las células histiocitarias ha sido estudiado especialmente por Gedigk³⁷ y Pioch, y Gössner⁴⁵. En esen-

cia, tras captación de las partículas metálicas —ya sea porque el metal se administra en forma coloidal, ya porque secundariamente se forman soluciones coloidales, como es probablemente el caso del plomo que tienden a circular en el organismo en suspensión coloidal de fosfato de plomo bi o trivalente²— se forman en la célula fagocitante, mucopolisacáridos, proteínas y una pequeña cantidad de lípido. Entre la partícula fagocitada y esta sustancia activamente formada por la célula se establece una estrecha relación, por lo que está justificado la denominación de sustancia portadora de los componentes metálicos. Los componentes metálicos cristalinos son envueltos por otra sustancia portadora, con lo que quedan encapsulados con respecto al resto del citoplasma. Es interesante que de los trabajos de Gedick³⁶ se desprende que la sustancia portadora puede tener afinidad para diferentes metales, de tal modo que tras la extracción de uno de ellos, *in vitro*, puede volver a ser cargada con otro distinto. Esto se verifica de modo particular entre el plomo y el hierro.

El hecho de que la parte más importante cualitativamente y cuantitativamente de la sustancia portadora sea su componente mucopolisacárido, plantea la cuestión de que si la afinidad para las superficies internas del hueso (endostio y paredes de los conductos haversianos y de Volkmann, líneas de cemento) se basa igualmente en el revestimiento mucopolisacárido que existe a ese nivel⁶⁸. La incrustación por calcio y hierro de las fibras elásticas es un fenómeno frecuentemente observado en patología⁵⁵ y se basa precisamente en la riqueza de mucopolisacáridos que las membranas elásticas poseen.

Vemos, pues, que los hallazgos sobre la distribución del plomo siguen los mismos patrones que otros compuestos inorgánicos que inciden más frecuentemente en Patología.

7. Consideraciones finales.

Examinados, en los apartados precedentes, la significación de los hallazgos morfológicos aisladamente, debemos en estos momentos inquirir sobre el conjunto de la reacción que sucede en el hueso tras la administración en el espacio medular de acetato de plomo. Desde los trabajos de Petersen⁸⁵, se distinguen diferentes órdenes de estructura funcional al considerar la estructura del hueso, de los cuales el primero se refiere a la forma total de cada hueso, considerado como un órgano. Hemos visto cómo nuestro método provoca una reacción en la que participan todas las estructuras del hueso, por lo que cabe plantearse la cuestión de si representa de algún modo la respuesta del hueso a un estímulo anormal. No cabe duda que la textura, la peculiaridad de la composición de un órgano, su estructura biotécnica⁷³, constituye un principio rector de un comportamiento peculiar tanto en condiciones normales como en su respuesta ante estímulos patológicos, pues no sólo la función total de un órgano es algo más que la suma de las actividades de cada una de sus partes, sino que la estructura del órgano puede ser un principio iluminador de importancia fundamental tanto para el rendimiento funcional como para el desarrollo de la enfermedad.

La patología general del hueso podría quedar definida por la desviación anormal del proceso ortológico de continua transformación de su estructura gracias a los procesos de aposición y demolición de sus diferentes ingredientes. No hay ningún componente del hueso que no se vea sometido en condiciones normales a este proceso de renovación continua con un ritmo más o menos vivo. Esta idea que ya pertenecía a la Histología clásica se ha podido visualizar de un modo tangible gracias a las técnicas más modernamente introducidas de estudios con isótopos radiactivos¹, marcaje con tetraci-

clina³⁵, microrradiografía²⁶, histoquímica¹⁰⁹ y microscopía electrónica²¹. Hoy sabemos que este proceso de renovación constante implica a las moléculas minerales, al substrato orgánico de la sustancia intercelular, a las células, a los sistemas laminares de la compacta, a las trabéculas de la esponjosa, a los sinusoides y capilares, a los linfáticos y a los nervios.

Al lado de esto, hemos de tener en cuenta que tales operaciones son atributo de células que tienen un origen común y que forman una familia, constituyendo una unidad estructural y funcional, a la que puede denominarse familia de células óseas¹²⁴ o blastema osteogénico⁸⁸. La utilización selectiva de porciones integradas de potencial genético total es realizada al compás de la especialización celular, dentro del organismo o dentro de una familia celular, con lo que resultan tipos celulares divergentes durante la embriogénesis que se mantienen dentro de límites circunscritos en el organismo adulto. Las células de la familia ósea constituyen un ejemplo excelente de este asunto, ya que son capaces de cambiar su especialización como respuesta a una gran variedad de alteraciones que ocurren en su microambiente¹²⁸.

Cualquier estímulo anormal que incida sobre el microambiente del hueso, ya sea durante el período embrionario, en la fase de crecimiento o en la edad adulta, tenderá a expresarse como:

- a) Una alteración del balance general aposición--reabsorción.
- b) Un trastorno cualitativo de algunos de estos dos procesos.
- c) Una perturbación del mecanismo de las interrelaciones entre los miembros de la familia de las células del hueso, o
- d) Una combinación cualquiera de diferentes elementos de a), b) o c).

No es difícil, aunque sería sumamente laborioso, revisar los componentes de la

patología de cada una de las enfermedades del hueso, desde las malformaciones hasta las alteraciones seniles, de las inflamaciones a los tumores, desde los trastornos metabólicos endocrinos o nutricionales al proceso de curación de las fracturas, para comprender que esto es así, pues, a nivel del hueso, se realiza más evidentemente que en cualquier otra estructura orgánica que su ser es precisamente un continuo cambiar. Este se basa precisamente en el hecho de que el precio que el hueso ha de pagar por la mineralización de su matriz es el de desarrollar un sistema canalicular para la nutrición permanente de sus células servida por una dotación capilar abundante. Este aparato vascular-calicular, del cual depende la vida de los osteocitos constituye en el mejor de los casos, un sistema endeble que está, en condiciones normales, muy cerca del límite de sus posibilidades. Podría pensarse que el remodelamiento del hueso no está condicionado solamente por el crecimiento⁶⁰, por el efecto de las hormonas de crecimiento, la paratiroides, la tiroxina o esteroides corticales³³, los cambios del flujo sanguíneo¹²³ o por el balance esquelético de remoción aposición mediado por los cambios del flujo vascular¹¹⁶ sino que en último término es un proceso intrínsecamente ligado al plan estructural del hueso que ha de renovar constantemente su sustancia, a causa precisamente de su labilidad nutritiva. Constantemente el hueso está muriendo y constantemente se rehace.

¿Qué significación tienen, en relación con lo que antecede, los hallazgos del presente trabajo? A nuestro juicio, constituye un modelo experimental de gran valor instructivo para el estudio de la reactividad del hueso, de todas las estructuras integrantes del hueso, ante un insulto. Nos ilustra sobre la morfología y curso de la necrosis en los diferentes distritos del hueso, la remoción de las partes necróticas, el trastorno inhibitor

del crecimiento longitudinal a nivel de la placa epifisaria y su recuperación ulterior, la reacción del periostio y del endostio con la producción de hueso neoformado tanto de tipo plexiforme como laminar, la aparición de una osteoporosis reactiva a nivel de la compacta con la subsiguiente reconstrucción de nuevos osteonas, la solidaridad del complejo médula ósea-hueso con la aparición de extensos campos de fibrosis medular con gran potencial osteógeno y, finalmente, el reclutamiento de nuevas células osteogénicas entre los elementos medulares,

resultante de una osificación parcelar autóctona de la médula ósea.

Todos estos elementos constituyen en cierto modo, un inventario de los distintos componentes de la reactividad del tejido óseo. Su valor como modelo experimental había de ser determinado en el futuro. Su valor educativo, como experimento para mostrar al estudiante de modo tangible las modalidades de la reacción del hueso, lo que constituye la anatomía patológica general del hueso, nos parece superior a otros propuestos^{83 y 102}.

SUMMARY

Experimental Pathology of Bone: Intra Osseous Injection of Lead Acetate as an Experimental Model

The injection of lead acetate (175 mg/Kg animal weight) in the medullary cavity of femoral diaphysis of young rabbits has been studied morphologically. Such procedure brings about a very reproducible sequence of changes. At a first stage, necrosis of bone marrow, metaphyseal plate, cortical bone and endosteum, with deposition of calcium and lead in the necrotic areas, are observed. As early as the sixth day, the first signs of bone reaction make its appearance, including osteoclastic, oncotic and connective reabsorption of necro-

tic bone and removal of calcium and lead precipitates. In later stages, fibroblastic proliferation and ubiquitous ossification are observed, particularly in the periosteal and endosteal surfaces, but also in the medullary cavity around strongly PAS-positive rests of necrotic marrow. Partial inhibition of growth of the metaphyseal plate was also present. The significance of these findings is discussed as well as the potential value of this procedure as an experimental model.

BIBLIOGRAFÍA

1. ARMSTRONG, W. D. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 60: 670, 1955.
2. AUB, J. C., L. T. FIARHALL, A. S. MINOT y P. REZNIKOFF. *Medicine*, 4: 1, 1925.
3. BÄHLING, G. *Morphol. Jb.*, 99: 109, 1958.
4. BARGMANN, W. *Histología y anatomía microscópica*. Pág. 97. Ed. Labor. Barcelona, 1961.
5. BARNICOT, N. A. *Proceed. Roy Soc.* (Ser. B: Biol. Sc.), 134: 467, 1947.
6. BASSET, C. A. En *Bone Biodynamics*. Ed. por H. M. Frost. Churchill. Londres, 1964.
7. BELANGER, L. F. y B. B. MIGICOVSKY. *J. Histochem. Cytochem.*, 11: 734, 1963.
8. BELANGER, L. F. y B. B. MIGICOVSKY. *Anat. Rec.*, 139: 207, 1961.
9. BELANGER, L. F., B. B. MIGICOVSKY, D. H. COPP y J. VINCENT. *Mechanisms of Hard Tissue Destruction*. Editado por R. F. SOGNAES, Amer. Ass. Advanc. Sc. Washington, 1963.
10. BELANGER, L. F., T. SEMBA, S. TOLNAL, H. D. COPP, L. KROOR y C. GRIES. *The two Faces of Resorption. Calcified Tissues* 1965. Editado por H. Fleisch. Black-

- wood y M. Owen. Springer, Berlin 1966.
11. BENNETT, G. A. *Bones, en Pathology*, 5.^a ed. Pág. 1.294. Mosby, St. Louis, 1966.
 12. BEVELANDER, G. y P. L. JONHSON. *Anat. Rec.*, 108: 1, 1950.
 13. BLACK, S. C. *Arch. Environ. Health.*, 5: 423, 1962.
 14. BROOKES, M. y R. G. HARRISON. *J. Anat.*, 91: 61, 1957.
 15. BURWELL, R. J. *Bone Jt. Surg.*, 46B: 110, 1964.
 16. CAMERON, D. A., H. A. PASCHALL y R. A. ROBINSON. En *Bone Biodynamics*, ed. por H. M. Frost, Churchill, Londres 1964.
 17. CAMPBELL, C. J., A. GRISOBA y G. ZANCONATO. *J. Bone Jt. Surg.*, 41A: 1.221, 1959.
 18. COPENHAVER, W. M. *Bailey's Textbook of Histology*, 15.^a ed. Williams and Wilkins, 1964.
 19. CHISOLM, J. J., Jr. *J. Pediat.*, 60: 1, 1962.
 20. DENIS, A. *Acta chir. belg.*, 56, suppl. 3, 1957.
 21. DUDLEY, H. R. y D. SPIRO. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11: 627, 1961.
 22. EGER, W. y H. LAUP. *Beitr. path. Anat.*, 113: 337, 1953.
 23. EGER, W. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 47: 54, 1963.
 24. ENGEL, M. B. A. M. A. *Arch. Path.*, 53: 339, 1952.
 25. ENGFELDT, B., A. HULTH y O. WESTERBORN. *Arch. Path.*, 68: 600, 1959.
 26. ENGSTROM, A. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 47: 16, 1963.
 27. FELL, H. B. y E. MELLANBY. *J. Physiol.*, 116: 320, 1952.
 28. FELL, H. B. En *Bone Dynamics*. Ed. por H. M. Frost, Churchill, Londres, 1964.
 29. FOLLIS, R. H. *Cartilage and Matrix: chemical structure, formation and destruction, en Metabolic interrelations with special reference to Calcium*. *Transactions of 4th Conference*. Editada por E. C. Reifenstein y S. L. Wells, Josiach. Macy Foundation. New York, 1952.
 30. FOLLIS, R. H. *Deficiency Disease*. Thomas, Springfield, 1958.
 31. FOLLIS, R. H. Jr., D. JACKSON, M. M. ELIOT y E. A. PARK. *Am. J. Dis. Child.*, 66: 1, 1943.
 32. FRIEDENSTEIN, A. J., I. I. PIATLTZKY-SHAPIRO y K. V. PETRAKOVA. *J. Embrio! exp. Morph.*, 16: 381, 1966.
 33. FROST, H. M. En *Bone Biocynamics*. Ed. por H. M. Frost, Churchill, Londres, 1964.
 34. FROST, H. M. *J. Bone Jt. Surg.*, 42A: 144, 1960.
 35. FROST, M. H., A. R. VILLANUEVA, H. ROTH y S. STANISAVLJEVIC. *J. New Drugs*, 1: 206, 1962.
 36. GEDICK, P. *Ergeb. allg. Path. phat. Anat.*, 38: 1, 1958.
 37. GEDICK, P. *Verh. dtsh. Ges. Path.*, 39: 205, 1955.
 38. GEDICK, P. y W. PIOCH. *Beitr. path. Anat.*, 116: 124, 1956.
 39. GOLDHABER, P. *Science*, 133: 2065, 1961.
 40. GORDON, H. y H. H. SWEET, Jr. *Amer. J. Path.*, 12: 545, 1936.
 41. GORHAM, L. W. *Arch. Intern. Med.*, 105: 199, 1960.
 42. GORHAM, L. W., A. W. WRIGHT; H. N. SHULTZ y F. C. MAXON Jr. *Am. J. Med.*, 17: 674, 1954.
 43. GORHAM, L. W. y A. P. STOUT. *J. Bone St. Surg.*, 37A: 985, 1955.
 44. GORHAM, L. W. y W. T. WEST. *Arch. Path.*, 78: 673, 1964.
 45. GOSSNER, W. *Virchow's Arch. path. Anat.*, 323: 685, 1953.
 46. GROEBSTEIN, C. *Adv. Cancer Res.* 4: 187; 1956.
 47. HAM, A. W. *Histology*, 5.^a ed. Lippincott, Philadelphia, 1965.
 48. HANCOX, N. M. *Biol. Rev.*, 24: 448, 1949.
 49. HANCOX, N. En *The Biochemistry and Physiology of bone*. Pág. 213. Editado por G. H. Bonone Academic Press. New York, 1956.
 50. HASS, G. M., V. L. EISENSTEIN, D. BROWN y A. HERMMENS. *Amer. J. Path.*, 45: 691, 1964.
 51. HASTINGS, D. E. y I. MCNAB. *Canad. J. Surg.*, 8/1: 68, 1965.
 52. HATTNER, R., B. EFKER y H. FROST. *Nature*, 206: 489, 1965.
 53. HELLER, M., F. C. MCLEAN y W. BLOOM. *Am. J. Anat.*, 87: 315, 1950.
 54. HELLER-STEINBERG, M. *Amer. J. Anat.*, 89: 347, 1951.
 55. HERRANZ, G. y E. CRTIZ DE LANDAZURI. *Rev. Med. Univ. Navarra*, 3: 207, 1959.
 56. HERRANZ, G., F. HERNANDEZ y M. ASIRON. *Rev. Med. Univ. Navarra*, 4: 79, 1960.
 57. HUNT, A. M. y K. J. PAINTER. *J. Dent Research*, 40: 652, 1961.
 58. JANES, J. M., P. J. KELLY, J. F. HERRICK y L. F. A. PATERSON. *J. Boone Jt. Surg.*, 44: 1299, 1962.
 59. JOHNSON, J. T. H. y W. O. SOUTHWICK. *J. Bone Jt. Sing.*, 42A: 1381, 1960.
 60. KAVANAV, J. L. *Science*, 134: 1627, 1961.
 61. KEHOE, R. A., J. CHOLAK, D. M. HUBBARD, K. BAMBACH y R. R. MCNARY. *J. Industr. Hyg. Toxicol.*, 25: 71, 1943.
 62. KEMBER, N. F. *J. Bone Jt. Surg.*, 43B: 824, 1960.
 63. KIND, H. *Beitr. path. Anat.*, 111: 283, 1951.
 64. KNESE, K. A. *Z. Zellforsch.*, 47: 80, 1957.

65. KNESE, K. H. *Dtsch. med. Wschr.*, 84: 1640 y 1649, 1959.
66. KNESE, K. H. y A. M. KNOOP. *Z. Zellforsch.*, 54: 1, 1961.
67. KNESE, K. H. y M. V. HARNACK. *Z. Zellforsch.*, 57: 520, 1962.
68. KNESE, K. H. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 47: 35, 1963.
69. KNESE, K. H. *First Europ. Bone and tooth Symposium*. Oxford, 16-20 April 1963.
70. KORNBLUM, S. S. y P. J. KELLY. *J. Bone Jt. Surg.*, 46: 797, 1964.
71. LACOSTE, A. *Comp. rend. Soc. Biol.*, 88: 435, 1923.
72. LACROIX, P. En *The Cell*. Pág. 255. Edit. por J. Brachet y A. E. Mirsky, vol. 5. Academic Press. New York, 1961.
73. LETTERER, E. *Allgemeine Pathologie*. Thieme. Stuttgart, 1959.
74. LERICHE, R. y A. POLICARD. *Les problèmes de la Physiologie normales et pathologique de l'os*. Masson. Paris, 1926.
75. LEVANDER, G. *Nature*, 155: 148, 1945.
76. LILLIE, R. D. *Histopathological Technic and Practical Histochemistry*. Blakiston. New York, 1954.
77. LIPP, W. *Acta anat.*, 22: 151, 1954.
78. LIPP, W. *J. Histochem. Cytochem.*, 7: 205, 1959.
79. MAJNO, G. *Strahlenther.*, 81: 33, 1950.
80. DE MARNEFFE, R. *Acta Chir. Belg.*, 50: 469, 1951.
81. MAXIMOV, A. En v. Möllendorff, *Handbuch der mikroskopische Anatomie des Menschen*. Tomo II. Springer. Berlin, 1927.
82. MCLEAN, F. C. y M. R. URIST. Bone. En *Introduction to the Physiology of skeletal Tissue*. 2.^a ed. The University of Chicago Press. Chicago, 1961.
83. MEESEN, H. *Experimentelle Histopathologie. Ein eintührungskurs*. Thieme. Stuttgart, 1952.
84. PEARSE, A. G. E. *Histochemistry, Theoretical and Applied*. 2.^a ed. Churchill. Londres, 1951.
85. PETERSEN, H. En v. Möllendorff, *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Tomo II, 2.^a parte. Springer. Berlin, 1930.
86. POMMER, G. *Arch. mikrosk. Anat.*, 102: 324, 1924.
87. PLISS, G. *Verh. dts. Ges. Path.*, 47: 142, 1963.
88. PRITCHARD, J. J. *J. Bone Jt. Surg.*, 46: 569, 1964.
89. PRITCHARD, J. J. *J. Anat.*, 86: 259, 1952.
90. PRITCHARD, J. J. En *The Biochemistry and Physiology of Bone*. Ed. por G. H. Bourne. Academic Press. New York, 1956.
91. PUTCHLER, H., F. SWEET y N. O. DOSS. *Amer. J. Clin. Path.*, 40: 334, 1963.
92. PUTSCHARD, W. G. J. En *Handbuch der allgemeine Pathologie*. Tomo 3/II. Editado por F. Büchner, E. Letterer, y F. Roulet. Springer. Berlin, 1960.
93. QUELOZ. *Helv. med. Acta*, 5: 347, 1938.
94. RECKLINGHAUSEN, F. von. *Ueber Rachitis und Osteomalacie*. Fischer. Jena, 1910.
95. RHINELANDER, F. W. y R. A. BARAGRY. *J. Bone Jt. Surg.*, 44A: 1273, 1962.
96. ROHR, K. *Anatomía, fisiología y patología de la médula ósea*. P. Janés. Barcelona (s. f.).
97. ROUILLER, C. y G. MAJNO. *Beitr. path. Anat.*, 113: 100, 1953.
98. RUTISHAUER, E. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 47: 54, 1963.
99. RUTISHAUER, E., R. BROCARD y M. BIANCHI. *Presse Medicale*, 43: 789, 1935.
100. RUTISHAUER L. y G. MAJNO. *Bull. Hosp. Joint Dis.*, 12: 468, 1951.
101. RUTH, E. B. *Anat. Rec.*, 118: 347, 1954.
102. SCHLUMBERGER, H. G. *Lab. Invest.*, 8: 1011, 1959.
103. SCHWARZ, W. y G. PAHLKE. *Z. Zellforsch.*, 38: 475, 1953.
104. SELLMAN, T. *A Manual of Pharmacology*. 7.^a edición. Saunders. Philadelphia, 1948.
105. SELYE, H. *Calciphilaxis*. The University of Chicago Press. Chicago, 1962.
106. SELYE, H., G. GABBANI y B. TUCHWEEER. *Acta Haematol.*, 29: 51, 1963.
107. SISSONS, H. A. *The Growth of Bone, en The Biochemistry and Physiology of Bone*. Ed. por G. H. Bourne. Academic Press. New York, 1956.
108. SLEDGE, C. B. *Lysosomes and Cartilage resorption in organ culture, en Calcified Tissues*, 1965, edit. Por H. Fleisch, H. J. Blackwood y M. Owen. Springer, Berlin, 1966.
109. SOGNAES, R. F. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 60: 545, 1955.
110. STARR. *Delayed union in Fractures of the long Bone*. Mosby. St. Louis, 1947.
111. STARCICH, R., A. CHIZZOLA y G. RASTELLI. *Riv. Anat. Pat. Oncol.*, 24, 1963.
112. STODTMEISTER, S. y S. SANDKÜHLER. *Dtsch. med. Wschr.*, 76: 1431, 1951.
113. STOREY E. *The J. of bone and joint surgery.*, 47: 145, 1965.
114. TONNA, E. A. *Anat. Rec.*, 137: 251, 1960.
115. TONNA, E. A. y E. P. CRONKITE. *Nature.*, 190: 459, 1961.
116. TRUETA, J. *Gordon conference on Physiology and Structure of bone and teeth, Meriden*. New Hampshire, 1960.
117. TRUETA, J. *The vascular role in calcification and osteogenesis*. En *Radioisotopes and Bone*. Edit. por F. C. McLean

- P. Lacroix y A. M. Budy. Blackwell. Oxford, 1962.
118. TRUETA, J. *Acta Orthop. Scand.*, 32: 190, 1962.
119. TRUETA, J. y V. P. AMATO. *J. Bone Jt. Surg.*, 42B: 571, 1960.
120. URIST, M. R. *Clin Orthop.*, 1: 207, 1953.
121. URIST, M. R. y JOHNSON, R. W. *J. Bone Jt. Surg.*, 25: 375, 1943.
122. URIST, M. R. y F. C. MCLEAN. *J. Bone Jt. Surg.*, 34A: 443, 1952.
123. VANDERHOFFT, P. J., P. J. KELLEY y L. F. A. PETERSON. *Lab. Invest.*, 11: 714, 1962.
124. VOOGD VAN DER STRAATEN, W. A. d. *Calcified Tissue*, pág. 10, 1965.
125. YOUNG, R. W. *J. Cell Biol.*, 14: 357, 1962.
126. YOUNG, M. H. *J. Pat. Bact.*, 85: 483, 1963.
127. YOUNG, R. W. *Clin. Orthop.*, 26: 147, 1963.
128. YOUNG, R. W. En *Bone Biodynamics*. Ed. por H. M. Frost. Churchill. Londres 1964.