

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Departamento de Cirugía



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado 040F Cirugía y sus Especialidades

## **EFFECTOS DE LA HORMONA PARATIROIDEA**

### **PTH (1-84) EN LA**

## **CONSOLIDACIÓN DE LAS FRACTURAS**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

José Enrique Aroca Navarro

DIRIGIDA POR:

Prof. Dr. Francisco Gomar Sancho

Dr. José Luis Peris Serra

Valencia 2015



**FRANCISCO GOMAR SANCHO**, Catedrático de Traumatología y Cirugía ortopédica del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina i Odontologia de la Universitat de València.

**CERTIFICA:**

Que el trabajo presentado por D. José Enrique Aroca Navarro, titulado “Efectos de la Hormona Paratiroidea PTH (1-84) en la consolidación de las fracturas”, ha sido realizado bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa para poder optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Valencia a cinco de octubre de 2015.





**JOSÉ LUIS PERIS SERRA**, Doctor en Ciencias Biológicas de la Línea de Proyectos Singulares del Instituto de Biomecánica de Valencia.

**CERTIFICA:**

Que el trabajo presentado por D. José Enrique Aroca Navarro, titulado “Efectos de la Hormona Paratiroidea PTH (1-84) en la consolidación de las fracturas”, ha sido realizado bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa para poder optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Valencia a cinco de octubre de 2015.





*A Marta,*

*A nuestros hijos José Enrique y Luis,*

*A mis padres Enrique y Rosa.*





## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi más sincera y profunda gratitud a todas las personas que de una u otra forma me han ayudado en la realización de esta tesis.

En primer lugar al Prof. Dr. Francisco Gomar Sancho por su estímulo y asesoramiento, por proporcionarme los medios necesarios para el desarrollo de esta tesis, y sobre todo por su paciencia conmigo.

Al Dr. José Luis Peris Serra, por su inestimable ayuda en la parte biomecánica, por la minuciosidad y rigor con que ha revisado el trabajo, y por la elegancia con que transmite sus comentarios.

Al que fue mi jefe durante tantos años, el Dr. Carlos Pérez Lahuerta por sus enseñanzas médicas y por su amistad.

Por supuesto a Chimo y Amor del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina por su apoyo en el trabajo de campo.

A Víctor del instituto de Biomecánica de Valencia por su ayuda en el estudio bioestadístico.

A los trabajadores de la granja experimental de la Facultad de Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia por su ayuda en el cuidado de los animales.

Y por último a Mercedes Ochando por ayudarme con toda la parte burocrática.



# ÍNDICE

**RESUMEN** ..... 1

**INTRODUCCIÓN** ..... 11

***1.- Hormona paratiroidea (PTH)*** ..... 16

1.1.- Estructura ..... 16

1.2.- Perspectiva histórica ..... 17

1.3.- Mecanismo de acción ..... 18

1.4.- Efectos en densidad mineral ósea y en reducción de fracturas ..... 30

1.5.- Indicaciones, contraindicaciones y monitorización ..... 44

***2.- Consolidación de las fracturas*** ..... 56

2.1.- Fisiología de la consolidación de las fracturas ..... 56

2.2.- Efectos de la osteoporosis en la consolidación de las fracturas ..... 58

***3.- Efecto de la PTH en la consolidación de las fracturas*** ..... 62

3.1.- Estudios clínicos ..... 62

3.2.- Estudios experimentales ..... 65

**HIPÓTESIS DE TRABAJO** ..... 95

**OBJETIVOS** ..... 99

**MATERIAL Y MÉTODOS** ..... 101

**1.- Animal de experimentación:** ..... 101

1.1.- Manipulación animal ..... 101

1.2.- Animal de experimentación ..... 101

**2.- Técnica quirúrgica** ..... 103

**3.- Características del fijador externo** ..... 108

**4.- Métodos de medición** ..... 109

4.1.- Estudios de imagen mediante TAC ..... 109

4.2.- Estudios biomecánicos ..... 110

4.3.- Estudios densitométricos ..... 126

4.4.- Tratamiento estadístico ..... 131

**RESULTADOS** ..... 133

**1.- Muestras** ..... 133

**2.- Estudio mediante TAC** ..... 136

**3.- Ensayos biomecánicos** ..... 148

3.1.- Ensayos de flexión a 4 puntos ..... 148

3.2.- Ensayos de torsión ..... 154

**4.- Ensayos densitométricos** ..... 161

4.1.- Estudio densitométrico del callo completo ..... 161

4.2.- Estudio densitométrico de la zona de la fractura ..... 169

**DISCUSIÓN** ..... 185

**CONCLUSIONES** ..... 221

**ESTUDIOS FUTUROS** ..... 223

**BIBLIOGRAFÍA** ..... 225

**ANEXOS** ..... 247

**1.- Índice de tablas** ..... 247

**2.- Índice de figuras** ..... 251

**3.-Índice de ecuaciones** ..... 255



# RESUMEN

## 1.- INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es una enfermedad sistémica crónica y progresiva que se caracteriza por una densidad ósea baja y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que reduce la resistencia a las fuerzas de carga, con un incremento de la fragilidad ósea y de la susceptibilidad de experimentar una fractura ante mínimos traumatismos<sup>1</sup>. Por lo tanto, las fracturas por fragilidad son la consecuencia clínica de la osteoporosis.

La incidencia de este tipo de fracturas es muy alta y con el envejecimiento de la población continúa aumentando<sup>2</sup>. Las fracturas de cadera son las más importantes por sus consecuencias en cuanto a mortalidad (20-30% en el primer año)<sup>3</sup> y morbilidad (sólo el 50% recuperan su estatus previo)<sup>4</sup>. Las fracturas vertebrales son las más numerosas aunque a veces su diagnóstico clínico es difícil. Estas fracturas suponen un importante factor de riesgo para la aparición de nuevas fracturas osteoporóticas<sup>5</sup>. Las fracturas distales de radio, aunque no siempre se asocian a osteoporosis, sí que son las que primero se producen en este grupo poblacional y pueden servirnos de alerta para estudiar y prevenir nuevas fracturas osteoporóticas<sup>6</sup>.

Actualmente existen dos grandes grupos de fármacos que se están utilizando para el tratamiento de la osteoporosis y para la prevención de fracturas osteoporóticas. El primero de ellos lo forman los fármacos antirresortivos o anticatabólicos cuyo principal mecanismo de acción es la disminución del recambio óseo consiguiendo así aumentar la densidad mineral

ósea (DMO). Dentro de este grupo tenemos la calcitonina, la terapia hormonal sustitutiva, el raloxifeno, los bifosfonatos y el denosumab. El otro grupo de fármacos corresponde a los anabólicos o formadores de hueso que actúan sobre los osteoblastos y corresponden a los análogos de la hormona paratiroidea PTH<sup>7</sup>.

Todos ellos han demostrado, en mayor o menor medida, ser efectivos para prevenir la aparición de fracturas osteoporóticas. Los más utilizados son los bifosfonatos al ser estos los que mayor efectividad poseen en la prevención de fracturas vertebrales, de cadera y periféricas<sup>8,9</sup>. Los bifosfonatos son compuestos químicos cuyo principal efecto es la inhibición de la resorción ósea<sup>10</sup>. Recientemente se ha publicado la aparición de fracturas por fragilidad, con patrones atípicos, en pacientes sometidos a tratamientos prolongados con bifosfonatos. Aunque la etiología de estas fracturas no está clara, se recomienda reevaluar la necesidad de continuar el tratamiento con bifosfonatos en pacientes tratados más de cinco años<sup>11,12</sup>. El denosumab es un anticuerpo monoclonal que actúa uniéndose a un ligando llamado RANKL e impidiendo que éste se una al RANK (su receptor), lo que produce una inhibición de la formación de los osteoclastos y de su funcionalidad, inhibiendo así la resorción ósea

El reciente desarrollo de agentes formadores de hueso ha supuesto una nueva opción para la prevención de fracturas osteoporóticas. La administración intermitente de la hormona paratiroidea de cadena completa PTH 1-84, así como de su fracción PTH 1-34 (teriparatide), reducen el riesgo de fracturas



vertebrales y no vertebrales en mujeres osteoporóticas postmenopáusicas y mejora la densidad mineral ósea.

La mayoría de las fracturas consolidan mediante el llamado proceso de consolidación secundaria que consta de cinco fases. La primera es el impacto y formación del **hematoma** y es la fase en la que se produce la fractura y se libera gran cantidad de factores quimiotácticos, mitogénicos e inductores de la diferenciación celular. En la segunda fase de **inflamación**, el hueso se necrosa y aparecen las células inflamatorias. En la tercera fase se forma el **callo blando o inmaduro**. En la cuarta fase el callo se **osifica** y en la última fase o de **remodelación**, el callo duro se remodela recuperando la forma original del hueso. Además el proceso de consolidación varía según la zona del callo<sup>13-15</sup>.

Experimentalmente se ha observado que los sujetos osteoporóticos tienen una capacidad de consolidación disminuida por retraso en la formación del callo y menor formación de hueso maduro disminuyendo las propiedades mecánicas del callo de fractura<sup>16</sup>. En pacientes ancianos, las fracturas consolidan con mayor dificultad y esto está causado por varios factores como la dificultad para conseguir una sólida estabilidad inicial de las fracturas por la pobre calidad del hueso, la alteración de la angiogénesis en estos pacientes que afecta a las fases iniciales de la consolidación, con una disminución de los factores de crecimiento, de la actividad de los osteoblastos y de las células madres mesenquimales debido a la edad<sup>17</sup>.

La hormona paratiroidea (PTH) aumenta la remodelación ósea con un efecto neto positivo sobre la masa ósea, incrementando el número de osteoblastos y su actividad, principalmente en los lugares de remodelación. Los

experimentos con animales, aunque son heterogéneos, lo que es normal teniendo en cuenta los diferentes modelos animales, secuencia de la hormona utilizada, dosis y modelos de fractura usados, han demostrado un efecto sorprendente de la PTH en la consolidación tanto del hueso cortical como esponjoso. Esta respuesta es más importante en fracturas que en huesos no traumatizados. Por lo tanto, se ha especulado que la PTH debería ser capaz de acelerar la curación de fracturas en los seres humanos, a pesar del hecho que sus efectos sobre la masa ósea en el tratamiento de la osteoporosis aparecen lentamente. Sin embargo, las grandes dosis de PTH utilizadas en animales de experimentación han puesto en duda su relevancia clínica<sup>18</sup>.

## **2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Debido al envejecimiento de la población, el número de pacientes osteoporóticos es cada vez mayor, y, por tanto, se observa un aumento en la incidencia de fracturas osteoporóticas y de las complicaciones derivadas de la alteración de la consolidación en este tipo de pacientes.

Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo es que si la Hormona Paratiroidea es un fármaco anabolizante formador de hueso, la utilización de esta hormona durante la reparación de una fractura ósea podría acelerar el proceso de consolidación ósea.

### **3.- OBJETIVOS**

Los objetivos de nuestro trabajo son reproducir un modelo experimental de fractura tibial en ovejas osteoporóticas, estudiar el proceso de consolidación ósea en este modelo mediante estudios de densitometría y biomecánicos, y valorar el efecto de la Hormona Paratiroidea en la consolidación de estas fracturas comparándolo frente a un grupo control.

### **4.- MATERIAL Y MÉTODOS**

El estudio se ha realizado en 13 ovejas maduras osteoporóticas. A los animales se les realizó una ovariectomía bilateral, y posteriormente fueron alimentadas con una dieta pobre en calcio y vitamina D durante 6 meses<sup>19,20</sup>.

El modelo de fractura se ha conseguido realizando una osteotomía diafisaria en el tercio medio de la tibia de la pata posterior derecha y se ha estabilizado mediante un fijador externo unilateral (Sistema DynaFix, Biomet) con 4 tornillos de 6 mm de diámetro.

Los animales se han distribuido en 2 grupos, el grupo PTH en el que se ha incluido 6 ovejas a las que se les ha administrado PTH (1-84) a dosis de 100 µg/día vía subcutánea, desde el día después de la intervención quirúrgica hasta el día del sacrificio a las 8 semanas, y el grupo control, formado por 7 ovejas que no ha recibido medicación.

Las ovejas se han sacrificado a las 8 semanas de la osteotomía y se han tomado imágenes mediante TAC para realizar un estudio morfológico y densitométrico del callo.

Los estudios biomecánicos han consistido en ensayos no destructivos de flexión a cuatro puntos, de los que se obtienen las gráficas del perfil polar de rigidez, a partir de las cuales se determina el índice de rigidez, el índice de áreas y el índice de planitud; y ensayos destructivos de torsión con los que se calcula la rigidez torsional, el par torsor máximo y la tenacidad.

Los estudios densitométricos, realizados a partir de las imágenes de TAC, han consistido en estudios de la totalidad del callo calculando el volumen total y su densidad, y en el análisis de la zona de fractura dividiendo el rango total de densidades óseas en cuatro niveles: isodensidad 1 (de 226 a 876 HU), isodensidad 2 (de 877 a 1527 HU), isodensidad 3 (de 1528 a 2178 HU) e isodensidad 4 (de 2179 HU hasta la densidad máxima de la muestra). En cada isodensidad se ha calculado el volumen y la densidad media.

Se ha realizado un estudio estadístico de los resultados con el objetivo de encontrar diferencias estadísticamente significativas debidas al tratamiento para los parámetros utilizados en el presente estudio respecto al grupo control.

## **5.- RESULTADOS**

Al preparar las muestras para los estudios biomecánicos se comprobó que algunas muestras no se podían utilizar, por lo que finalmente se incluyó en el diseño experimental definitivo 6 ovejas en el grupo control y 6 en el grupo

PTH para los estudios densitométricos, y 4 ovejas en el grupo control y 4 en el grupo PTH para los estudios mecánicos.

Al realizar el estudio morfológico de los cortes de TAC se ha observado que las tibias del grupo PTH han formado callos similares al grupo control, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

En los ensayos mecánicos de flexión a cuatro puntos se ha obtenido las gráficas del perfil polar de rigidez de los huesos osteotomizados, encontrándose valores de rigidez menores en los huesos del grupo control y observándose además un cambio en el patrón de distribución de los valores de rigidez en los diferentes planos. Al analizar sólo los huesos no operados se ha obtenido valores similares en el grupo PTH y control, sin cambios en la distribución de los valores de rigidez.

En los parámetros mecánicos de flexión no se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, lo que implica que el comportamiento a flexión de los callos de fractura no difiere significativamente entre los dos grupos.

En los parámetros mecánicos de torsión en los huesos osteotomizados no se ha encontrado diferencias significativas en ninguna de las tres variables estudiadas, tenacidad, rigidez torsional y par torsor. En los huesos no operados tampoco se ha encontrado diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas.

En los ensayos densitométricos del callo completo se confirmó que los huesos tratados con PTH mostraron un volumen similar a los del grupo control.

Además, la densidad mineral ósea de los callos del grupo PTH no mostró diferencias estadísticamente significativas a la del grupo control. En los huesos no operados no se encontraron diferencias en cuanto al volumen o densidad mineral ósea como inicialmente se esperaba.

Al estudiar la distribución de las distintas densidades en la zona de fractura, no se han detectado diferencias significativas entre los porcentajes de volúmenes generados con cada uno de los grupos y en las isodensidades consideradas. Al estudiar las densidades medias en cada nivel de isodensidad, se ha observado que el grupo PTH da lugar a una densidad ósea significativamente mayor que en el caso del grupo control únicamente para la zona de isodensidad más elevada.

## **6.- CONCLUSIONES**

La osteotomía tibial estabilizada mediante un fijador externo en ovejas ovariectomizadas es un modelo de fractura osteoporótica reproducible y en el que la consolidación se produce en unas condiciones parecidas a las humanas. Por ello consideramos que es un buen modelo experimental para estudiar el efecto de la Hormona Paratiroidea en la consolidación de fracturas osteoporóticas.

El tratamiento con Hormona Paratiroidea a dosis clínicas tras una fractura tibial en el hueso osteoporótico no modifica de forma significativa el área del callo de fractura ni su volumen total.

El comportamiento biomecánico de los callos tratados con Hormona Paratiroidea no ha mostrado diferencias significativas con respecto al grupo control, tanto en los ensayos de flexión a cuatro puntos como en los de torsión.

El análisis densitométrico demuestra que los callos tratados con Hormona Paratiroidea presentan una densidad media similar y una distribución dentro del callo en la que sólo la isodensidad más alta fue mayor en el grupo tratado con Hormona Paratiroidea que en el grupo control.

Por tanto podemos afirmar que en nuestro modelo experimental de fractura osteoporótica, el tratamiento con Hormona Paratiroidea a dosis clínicas no modifica de forma significativa las características del callo óseo con respecto al grupo control.





# INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha habido un creciente interés en la biología de la reparación ósea y en el desarrollo de las nuevas tecnologías para mejorar la consolidación de la fractura. Parte de este interés se deriva del aumento de la edad de la población y el reconocimiento de que este aumento de la edad conlleva un mayor riesgo de sufrir una fractura y un aumento de complicaciones después de que esta ocurra. Aunque el uso de factores de crecimiento locales implantados o inyectados ha recibido mayor atención, los tratamientos sistémicos para mejorar la consolidación, especialmente para situaciones en las que la reparación ósea puede verse disminuida o retrasada, están ahora siendo investigados con mayor detalle.

Desde la aprobación de la hormona paratiroidea humana (PTH) como tratamiento anabólico para la osteoporosis, se ha producido un elevado interés en el potencial uso clínico de este compuesto para otras afecciones musculoesqueléticas. Está ampliamente demostrado que la administración de PTH es una terapia efectiva para aumentar la densidad mineral ósea y prevenir fracturas en pacientes con osteoporosis<sup>21</sup>. Más recientemente, un elevado número de pruebas ha apoyado la hipótesis de que la PTH también podría ser un tratamiento anabólico efectivo para mejorar la consolidación ósea<sup>22</sup>.

La reparación de la fractura es una forma especializada de la cicatrización de heridas en la cual el hueso se regenera rápidamente. Aunque las condiciones sean óptimas, los pacientes requieren importantes periodos de tiempo antes de que una fractura logre un retorno completo a la estabilidad

mecánica. En consecuencia, existe un enorme interés en los tratamientos que pudieran acelerar la tasa de reparación de las fracturas y que permitiesen retornar más rápidamente a un estilo de vida activo. También se ha estimado que entre el 5% y el 10% de las 7,9 millones de fracturas que se producen anualmente en los Estados Unidos sufren un cierto grado de alteración en la consolidación<sup>23</sup>. Hay una serie de condiciones que afectan la reparación ósea, incluyendo edad avanzada, diabetes, osteoporosis y el tratamiento con corticosteroides. La identificación de un tratamiento que pudiera mejorar dicha reparación, incluso en estas condiciones subóptimas, sería de gran importancia social y económica. Se han diseñado numerosas técnicas para mejorar la consolidación ósea.

El injerto óseo autógeno es considerado el patrón oro, y más de 450.000 procedimientos se realizan cada año en los Estados Unidos<sup>24</sup>. Sin embargo, las complicaciones y la morbilidad en la zona donante, como lesión vascular o nerviosa, y unas tasas de infección del 8% al 10% han dado lugar a un mayor uso de materiales alternativos, como el injerto heterólogo. La utilización de estos materiales se ha limitado, sin embargo, por el riesgo de transmisión de la enfermedad, disminución de las propiedades mecánicas y biológicas en comparación con el hueso autólogo, así como el aumento de los costos. Además, no se eliminan los riesgos de infección en la zona receptora. Más recientemente, las cerámicas de fosfato de calcio y cementos han aparecido en el mercado, con resultados variables<sup>25</sup>.

Varios factores osteoinductivos, entre ellos las proteínas morfogenéticas óseas BMP-2 y BMP-7<sup>26,27</sup> han logrado su aprobación por la *Food and Drug*

*Administration* (FDA) para uso en el tratamiento de la pseudoartrosis. Estos compuestos se implantan directamente como proteínas aisladas o colocados en diversas matrices. Sin embargo, estas sustancias siguen exigiendo la implantación quirúrgica local, lo que significa que el riesgo de complicaciones derivadas de la cirugía aún existe. Se cree que la función de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) es principalmente iniciar la curación de la fractura. El tratamiento con BMP sería entonces especialmente útil para reducir el riesgo de pseudoartrosis. De hecho, la pseudoartrosis en humanos parece estar relacionada con los cambios genéticos en el sistema de señalización de las BMPs<sup>28</sup>. También se ha utilizado el tratamiento con BMP para la aceleración de la curación "normal". El reciente escándalo con informes engañosos de ensayos randomizados de tratamiento con BMP2 frente a tratamiento con injerto de hueso esponjoso en cirugía de columna por desgracia ha puesto en duda el uso clínico de las BMP en general<sup>29,30</sup>. En estos trabajos, los eventos adversos fueron seriamente infracomunicados, y el tratamiento comparado (injerto de hueso esponjoso) fue subóptimo, favoreciendo así al grupo BMP2. Los efectos secundarios no deseados incluyeron inflamación local con hinchazón grave, así como la resorción del hueso esponjoso. Este último es un efecto bien conocido de los implantes de BMP desde hace más de una década<sup>31</sup>. Hay publicados dos grandes ensayos multicéntricos de BMP2 para fracturas de la diáfisis tibial. El primero, publicado ya en 2002, reclutando 450 fracturas abiertas, asignados al azar a tres grupos de tratamiento: 12 ó 6 mg de BMP2 en una esponja de colágeno portador, o control<sup>32</sup>. Como los controles no recibieron portador, el médico encargado de examinar no fue cegado. El estudio mostró que el tratamiento con 12 mg de

BMP2 redujo la proporción de pacientes que necesitaron una intervención secundaria de 46% a 26%. Hubo también menos infecciones. Variables no sensibles al sesgo, tales como tiempo de curación radiográfica (revisión ciega) y el número de fallos en los dispositivos de fijación también mostraron una ventaja para el grupo de 12 mg de BMP2. Este estudio ha sido criticado debido a que en el subgrupo tratado con clavo intramedular fresado (tratamiento óptimo) no hubo ningún efecto al tratar con BMP2. Por lo tanto, un nuevo estudio similar se inició, donde 277 pacientes que recibieron clavo intramedular fresado se asignaron al azar formando el grupo tratado con 12 mg BMP2, o grupo control (sin tratamiento)<sup>33</sup>. Este ensayo tuvo que ser terminado antes de tiempo debido a un número alarmante de infecciones de la herida en el Grupo BMP2. Las infecciones podrían estar asociadas con la inflamación local en los lugares de tratamiento, que es un efecto adverso conocido. Sin embargo, las infecciones no necesariamente habrían sido causadas por el BMP2 en absoluto: la necesidad de una disección más amplia en este grupo con el fin de hacer espacio para el portador de la BMP2 puede ser una causa. Sin embargo, el tiempo de curación, basada en criterios clínicos y radiográficos no fue estadísticamente significativa. Para concluir, BMP2 tuvo efectos beneficiosos en fracturas de tibia con un alto riesgo de complicaciones en la cicatrización y en pseudoartrosis. En condiciones más favorables y cirugía óptima, los efectos negativos parecen dominar. Es evidente que se necesitan más estudios. Debe tenerse en cuenta que, excepto para los criticados estudios de la columna vertebral, ningún estudio hasta la fecha ha demostrado que las BMP sean mejores que el injerto de hueso esponjoso.

Muchas de estas complicaciones clínicas podrían evitarse con la administración sistémica de una terapia que aumentase la reparación de la fractura, a fin de evitar la necesidad de una intervención quirúrgica. Además, la adición de un tratamiento anabólico óseo después de la intervención quirúrgica podría mejorar las tasas de reparación, acelerando la restauración de la función mecánica y acortando la inmovilización del hueso en fase de reparación.

La PTH es un compuesto candidato que tiene un gran potencial como un agente anabólico sistémico para la mejora de la reparación ósea. Actualmente la PTH 1-84 y su fragmento aminoterminal (N-terminal) PTH 1-34 (teriparatide) han sido aprobadas en Europa para su uso en el tratamiento de la osteoporosis en los seres humanos<sup>34</sup>.

Hay dos áreas principales de investigación en relación con PTH:

- 1) La prevención de las fracturas.
- 2) El uso de la PTH para mejorar la calidad ósea después de la reparación de la fractura.

Un elevado número de estudios clínicos ha demostrado la eficacia de la PTH en el tratamiento para la prevención de fracturas en pacientes humanos que tienen osteoporosis, y estos estudios han demostrado que dichos beneficios se mantienen incluso tras el cese de tratamiento<sup>35-37</sup>.

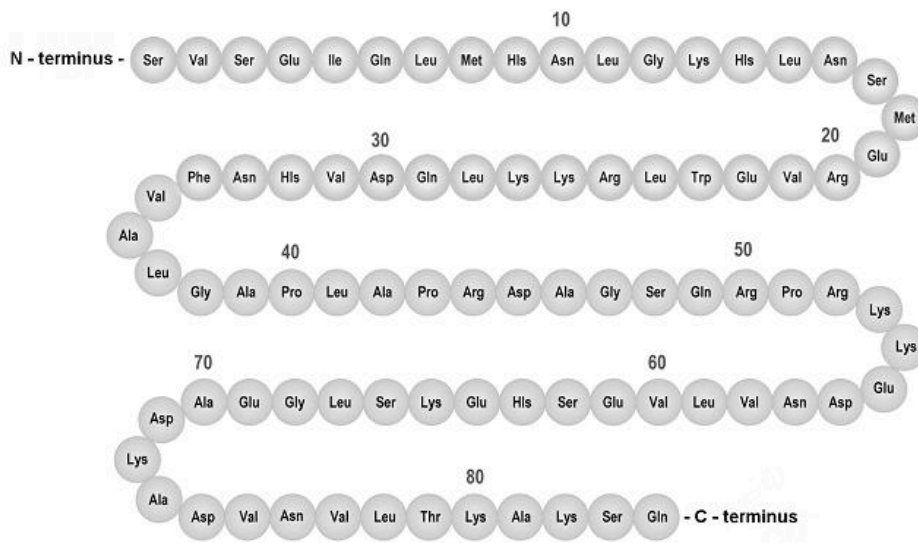
## **1.- Hormona paratiroidea (PTH)**

### 1.1.- Estructura

La hormona paratiroidea (PTH) es una proteína sintetizada por las células principales de las glándulas paratiroides, inicialmente como un polipéptido de 110 aminoácidos denominado pre-proPTH, que es posteriormente escindido para formar un péptido de 90 aminoácidos (pro-PTH). Tras una segunda escisión se forma la PTH, constituida por un polipéptido de 84 aminoácidos, que es almacenada y segregada por las glándulas paratiroides ante un estímulo de hipocalcemia. El estímulo para la liberación de la hormona es, sobre todo, el calcio iónico. Durante la hipercalcemia se segrega la hormona inactiva (fragmento carboxi-terminal o C-terminal) mientras que ante una hipocalcemia se libera mayoritariamente PTH intacta, con supresión intracelular de las vías degradativas de esta hormona. En sangre periférica la PTH intacta (cuya vida media es de 2.4 minutos) puede constituir hasta el 30% de la PTH inmunorreactiva circulante, mientras que los fragmentos C-terminal (menor del 30%) y N-terminal (menor del 5%) se detectan en mucha menor proporción<sup>38</sup>.

Se sabe que de los 84 aminoácidos que la configuran, los 34 primeros constituyen el fragmento amino-terminal (N-terminal), considerado como la fracción biológicamente activa<sup>39</sup>. De hecho, fragmentos de dicha hormona nativa como son PTH (1-31), PTH (1-34), PTH (1-36) y PTH (1-38) tienen la misma potencia y perfil farmacológico que la hormona completa PTH (1-84) mientras que la PTH (1-30) es incapaz de aumentar la masa de hueso esponjoso en ratas ovariectomizadas<sup>40-46</sup>. Por el contrario, aquellos fragmentos

que carecen de un extremo amino-terminal normal PTH (3-34), PTH (13-34), PTH (8-84) si bien estimulan la PKC, no pueden activar la adenilciclase para provocar estímulo neoformador óseo, aunque estudios recientes *in vitro* y en animales sugieren que el fragmento C-terminal de la PTH puede actuar en otros procesos relacionados con la resorción y formación ósea<sup>47</sup>.



**Figura 1. Estructura de la Hormona Paratiroidea de cadena completa (PTH 1-84)**

### 1.2.- Perspectiva histórica

En el año 1925 Collip<sup>48</sup> preparó un extracto de glándulas paratiroides y demostró que restablece la calcemia en casos de tetania. Un año después, Eli Lilly fabrica para-Thor-Mone, un extracto de glándulas paratiroides para el tratamiento de la hipocalcemia. Albright y Ellsworth<sup>49</sup> usaron por primera vez este extracto en 1929 para tratar el hipoparatiroidismo idiopático.

En 1929 Bauer, Aub y el propio Albright<sup>50</sup>, describen que un extracto de paratiroides aumenta el número de trabéculas óseas en ratas en crecimiento, describiendo por vez primera su acción osteo-anabolizante. En 1932 Selye<sup>51</sup> comprobó cómo la inyección diaria de pequeñas dosis de extracto de paratiroides estimula los osteoblastos y la formación ósea en ratas. En los animales tratados el hueso se volvía macroscópicamente más denso que en el grupo control. Sin embargo, cuando la hormona era suministrada en grandes dosis, se producía una resorción ósea.

En 1967 Arnaud<sup>52</sup> demostró que extractos purificados de las glándulas paratiroides tienen acción directa sobre el riñón y el hueso así como sobre el tracto gastrointestinal y las glándulas mamarias lactantes.

Tras un período sin nuevos datos, probablemente porque a la PTH se le atribuían sólo los efectos deletéreos asociados al hiperparatiroidismo, en 1980 Reeve<sup>53</sup> lleva a cabo el primer ensayo clínico con PTH (1-34) sintética, describiendo un aumento en el volumen trabecular del 70% sobre el valor basal. Poco después, Podbesek<sup>54</sup> demostró que la inyección diaria de PTH (1-34) sintética aumenta la formación y resorción óseas, abriendo con ello la vía para los ensayos de desarrollo clínico de dicho fármaco<sup>55</sup>.

### 1.3.- Mecanismo de acción de la PTH

Numerosos estudios clínicos y experimentales han demostrado que PTH es el mayor regulador del metabolismo óseo. La acción fisiológica fundamental



de la PTH es el mantenimiento de la homeostasis del calcio, manteniendo casi constantes las concentraciones de calcio ionizado a través de:

1) La resorción de calcio por los túbulos renales.

2) Estimulando la absorción de calcio a nivel intestinal por incremento de la actividad de la  $1\alpha$ -hidroxilasa renal con producción de  $1-25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , y por último,

3) Estimulando la resorción ósea<sup>56</sup>.

En situaciones clínicas en las que existe una elevada exposición crónica a la PTH, como en el hiperparatiroidismo primario clínico, caracterizado por un exceso de PTH (que antaño se diagnosticaba con las formas clásicas de osteítis fibrosa quística, aunque en la actualidad se detectan en estadios precoces asintomáticos) se produce una gran pérdida ósea. El patrón de pérdida ósea inicial del hiperparatiroidismo es, sobre todo, cortical, mientras el hueso trabecular tiende a conservarse<sup>57</sup>. Esto puede conducir a la paradoja de que una mujer postmenopáusica con hiperparatiroidismo puede tener más masa ósea lumbar que una mujer postmenopáusica sana.

Se ha demostrado que la PTH tiene una acción dual anabólica y catabólica. La PTH actúa como agente anabólico óseo cuando se administra intermitentemente<sup>58-68</sup>, con aumento predominante de los marcadores de formación ósea. El aumento de la formación ósea se debe al aumento de la diferenciación y de la actividad de los osteoblastos, interviniendo la estimulación del factor transcripcional Runx2/Cbfa 1, la producción de IGF-1 y

otros mediadores señalados. Este aumento de la formación ósea inducido por la administración intermitente tiene su correlación en el aumento de la superficie ósea de formación, en cada unidad de formación, en cada unidad de remodelado y de la frecuencia de activación, aumentando las unidades activas. Esto se traduce en un incremento del hueso trabecular y de las superficies corticales.

Por el contrario, una exposición continua a PTH produce un aumento acoplado de ambos procesos de formación y resorción ósea, en la que domina una tendencia a la pérdida ósea en la mayoría de los casos debido a una mayor activación de la resorción osteoclástica del hueso con respecto a la función de los osteoblastos<sup>67,68</sup>, por lo que se producirá, en una exposición continua, un aumento de la resorción ósea. Durante el predominio de este efecto catabólico (infusión continua) hay, sobre todo, un aumento de la resorción ósea por estimulación de la actividad de los osteoclastos y de la osteoclastogénesis. Dado que los osteoclastos no tienen receptores para la PTH, este efecto parece mediado por la expresión aumentada de RANKL y posiblemente también por disminución de la OPG por el osteoblasto. La activación del osteoclasto por el RANKL sería en último término responsable de la resorción aumentada y de la hipercalcemia típica de la administración continua.

Recientemente, se intenta también explicar que aunque ambas administraciones, intermitente (una vez al día), y continua aumentan la tasa de recambio óseo, los efectos anabólicos y catabólicos respectivos, estarían en relación con el tiempo durante el cual la concentración de PTH se mantuviera

elevada. La exposición prolongada a PTH causaría una desensibilización del sistema adenilciclasa y de la vía PKC, con una regulación a la baja, que sería dosis dependiente. En los tratamientos anabólicos (infusión intermitente) en los cuales la concentración de PTH se normaliza en horas, habría mayor tiempo para recuperación celular antes de la próxima dosis; en cambio, en la administración continua esto estaría notablemente reducido y no habría posibilidad de generar una respuesta a nivel celular de osteogénesis.

Sin embargo el mecanismo celular responsable de las acción anabólica del tratamiento intermitente con PTH no se conoce por completo<sup>59,68,69</sup>.

Diferentes estudios experimentales se han utilizado para evaluar los efectos anabólicos de la PTH en el hueso: marcadores en sangre de formación y reabsorción ósea, medidas de densidad ósea, análisis histomorfométrico de la arquitectura ósea, ensayos mecánicos de material óseo (resistencia y rigidez)<sup>70-73</sup>.

La PTH puede actuar a través de distintos mecanismos. Como la PTH se une a más de un receptor es posible que sean diferentes receptores los que medien las respuestas anabólicas y catabólicas<sup>69</sup>. Los osteoblastos, las células óseas de revestimiento y las células del estroma de la médula ósea que pueden diferenciarse a células osteoblásticas, tienen receptores para PTH. Estudios recientes de Watson<sup>74</sup> indican que la PTH y su péptido relacionado (PTHrP) en el hueso (y en otros tejidos) tienen una localización nuclear bien documentada. Este receptor PTHrP interactúa con el ARN, regulando la función celular. Este mismo autor demostró que dicho receptor puede localizarse en el núcleo de células del hígado, riñón, intestino, útero y ovario de la rata.

La PTH se une a su Receptor Hormonal 1 en las células osteoblásticas para regular el remodelado óseo y la homeostasis del calcio<sup>75</sup>.

#### PTH y regulación y diferenciación del osteoblasto

El osteoblasto y sus células progenitoras son células diana de la PTH<sup>76,77</sup>. Se piensa que la PTH tiene los siguientes efectos sobre el osteoblasto:

1. Estimulación de la proliferación de los precursores tempranos de los osteoblastos (células osteoprogenitoras) hacia la transformación irreversible en pro-osteoblastos y osteoblastos, a través de factores de crecimiento cuya expresión modula la PTH<sup>78</sup>.
2. Aparición de osteoblastos maduros con ciclo celular quiescente.
3. Transformación de las células de revestimiento óseas y de los osteocitos en osteoblastos activos<sup>79,80</sup>.
4. Aumento de la vida media de los osteoblastos por disminución de la apoptosis (muerte celular programada).
5. La PTH regula primordialmente la expresión génica en los osteoblastos, estimulando la síntesis de proteínas implicadas en la formación y resorción ósea.

La extirpe celular de los osteoblastos se origina a partir de las células pluripotenciales del estroma de la médula ósea. Estas células pueden evolucionar hacia la formación de adipoblastos, condroblastos, fibroblastos y

mioblastos, o bien hacía osteoblastos. En la diferenciación hasta el osteoblasto maduro, es necesario el estímulo del factor transcripcional Cbfa1 (*core binding factor 1*) también llamado Runx2, cuya expresión es inducida en estas células por la PTH<sup>81</sup>.

Las células pluripotenciales, pueden expresar la denominada proteína Id-1 (*inhibitor of differentiation-1*) estimulada por proteínas morfogénicas óseas (BMP-2), que son capaces a su vez de neutralizar otras proteínas (TWIST y Dermo-1) inhibidores de la proliferación y de la maduración a osteoblastos facilitada por el factor de transcripción Cbfa-1/ Runx-2 ya mencionado<sup>82,83</sup>. En el control y diferenciación de los osteoblastos, el Cbfa-1 tiene un papel principal, aunque también intervienen otros factores transcripcionales como el C-FOS y otros como el AP-1 (activador de proteínas)<sup>84-86</sup>.

La PTH actúa principalmente incrementando el número y función de osteoblastos activos, lo que ocurre mediante el reclutamiento de células proliferativas en vías de proliferación de osteoblastos y estimulando la diferenciación de células quiescentes de la superficie ósea. No obstante, el aumento precoz del número y tamaño de las superficies de formación ósea es más compatible con una acción estimulante de la diferenciación de osteoprogenitores de los osteoblastos, que con un estímulo precoz de la proliferación.

La PTH(1-34) actúa también aumentando la vida media de los osteoblastos maduros, habiéndose señalado que reduce la apoptosis de estas células del 1,7-2,2% a un 0,1-0,4%<sup>87</sup>.

La diferente administración de PTH induce la aparición de pulsos de AMP cíclico como respuesta a la estimulación de la adenilciclase. El esquema teórico de Qin<sup>88</sup> del curso evolutivo de los niveles de PTH 1-34, PTH1R activa y AMP cíclico, durante y después de la administración intermitente o continua de PTH 1-34, es explicativa de la secuencia de los mecanismos actuantes. En dicho esquema la administración intermitente de PTH 1-34 ocasiona picos mayores repetidos que la infusión continua. La infusión continua provoca niveles bajos persistentemente continuos de PTH1R biológicamente activa frente a su periódica recuperación tras la administración intermitente, en relación al efecto de regulación a la baja que ejerce esta última. Por último, la aparición de AMP cíclico se caracteriza por picos durante la administración intermitente y por pico seguido de niveles bajos continuos tras la administración de forma continua. Estos picos son capaces de provocar la expresión y secreción de factores involucrados en la proliferación y diferenciación de los osteoprogenitores, la acumulación de osteoblastos en superficies óseas y el aumento de su vida media. Es el AMP cíclico el responsable de iniciar este proceso osteoformador y de estimular a estas células a producir sustancias que activan y llevan a la osteogénesis. Entre las más estudiadas esta la IGF-1 segregada por los osteoblastos ante el estímulo de PTH, que tiene un papel auto y paracrino de estimulación de la proliferación de estas células y de los progenitores con y sin PTH R1<sup>89</sup>.

Durante la infusión continua de PTH, el efecto de estimulación de la IGF sería sobrepasado por un mayor incremento de IGFBPs, que limitaría sensiblemente su biodisponibilidad a nivel celular óseo<sup>67</sup>. Todo lo contrario de lo que ocurre durante su administración intermitente.

Otro factor implicado en la mediación extracelular de los efectos de PTH es TGF $\beta$  cuya producción es también estimulada por esta hormona y cuya acción se ejerce preferentemente sobre la expresión de la osteoprotegerina (OPG)<sup>90</sup> además de potenciar los efectos de IGF1 y FGF-2 (*fibroblast growth factor*) sobre la proliferación de los osteoprogenitores de los osteoblastos<sup>91</sup>.

La PTH actúa estimulando la síntesis de proteínas por los osteoblastos, que a su vez aumentan la actividad de los osteoclastos, liberando calcio de las superficies óseas. El sistema OPG/RANKL (factor ligando estimulador del receptor RANK) interviene en esta interacción, en la que las células del estroma y de la estirpe osteoblástica, regulan la diferenciación de los osteoclastos<sup>92,93</sup>. Entre las proteínas que produce el osteoblasto por estímulo de PTH destacan RANKL, pero también IGF-1 e interleukina 6 (IL-6).

Cuando la proteína RANKL predomina en su unión al receptor RANK (receptor miembro de la súper familia TNF) localizado en la superficie del osteoclasto, se produce una diferenciación de los progenitores de los osteoclastos a células maduras. Este efecto es estimulado por la infusión continua de PTH, mientras que actuaría también, disminuyendo la producción de OPG, que es un inhibidor principal de la diferenciación, formación y función de los osteoclastos<sup>94</sup>. La respuesta osteoclastogénica de la PTH durante la infusión continua aumenta las concentraciones de RANKL, mientras que disminuye la OPG (que inhibe la estimulación del receptor RANK por el RANKL), incrementando el número de osteoclastos activos. En cambio, durante la administración intermitente, este efecto sería transitorio o no tendría lugar, siendo más importante la respuesta osteoblástica formadora de hueso.

Además, en la infusión continua de PTH podría haber una mayor degradación del producto del gen *Cbfa1*. Por último, la infusión continua de PTH estimularía a los osteoblastos a la producción intensa de IGFbps, reduciendo la fracción libre “activa” de IGF1<sup>95</sup>.

#### PTH y sistema RANK-L

La PTH mantiene la homeostasis del calcio en parte estimulando la osteoclastogénesis, para liberar calcio del tejido óseo al medio extracelular. Este efecto lo realiza de forma indirecta, ya que los receptores de la PTH se encuentran en las células estromales/osteoblásticas. Estas células estimulan la formación de osteoclastos a través de la expresión de ligando del receptor activador NFκB (RANKL) y del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF).

La PTH ejerce sus acciones preferentes, directas sobre el hueso y riñón e indirectas sobre el intestino. Para ello se liga a receptores específicos en la superficie de las células diana óseas y renales, ocasionando la liberación de segundos mensajeros citoplasmáticos que ponen en marcha la respuesta hormonal biológica. En las células óseas, la acción de PTH se ejerce a través de los osteoblastos, únicas células en las que se han detectado receptores para esta hormona (PTHr1)<sup>96</sup>. Este PTHr1 localizado en la membrana plasmática de los tejidos diana, es un receptor que se caracteriza por presentar 7 dominios transmembrana y ligar con similar afinidad PTH y PTHrp. El PTHr1 tiene una porción extracelular (amino-terminal), otra intracelular (carboxi-terminal) y 7 dominios transmembrana (alfa hélices), que dispuestos a modo de



barriles en torno a un cilindro, se encuentran conectados por asas extra e intracelulares, estando el centro y el interior de este cilindro polarizado.

Para esta unión de la PTH a su receptor se requieren los primeros 34 aminoácidos. La función del extremo carboxilo no es bien conocida. Recientemente se ha localizado el gen que codifica el PTHR1 en el locus 3p22-p21.1 del cromosoma tres<sup>97</sup>.

Se ha postulado que la interacción PTH-PTHr1 puede ser descrita como un modelo dinámico con “dos sitios”<sup>98</sup>. En este modelo la porción carboxi-terminal de la PTH interacciona con el dominio amino-terminal del receptor en primer lugar y el extremo amino-terminal de la PTH se une a la zona o dominio J del receptor PTHR1<sup>99</sup>. Se produce entonces el acoplamiento de la hormona, el receptor y la proteína G, aumentando la afinidad en el dominio J, posiblemente con cierre de la conformación del receptor dando lugar a cambios conformacionales y a su activación. Esto sugiere por tanto, que en el estado de no acoplado, el receptor PTHR1 tendría una conformación “abierta”:

La unión de la hormona con este receptor (PTHr1) en los osteoblastos ocasiona cambios conformacionales en su molécula y una respuesta en la que están involucradas las subunidades de los nucleótidos por distintas vías: 1) Activación del sistema adenilciclase con génesis de AMP cíclico y, 2) Activación de fosfolipasa/PKC.

Tanto la PTH intacta 1-84 como el fragmento PTH 1-34 actúan a través del extremo amino-terminal de la molécula, estando la secuencia responsable de la activación de la subunidad Gs, situada en los 13 primeros residuos de la PTH. Análogos con secuencias más distales a la 1-34 no activan la vía del AMP cíclico y sí la vía de la CKC.

El segundo mecanismo también implicado en el efecto de la PTH, sería la estimulación de la fosfolipasa C.

Aunque no se puede descartar que la activación de ambas vías sea importante para la adecuada respuesta, la importancia del primer mecanismo como mediador de la acción biológica de la PTH además de los estudios *in vitro*, es patente en la clínica, en donde los pacientes afectos de pseudohipoparatiroidismo tipo I no son capaces de generar AMP cíclico, mostrando clara resistencia a la infusión de esta hormona.

*In vitro*, la exposición a PTH (1-34) de células procedentes de médula ósea de ratas y osteoblastos produce un aumento en la expresión de mRNA de RANKL, al tiempo que disminuye la expresión de mRNA de OPG<sup>94</sup>. Estos cambios preceden en varias horas al aumento en la formación de células de aspecto osteoclastico. Resultados similares han sido descritos por otros autores<sup>100,101</sup>, y también utilizando PTH (1-38)<sup>102</sup>.

Recientemente se ha podido estudiar *in vivo* la diferente expresión de genes inducida por distintas pautas de administración de PTH 1-34 (intermitente/anabólica *versus* continua/catabólica) en ratas. Mediante tecnología de microarrays de DNA es posible estudiar el nivel de expresión de miles de genes de forma simultánea en un mismo experimento. Esta técnica permite confirmar que PTH 1-34 regula de forma diferencial un gran número de genes (más de 1000) en ambos regímenes de tratamiento. En el caso del gen RANKL aumenta con ambas pautas de tratamiento pero de forma diferente: la administración intermitente produce una estimulación marcada y cíclica, que va aumentando en inyecciones sucesivas; la infusión continua produce un

incremento más moderado pero sostenido. La pauta intermitente también aumenta la OPG pero de forma retrasada al aumento de RANKL, lo que resulta en un aumento transitorio del cociente RANKL/OPG. El aumento transitorio de la actividad osteoclástica seguida de un aumento de OPG que suprime esta actividad osteoclástica podría ser de gran importancia para lograr el efecto anabólico. De forma similar, la PTH (1-34) intermitente se acompaña de una regulación positiva pero transitoria de otros genes asociados con la resorción ósea, como interleukina-6, CXCL1 y MCP-1, mientras que el régimen catabólico produce un grado mucho menor de expresión de estos genes, pero de forma sostenida<sup>103</sup>.

Los estudios clínicos con PTH (1-34) parecen confirmar los hallazgos anteriores. Buxton<sup>104</sup> determinó los cambios en los niveles séricos de RANKL soluble (RANKLs), interleukina-6 (IL-6) y receptor soluble de IL-6 (IL-6sR) en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis inducida por glucocorticoides y tratadas con 40 µg/día de PTH (1-34) durante 12 meses junto a terapia hormonal sustitutiva. Los niveles de RANKLs aumentaron de forma rápida y significativa, con un incremento detectable en el primer mes y un pico a los 3 meses de más de 250% respecto a los niveles basales previos, permaneciendo significativamente elevados durante todo el tiempo de tratamiento. Los niveles séricos de OPG se mantuvieron levemente suprimidos a partir de los 6 meses de tratamiento. Los niveles de IL-6 también aumentaron precozmente un 130% respecto a los valores basales, y los de IL-6sR más modestamente en el primer mes. Todas estas modificaciones en los niveles de factores de origen osteoblástico fueron más precoces y más pronunciados que el incremento de un marcador de actividad osteoclástica, como los niveles de D-Pyr urinaria.

La descripción inicial de disminución de la masa y aumento de la porosidad cortical, y el incremento del hueso trabecular durante la administración intermitente de PTH 1-34<sup>105</sup>, no ha sido confirmada en recientes estudios que señalan que PTH aumenta el hueso cortical a través de aumentar la aposición endocortical además de incrementar la resistencia ósea a fracturas<sup>106-108</sup>.

#### 1.4.- Efectos de la PTH en la densidad mineral ósea y en la reducción de incidencia de fracturas.

El reciente desarrollo de agentes formadores de hueso ha supuesto una nueva opción para la prevención de fracturas osteoporóticas. La administración intermitente de la hormona paratiroidea de cadena completa PTH 1-84 así como de su fracción PTH 1-34 reduce el riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales en mujeres osteoporóticas postmenopáusicas y mejora la densidad mineral ósea.

Dos son los principales estudios clínicos que analizan los efectos de la administración de hormona paratiroidea.

Neer y cols.<sup>21</sup> utilizando la PTH (1-34) sobre un total de 1637 pacientes mujeres, con una edad media de 70 años que habían sufrido al menos una fractura vertebral osteoporótica, a dosis de 20 ó 40 µg frente a placebo, determinó un riesgo relativo de fractura vertebral a dichas dosis de 35% y 31% respectivamente, frente a placebo. El riesgo relativo de fractura no vertebral osteoporótica fue del 47% y 46% respectivamente frente a placebo. Este estudio nos permite conocer que el NNT (número necesario de tratamientos

para evitar un evento clínico, en este caso una fractura) fue de 12 y 10 respectivamente para evitar una fractura vertebral y de 34 para evitar una fractura no vertebral con ambas dosis.

Greenspan y cols.<sup>109</sup>, utilizando la molécula completa de la hormona paratiroidea PTH (1-84) a dosis de 100 µg al día versus placebo estudió el efecto en 2532 mujeres postmenopáusicas con una edad media de 65 años, con osteoporosis definida por una densidad mineral baja en cadera o raquis lumbar. El riesgo relativo de padecer una fractura vertebral fue del 42% frente a placebo. No existieron diferencias significativas en la prevención de fracturas no vertebrales con respecto a placebo. El NNT fue de 51 para evitar una fractura vertebral.

Respecto a la densidad mineral ósea, Neer<sup>21</sup> comparando las dosis de 20 y 40 µg de PTH (1-34) encontró un incremento en la densidad mineral de 9% y 13% en columna, con respecto a placebo. En cuello femoral del 3% y 6% respectivamente; en la diáfisis radial se observó una disminución del 2% a dosis de 40 µg, sin existir diferencias significativas a dosis de 20 µg. Constató así mismo un incremento del 2% y 4% en la densidad mineral de todo el cuerpo con respecto a placebo.

Greenspan, a dosis de 100 µg de PTH (1-84) encontró un aumento de la densidad mineral ósea del 6,9% en la columna, 2,1% en cadera, una disminución en antebrazo de 3,4% y un ligero aumento no significativo de 0,67% en esqueleto total.

La magnitud de dichos cambios sugiere que existe un incremento sustancial en la formación ósea, pero los mecanismos mediante los que se consigue no son totalmente conocidos.

Este incremento puede ocurrir mediante una formación basada en el remodelado o bien en el modelado óseo.

El remodelado es el proceso resultante de la coordinación de resorción y formación del tejido óseo. Ocurre a nivel microscópico en las unidades básicas multicelulares formadas por osteoclastos y osteoblastos. Señales no del todo conocidas atraen a los osteoclastos (células multinucleadas encargadas de la resorción) para formar la unidad de remodelado óseo. Cuando la resorción por parte de los osteoclastos en dicha unidad se ha completado (un proceso que puede durar 3 a 5 semanas), la superficie resorbida atrae a los osteoblastos (células mononucleares formadoras de hueso) que ocupan la unidad básica multicelular con una nueva matriz. La acción de los osteoblastos y el completado de la secuencia de remodelado con la mineralización de la matriz puede durar de 3 a 5 meses.

Los osteoclastos derivan de la fusión de monocitos procedentes de las Unidades Formadoras de Colonias granulocito-macrófago; los osteoblastos derivan de las células pluripotenciales del estroma de la médula ósea. Los osteocitos son osteoblastos que han quedado inmersos en la matriz ósea calcificada. Con sus procesos citoplasmáticos forman una gran red intercomunicada que ayudan a mantener las propiedades del hueso. Los osteocitos, que actúan como mecanorreceptores, identifican los lugares para el remodelado cuando detectan deformaciones mecánicas por encima o por debajo de un umbral que suponen la necesidad de una adaptación ósea que permita restablecer el nivel de deformación fisiológico inicial<sup>110</sup>. En este sentido, los osteocitos son una ayuda para el remodelado óseo<sup>111</sup>.

En adultos, el remodelado óseo es el mecanismo de renovación ósea y de reparación de microfracturas.

El balance óseo negativo que ocurre en la mayoría de mujeres postmenopáusicas es debido a que la resorción supera a la formación ósea por un aumento del número o de la actividad de los osteoclastos, una disminución del número o actividad de los osteoblastos o una combinación de ambos mecanismos.

El modelado óseo (en contraste al remodelado) es un proceso en el que puede cambiar la forma y tamaño del hueso. Es conducido por fuerzas mecánicas y se observa predominantemente en el esqueleto en desarrollo. Osteoblastos y osteoclastos son los componentes celulares claves, pero no están asociados entre sí como ocurre en el remodelado óseo, es decir, se produce una formación ósea sin que antes hayan actuado los osteoclastos resorbiendo hueso. El modelado óseo en el esqueleto humano adulto no ocurre habitualmente en condiciones fisiológicas. Los mecanismos moleculares que inician el modelado óseo no son conocidos, pero en ellos juegan un papel esencial los fármacos anabólicos utilizados en el tratamiento de la osteoporosis como la PTH.

La distinción entre la formación de hueso por modelado y por remodelado no es sencilla, puesto que el modelado se puede producir en las superficies que están experimentando remodelación. Por otra parte, si hay excedente de formación ósea más allá de los márgenes de las unidades de remodelación ósea, la apariencia en los cortes histológicos puede sugerir modelado en lugar de remodelado<sup>112</sup>. A pesar de estas posibles dificultades, dos enfoques se han adoptado para la identificación de estos diferentes

mecanismos de la formación ósea. El primero se basa en la evolución temporal del aumento de la tasa de formación ósea tras la administración de PTH, asumiendo que si se evidencia un aumento de formación anterior a la duración de la fase resorptiva de remodelación (es decir, aproximadamente 6 semanas), puede inferirse razonablemente de que la formación se debe a un modelado óseo<sup>112,113</sup>. El segundo enfoque se basa en la apariencia de la superficie del hueso por debajo del hueso recién formado. En el caso del remodelado óseo la superficie es irregular como resultado de la reabsorción ósea previa y, además, la interrupción de las fibras de colágeno, que se observa bajo la luz polarizada, indica que antes se ha producido la resorción<sup>114</sup>. Por el contrario, una superficie lisa se observará por debajo del hueso neoformado por modelado y las fibras de colágeno tendrán una orientación similar a la del tejido óseo adyacente<sup>115,116</sup>. Ninguno de estos métodos carece de problemas; en el caso del primero, se podría argumentar que el proceso de remodelación se acelera por la PTH y por lo tanto la duración de la fase de resorción puede ser más corta de lo normal. En segundo lugar, mientras que la presencia de una superficie dentada en la base de las unidades de remodelación ósea es un signo fiable del proceso de remodelación, puede ser más difícil de identificar superficies en las que el modelado óseo se ha producido y por lo tanto la contribución de este último podría subestimarse. Por último, la interrupción de las fibras de colágeno puede ser un artefacto del corte histológico y debe confirmarse en secciones longitudinales<sup>117</sup>.

La evidencia de la presencia de la formación de hueso por modelado asociado con la administración intermitente de PTH fue publicado por primera vez por Hodsman y cols.<sup>113</sup> en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis que



recibieron tratamiento con PTH (1-34) a dosis de 50 µg al día, durante 28 días cada 3 meses, con o sin la calcitonina asociada. En las biopsias de hueso obtenidos 28 días después del inicio de tratamiento, las superficies doblemente marcadas con tetraciclina y el porcentaje de superficie de formación ósea se incrementó significativamente en comparación con los controles, lo que sugiere que la formación de hueso había ocurrido durante esta primera fase en la superficie ósea en reposo<sup>118</sup>. Posteriormente, Dempster<sup>119</sup> demostró la presencia de la formación ósea por modelado, utilizando el criterio de una línea cemento liso, sobre superficies de hueso esponjoso y endocortical tras 28 días del inicio de teriparatida en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis. Utilizando la técnica de marcaje cuádruple de tetraciclina, estudiando a corto plazo (4 semanas) el tratamiento de los cambios inducidos en una sola biopsia ósea, Lindsay<sup>112</sup> observó una combinación de la formación ósea basada en modelado y remodelado, predominando esta última con un porcentaje de formación del 70% y 78% en hueso trabecular endocortical, respectivamente. Debido a que el perímetro de erosión no fue mayor en mujeres tratadas con la hormona paratiroidea que en una población control, lo cual sugería que no se estaban creando nuevos sitios de remodelación, concluyó que la mayoría de la formación de hueso nuevo en los primeros períodos de tratamiento se produjo en los sitios que ya estaban sometidos a remodelación ósea cuando se inició el tratamiento. Además, hipotetizó que la formación de hueso más allá de los límites de la cavidad reabsorbida representaría una parte sustancial del hueso formado por modelado.

Esta posibilidad de "desbordamiento", añade mayor complejidad a la distinción entre la formación de modelado y remodelado ya que puede ocurrir

como consecuencia de la reducción de apoptosis de los osteoblastos que ya están participando en el proceso de remodelación o como resultado de la activación de las células de revestimiento en las proximidades de la unidad de remodelación, esto último quizás estando preferentemente situado en los sitios adyacentes a las unidades de remodelación como resultado de las citoquinas o factores locales de crecimiento. La formación basada en el modelado puede ocurrir como resultado de la activación directa por parte de la PTH las células de revestimiento para formar osteoblastos activos<sup>80</sup>; la observación que el tratamiento crónico con alendronato frena la respuesta anabólica de la PTH es compatible con esta hipótesis ya que la exposición crónica al bifosfonato puede ser necesaria para reducir la producción proteica en los osteoblastos y por lo tanto disminuir su función<sup>120</sup>. Estos datos indican que al menos en las primeras etapas de la terapia intermitente de PTH, la formación ósea basada en el modelado ocurre en hueso esponjoso y endocortical, probablemente en muchos casos aunque no exclusivamente como una extensión de la formación del hueso basada en la remodelación, más allá de los márgenes originales de la cavidad de resorción. En el primer mes de tratamiento, el modelado contribuye hasta en un tercio de la formación ósea, pero con períodos de tratamiento más prolongados puede llegar a ser menos prominente. Así, en una comparación de las biopsias de mujeres posmenopáusicas tratadas durante un período medio de 19 meses con 20 ó 40 µg al día de teriparatida, Ma y cols.<sup>117</sup> señalaron que el modelado suponía sólo el 2,8% y 7,7% respectivamente de la formación en el hueso esponjoso.

Se desconoce por el momento si la tasa de remodelado se incrementa o no como consecuencia de la administración de PTH. Debido a que las

mediciones de la frecuencia de activación están basadas en la formación y parten del supuesto de que la formación sigue a la resorción, son poco fiables en la presencia de la formación ósea basada en el modelado. La falta de cualquier aumento en perímetro erosionado después de un mes de tratamiento en el estudio de Lindsay y cols.<sup>112</sup> y después de 6 y 18 meses de tratamiento cuando en comparación con ALN en el estudio de Arlot y cols.<sup>121</sup> sugiere que la tasa de remodelación no se incrementa. A la inversa Hodsman y cols.<sup>113</sup> reportaron un aumento significativo de la erosión de superficie a los 28 días y 2 años después del inicio del tratamiento, mientras Dempster y cols.<sup>71</sup> demostraron una reducción significativa en la superficie endocortical después de 18-36 meses de tratamiento. No obstante, las mediciones de la superficie erosionada están sujetas a grandes variaciones de medida y, además, se verán influidas si hay cambios en la duración del período de inversión. Sin embargo, el aumento de los marcadores bioquímicos de reabsorción ósea tras tratamiento con PTH apoyaría la hipótesis de un aumento de la tasa de remodelación. Esto se produce tras el aumento de la formación de hueso y alcanza un máximo entre 6 y 12 meses<sup>122</sup>, en consonancia con otros elementos que prueban que la formación basada en el modelado es máxima poco después de iniciar el tratamiento y que la contribución relativa de la formación basada en la remodelación ósea aumenta posteriormente.

De las pruebas disponibles, por lo tanto, se pueden proponer tres mecanismos por los cuales PTH incrementa la masa ósea, aunque su contribución relativa en los diferentes momentos del tratamiento debe ser establecida. En primer lugar, el modelado verdadero, en que el nuevo hueso se forma en las superficie óseas en reposo independiente de actividad actual de

remodelación, en segundo lugar una mezcla de remodelado y modelado en el que se produce un llenado excesivo de las unidades de remodelación con la extensión de la formación ósea más allá de los márgenes de las cavidades de reabsorción; y en tercer lugar, un aumento de la tasa de remodelación asociado con un saldo positivo de remodelación.

#### Efectos de la PTH en la microarquitectura del hueso esponjoso

Mientras que los agentes antirresortivos mantienen la estructura preexistente<sup>123,124</sup>, los agentes anabólicos tienen el potencial para alterar dicha estructura. El estudio de los efectos de la PTH a partir de las mediciones en la conectividad y la forma trabecular aporta algunas pruebas de que dicha alteración se puede producir. Así, la densidad de conectividad de las trabéculas óseas en hombres y mujeres con osteoporosis tratados con PTH (1-34) aumentó después de 3 años de tratamiento<sup>119</sup>, y en mujeres con osteoporosis que recibieron tratamiento durante una media de 19 meses<sup>125</sup> la densidad de conectividad fue significativamente mayor en las mujeres tratadas con la hormona paratiroidea que en aquellos que recibieron placebo.

Aunque el aumento de la densidad de conectividad puede reflejar la perforación trabecular o la construcción de túneles dentro de las trabéculas en vez de la restauración de la estructura, también hubo una significativa mejora en el índice de modelo estructural, un indicador de la proporción de barras y placas, coincidiendo con una tendencia hacia la reversión de los cambios relacionados con la edad en el hueso. Curiosamente, los aumentos en el grosor trabecular han sido pequeños y no han logrado alcanzar significación estadística<sup>112,117-119,121,125</sup>; si esto refleja un aumento en número trabecular o

quizás un engrosamiento estratégico en la topografía de algunas trabéculas y adelgazamiento de las demás es incierto. Por último, aunque algunos estudios han demostrado un aumento de la superficie del hueso esponjoso y del volumen<sup>125-127</sup>, este hallazgo no ha sido universal<sup>112,118,119</sup>. La razón de la aparente discrepancia entre estos resultados y el gran aumento observado en la densidad mineral ósea vertebral sigue siendo desconocido, pero las posibles explicaciones estarían relacionadas con las diferencias según la localización en la respuesta a la PTH y la gran variabilidad en el medición del volumen óseo de cresta ilíaca, tanto por muestreo como por la variabilidad de las medidas<sup>128</sup>.

#### Efectos de la PTH en el hueso cortical

Los mínimos aumentos e incluso la disminución en la densidad mineral ósea en los sitios que contienen una gran proporción de hueso cortical contrastan fuertemente con los grandes aumentos observados en su mayor parte en localizaciones con hueso esponjoso como la columna vertebral<sup>21,69,129</sup>. Esto llevó inicialmente a la creencia de que los aumentos en la masa ósea trabecular podrían ocurrir a expensas de hueso cortical<sup>129,36</sup>, pero posteriores estudios indicaron que al menos en algunos sitios del esqueleto, se producen cambios beneficiosos en la arquitectura del hueso cortical y una reducción de las fracturas no vertebrales en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis<sup>21,36</sup>. Sin embargo, los efectos de la PTH en la masa y arquitectura del hueso cortical siguen estando mal definidos.

La interpretación de los cambios en la densidad mineral ósea en sitios corticales es compleja porque se ven afectados no sólo por alteraciones en la densidad volumétrica, sino también en grosor cortical, porosidad cortical y

tamaño de los huesos, que tienen efectos independientes y diferentes sobre la resistencia ósea. En el hueso de cresta ilíaca un aumento del grosor cortical ha sido un hallazgo consistente, pero no se ha demostrado un aumento significativo de la porosidad cortical<sup>118,119,125</sup>. Por lo menos una parte del incremento en el grosor cortical en esta localización puede ser explicada por el aumento en la formación de hueso endóstico y también hay cierta evidencia de formación de hueso nuevo en la superficie perióstica<sup>119</sup>.

En un estudio transversal, los índices de estructura cortical y fuerza en el extremo distal del radio fueron evaluados por tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT) en mujeres postmenopáusicas osteoporóticas que habían sido asignadas al azar a un tratamiento con placebo o con PTH (1-34) a dosis de 20 ó 40 µg / día<sup>130</sup>. En los grupos de tratamiento el área total y cortical, el contenido mineral óseo y la circunferencia perióstica fueron significativamente más altos que en el grupo placebo con mayores polares de inercia. Si bien estos datos son consistentes con los efectos beneficiosos de la PTH intermitente en esta localización, el diseño transversal del estudio limita las conclusiones que se pueden sacar.

En el cuello femoral, las mediciones volumétricas de la densidad mineral ósea indican un aumento en el volumen cortical en el cuello del fémur, aunque el área de densidad mineral ósea no cambió y la densidad mineral volumétrica disminuyó ligeramente después de un año de tratamiento con PTH (1-84)<sup>131</sup>. En conjunto, estos datos son coherentes con un aumento en el grosor cortical asociado con aumento de la porosidad cortical. Aunque el aumento de la porosidad cortical afecta negativamente a la resistencia ósea, los efectos beneficiosos de un incremento asociado en el grosor cortical puede anular este

efecto<sup>63</sup>, sobre todo si el aumento de la porosidad se produce predominantemente en la zona endocortical en lugar de en el hueso perióstico<sup>132,133</sup>. Además, el hallazgo en el estudio más largo realizado en hombres<sup>134</sup> de que el área de densidad mineral ósea en el fémur proximal aumentó durante el segundo año de tratamiento con PTH puede indicar que el incremento de la remodelación intracortical es un fenómeno precoz y transitorio. Utilizando el análisis de la estructura de la cadera, se constató un aumento del área de sección transversal del cuello del fémur en mujeres tratadas con teriparatida con efectos beneficiosos sobre los parámetros biomecánicos<sup>135</sup>. Debe tenerse en cuenta que el área de la sección transversal es una medida de la superficie ósea en la sección transversal, no del tamaño del hueso, de hecho, en este estudio se encontraron reducciones significativas en el diámetro perióstico en mujeres tratadas con teriparatida en comparación con el grupo placebo. Por otra parte, las hipótesis inherentes a esta metodología de nuevo limitan la fuerza de las conclusiones que se pueden elaborar<sup>136</sup>.

En general, por lo tanto, la evidencia actual indica que la PTH produce un aumento en el grosor cortical, al menos en algunos sitios del esqueleto. Este cambio inicialmente puede ir acompañado de un aumento de la porosidad cortical. La mayor formación ósea endocortical contribuye al aumento en el grosor cortical, pero se desconoce si ocurren cambios similares en el periostio. Los cambios en la cortical ósea son específicos de la localización y, en particular, pueden estar influenciados por las variaciones de carga en diferentes sitios. Así, el principal efecto negativo de la densidad mineral ósea en el radio distal y los cambios positivos en el fémur proximal sería explicable

con los efectos sinérgicos de carga mecánica y la PTH publicados en modelos animales<sup>137,138</sup>.

#### Efectos de la PTH en la matriz ósea proteica y sobre la mineralización

Aspectos como la composición y la estructura del hueso, distintos de la masa ósea y su arquitectura pueden afectar a la resistencia ósea incluyendo la mineralización de la matriz y la unión transversal de las fibras de colágeno. Los diferentes fármacos utilizados para tratamiento de la osteoporosis modifican de forma diferente estas propiedades. Así, el grado de mineralización y la distribución de los enlaces cruzados de las fibras de colágeno están estrechamente relacionados con el recambio óseo, produciéndose un aumento tanto en la homogeneidad como en el grado de mineralización de los huesos de los individuos tratados con bifosfonatos<sup>134,139,140</sup>. Mediante microscopio de barrido electrónico y de barrido con rayos X de bajo ángulo en biopsias de cresta ilíaca de mujeres antes y después del tratamiento con PTH (1-34), Misof y cols.<sup>141</sup> demostraron una tendencia a una menor densidad de mineralización y una mayor heterogeneidad, en consonancia con la formación de hueso nuevo, aunque sin cambios significativos en el colágeno ni en la estructura mineral.

Paschalis y cols.<sup>142</sup> estudiaron a 38 mujeres posmenopáusicas con osteoporosis que recibieron al azar placebo o teriparatida, con microscopía de transformación de infrarrojos de Fourier para determinar la mineralización de la matriz, la madurez de los cristales minerales y la proporción de enlaces cruzados divalentes en el hueso de cresta ilíaca. Se observaron efectos significativos del tratamiento en hueso esponjoso, endóstico y perióstico, con



una menor mineralización de la matriz y madurez de los cristales (de menor tamaño) y una tendencia hacia una mayor número de enlaces cruzados divalentes de colágeno en las mujeres que habían sido tratados con teriparatida. Si bien las consecuencias biomecánicas de estos cambios son actualmente poco claras, parece que indican un cambio hacia un perfil más joven del hueso y puede por tanto, contribuir al aumento de la resistencia ósea y reducir riesgo de fracturas asociadas con la terapia de hormona paratiroidea.

#### Implicaciones clínicas del efecto anabólico de la PTH

Las marcadas diferencias en el mecanismo de acción entre fármacos antirresortivos y PTH tienen potenciales, aunque todavía no demostradas, implicaciones terapéuticas. La capacidad de la PTH para estimular la remodelación ósea y el modelado sugiere que podría ser el tratamiento de elección en enfermedades con un bajo remodelado óseo, por ejemplo en la enfermedad ósea asociada al tratamiento a largo plazo con glucocorticoides<sup>143</sup> y en algunas formas de osteodistrofia renal<sup>144</sup>. Delmas<sup>145</sup> informó recientemente que PTH reducía el riesgo de fractura, independiente del recambio óseo, apoyando así su eficacia en la osteoporosis con bajo recambio óseo, pero se necesitan más estudios para establecer si PTH es superior a los fármacos antirresortivos en dichos pacientes. En segundo lugar, la evidencia de mejora de la microarquitectura ósea<sup>119,125</sup>, frente al mantenimiento de ésta<sup>123,124</sup>, tras la administración de PTH indica que puede ser más eficaz que los fármacos antirresortivos en individuos con grave osteoporosis en los que la microarquitectura ósea esté más deteriorada. Es de esperar que los elevados aumentos en la densidad mineral de la columna vertebral se traduzcan en una

mayor eficacia que los fármacos antirresortivos en la lucha contra la fractura en esta localización, aunque en ausencia estudios contrapuestos estudiando el riesgo de fractura esto no ha sido demostrado y, de hecho la magnitud de la reducción de la fractura vertebral después de 18 meses de terapia de teriparatida es similar a la observada después de un año en las mujeres tratadas con risedronato<sup>9</sup>. Finalmente, los efectos beneficiosos sobre el hueso cortical, puede resultar en una mayor eficacia en localizaciones no vertebrales, sin embargo, estos efectos pueden ser específicos del lugar y los efectos de la PTH sobre la estructura ósea en el fémur proximal y el riesgo de fractura de cadera están sin definir.

#### 1.5.- Indicaciones, contraindicaciones y monitorización:

En el año 2.002, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó en los Estados Unidos el uso del fragmento amino-terminal N-(1-34) de la hormona paratiroidea humana, sintetizado por técnicas de recombinación del ADN PTH1-34 (teriparatida), para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica y del varón. En 2.003, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprobó la teriparatida para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. Más recientemente, en los años 2.007 y 2.008, la EMA ha ampliado las indicaciones de uso de la teriparatida al tratamiento de la osteoporosis en el varón y de la osteoporosis inducida por glucocorticoides en ambos sexos<sup>146</sup>.

La introducción de la PTH en el arsenal terapéutico supuso un nuevo paradigma en el tratamiento de la osteoporosis pues, por primera vez, se disponía de un fármaco osteoanabolizante, capaz de aumentar la cantidad y calidad de hueso mediante la síntesis de nuevo tejido óseo. Los tratamientos

para la osteoporosis disponibles hasta ese momento (estrógenos, raloxifeno, bisfosfonatos y calcitonina), actúan fundamentalmente inhibiendo el remodelado óseo, reduciendo o deteniendo el deterioro de la calidad y la pérdida de masa ósea.

Con el uso inicial de un medicamento de estas características, se han generado interrogantes sobre su utilización en la práctica clínica habitual, fuera del contexto de los ensayos clínicos controlados. Al tratarse de un medicamento inyectable, sintetizado mediante técnicas de recombinación génica, con un mecanismo de acción totalmente nuevo, que se asoció a hallazgos preclínicos de seguridad importantes (tumores óseos malignos), y que ha sido aprobado por un tiempo de tratamiento limitado de 24 meses, su manejo clínico presenta singularidades –incluyendo una especial motivación por parte de los pacientes-, y un conocimiento profundo de la fisiopatología de la enfermedad metabólica ósea. En consecuencia, los principales aspectos de interés clínico y práctico son:

1. Identificación de los pacientes en los que el tratamiento con PTH podría estar indicado y en cuales no.
2. Monitorización de los pacientes en tratamiento con PTH.
3. Análisis de la influencia de los tratamientos previos con fármacos que inhiben el remodelado óseo sobre los efectos de PTH.

### Pacientes candidatos al tratamiento con PTH

Las indicaciones actualmente aprobadas por las autoridades reguladoras de la Unión Europea y de los Estados Unidos para el tratamiento con PTH(1-84) son las siguientes:

- Tratamiento de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas con alto riesgo de fracturas.

Además la teriparatida PTH (1-34) está indicada en:

- Tratamiento de osteoporosis secundaria a tratamiento mantenido con glucocorticoides en mujeres y varones con elevado riesgo de fractura.
- Tratamiento en varones con osteoporosis primaria o por hipogonadismo con elevado riesgo de fractura.

Aunque estas indicaciones dan una idea general del tipo de pacientes donde la utilización del fármaco ha recibido una aprobación “legal”, dejan a discreción del médico un amplio abanico de potenciales pacientes que, teóricamente, se beneficiarían del tratamiento. Teniendo en cuenta, además, que el precio de este fármaco es notablemente superior al de la terapia con fármacos anti-remodelado (AR) óseo (antirresortivos), diferentes Sociedades Científicas, Agencias de Evaluación Económica de Medicamentos, Comités de Expertos, etc. han desarrollado varias Guías del Uso Terapéutico de PTH<sup>147-151</sup>, que deparan conclusiones relativamente similares. Así, existe acuerdo en considerar que el tratamiento con hormona paratiroidea debería estar limitado a pacientes con osteoporosis que presentan un “alto riesgo de fractura”. El

umbral para definir el riesgo de fractura como “alto” plantea más problemas a los expertos pues, en definitiva, se trata de una decisión derivada de criterios economicistas de coste-efectividad. No obstante, podríamos considerar como de alto riesgo a los pacientes que han sufrido una fractura previa por fragilidad (traumatismo de baja energía), sujetos con muy baja masa ósea (se han sugerido índices T inferiores a -3.0 desviaciones estándar), especialmente si son mayores de 70 años y/o tienen factores de riesgo añadidos para sufrir fracturas. La introducción de las escalas de predicción de riesgo absoluto de fractura como el FRAX<sup>®</sup> en el ámbito internacional<sup>34</sup> o, más específicamente para mujeres españolas, el algoritmo del estudio ECOSAP<sup>®152</sup> ([www.ecosap.info](http://www.ecosap.info)), pueden ayudar al clínico, en casos individuales, a cuantificar el riesgo absoluto de fractura.

Los pacientes que durante el tratamiento con fármacos antirresortivos han sufrido una nueva fractura, o que presenten una importante reducción en la masa ósea (es decir, que exceda el cambio mínimo significativo de la densidad mineral ósea -DMO- en mediciones consecutivas tras un periodo de tiempo de seguimiento relevante: aproximadamente 2.8 veces el error de precisión del densitómetro), podrían considerarse candidatos al tratamiento con PTH, considerando que estos dos criterios podrían considerarse como indicativos de “fallo terapéutico”<sup>153</sup>. Otro grupo de pacientes que podría beneficiarse del tratamiento con PTH serían los sujetos que son incapaces de seguir las instrucciones para la toma de bisfosfonatos por vía oral, que no los toleran o muestran contraindicaciones para su uso (reflujo gastro-esofágico importante, patología de la motilidad esofágica, estenosis, etc.)<sup>118,154</sup>.

El tratamiento con PTH en sujetos con osteoporosis inducida por glucocorticoides merece una mención aparte pues las Guías terapéuticas no lo recogen, dada la reciente aprobación de esta nueva indicación en Europa. Dadas las características de la población de estudio incluida en el ensayo clínico de registro<sup>155</sup>, teriparatida debería utilizarse en sujetos expuestos a dosis relativamente altas de glucocorticoides sistémicos (5 mg diarios de prednisona o equivalente), por un periodo de tiempo superior a 3 meses, y que presenten un alto riesgo de fractura, bien por presentar una baja masa ósea o por tener antecedentes personales de fracturas por fragilidad<sup>156</sup>. Es decir, se trataría de una prevención secundaria de la osteoporosis inducida por glucocorticoides, no considerándose indicado en la prevención primaria en pacientes que inician tratamiento con glucocorticoides. Mención aparte merecen las mujeres premenopáusicas con osteoporosis inducida por glucocorticoides, donde el riesgo-beneficio es diferente al de mujeres posmenopáusicas. En este grupo de pacientes, la EMEA ha sido más concreta en definir la población que más puede beneficiarse del tratamiento, debiéndose considerar el tratamiento con teriparatida en los casos de alto riesgo de fractura definido por la existencia de una fractura previa, o una combinación de factores de riesgo como, por ejemplo: densidad mineral ósea baja (por ejemplo: índice  $T \leq -2$ ), tratamiento sostenido con glucocorticoides (por ejemplo: una dosis de 7.5 mg/día o superior por un mínimo de 6 meses), alta actividad de la enfermedad de base o niveles reducidos de estradiol<sup>157</sup>.

Pacientes que no deberían ser tratados con PTH

Existe un acuerdo en que los sujetos con osteopenia o con osteoporosis y bajo riesgo de fractura por fragilidad no son candidatos al tratamiento con PTH.

El fármaco está contraindicado en niños y adolescentes que no han completado el cierre de las fisis de crecimiento, por el potencial mayor riesgo de osteosarcoma a esta edad.

Otras contraindicaciones y precauciones para el uso de PTH son las siguientes:

- Hipersensibilidad a la PTH o alguno de sus excipientes.
- Embarazo y lactancia.
- Hipercalcemia previa.
- Insuficiencia renal severa.
- Enfermedades metabólicas óseas (incluyendo hiperparatiroidismo y enfermedad de Paget), exceptuando osteoporosis primaria.
- Elevaciones no justificadas de la fosfatasa alcalina.
- Radioterapia previa del esqueleto, incluyendo implantes radioactivos.
- Tumores malignos del esqueleto o enfermedad metastásica ósea.

En la actualidad sólo se han publicado dos estudios controlados sobre el efecto de la hormona paratiroidea en la consolidación de las fracturas, por lo que no debería utilizarse en esta situación fuera del contexto de ensayos clínicos controlados.

Es errónea la tendencia a usar la PTH como fármaco analgésico en tandas cortas de dos o tres meses; se debe usar para el tratamiento de la osteoporosis por el período de tiempo necesario para obtener su beneficio anti-fracturario (18 ó 24 meses), y sólo en este contexto se debe valorar la reducción del dolor, no como un efecto que siente indicación, si no como un fenómeno asociado al tratamiento de la osteoporosis.

#### Monitorización de los pacientes en tratamiento con PTH

Un aspecto que ha suscitado interés en los clínicos es la batería de pruebas que deberían realizarse antes de iniciar un tratamiento con PTH. Aunque no hay un acuerdo unánime al respecto, parece recomendable la determinación basal de la calcemia, fosfatasa alcalina total y de las pruebas de función renal, dado que la hipercalcemia, la elevación inexplicada de la fosfatasa alcalina y la insuficiencia renal severa son contraindicaciones para su uso. La determinación de la calciuria en orina de 24 horas no parece estrictamente necesaria, salvo en pacientes con antecedentes de nefrourolitiasis, donde se deben incluir además otras pruebas para explorar la naturaleza de la litiasis. Los resultados de los ensayos clínicos de fase III no sugieren que el tratamiento con PTH, asociado a suplementos de calcio y vitamina D, induzca un cambio significativo en la eliminación urinaria de calcio<sup>158</sup>. Por el contrario, dado que se ha reportado una incidencia de hiperuricemia en el 2.8% de las pacientes con osteoporosis posmenopáusica tratadas con teriparatida en el Fracture Prevention Trial<sup>157</sup>, y del 8% en los pacientes en el estudio de osteoporosis inducida por glucocorticoides<sup>155</sup>, la



determinación basal de ácido úrico puede resultar útil, sobre todo en pacientes con antecedentes de hiperuricemia y/o gota.

La determinación basal de 25-hidroxi-vitamina D (25-OH-vit D) y de hormona paratiroidea (PTH), aunque de interés, no es indispensable antes de instaurar un tratamiento con teriparatida. Datos recientes parecen indicar que la eficacia del tratamiento con teriparatida es independiente de los valores basales de 25-OH-vit D<sup>159</sup>, si bien este estudio no incluyó pacientes con valores de deficiencia severa (<10 ng/mL). Sin embargo, otros autores abogan por la determinación basal de ambas hormonas con el objetivo de descartar un hiperparatiroidismo secundario a la deficiencia severa de 25-OH-vit D, o un hiperparatiroidismo primario normocalcémico<sup>160</sup>. En el primer caso habría que corregirlo antes de plantearse el tratamiento, y en el segundo tratarlo según sea preciso, desde luego no introduciendo el fármaco.

Dados los efectos sobre el tejido óseo tras la administración intermitente de PTH, la monitorización de los pacientes que reciben este tratamiento tiene unos aspectos peculiares que lo diferencian de la monitorización de los tratamientos con fármacos antirresortivos (ARs) óseos.

En primer lugar, dado que los efectos del fármaco se producen primariamente a nivel de la función de los osteoblastos, los marcadores bioquímicos de elección para su monitorización deben ser los de formación ósea, y no los de resorción, en contraposición a la práctica habitual cuando se utilizan fármacos antirresortivos como los bisfosfonatos. En un estudio reciente donde se compararon varios marcadores bioquímicos de remodelado óseo, incluyendo deoxipiridinolina libre (DPD), telopéptido N-terminal (NTX), fosfatasa

alcalina específica ósea, péptido carboxiterminal del procolágeno tipo I (PICP) y el propéptido amino-terminal del colágeno tipo I (PINP), éste último, un marcador de formación ósea, mostró el más alto cociente señal/ruido tras el tratamiento con teriparatida<sup>161</sup>. El incremento en los niveles plasmáticos de PINP es muy rápido y marcado<sup>162</sup>, incluso en pacientes que han recibido tratamientos prolongados con bisfosfonatos, donde se puede observar una duplicación de sus valores basales tras sólo 1 mes de tratamiento con teriparatida<sup>163</sup>. Aunque los incrementos del PINP inducidos por teriparatida muestran una correlación positiva con el aumento de densidad mineral ósea<sup>162</sup> y los parámetros microestructurales del tejido óseo<sup>122</sup>, no se ha estudiado la relación entre el incremento de este o cualquier otro marcador bioquímico de formación ósea inducido por PTH y la reducción del riesgo de fractura, por lo que su uso en la práctica clínica habitual sigue siendo cuestionado<sup>118</sup>.

Es también de interés el reciente hallazgo de que la magnitud del incremento de los niveles de PINP es menor en los pacientes que reciben tratamiento prolongado con glucocorticoides, en comparación con los sujetos varones con osteoporosis o en las mujeres posmenopáusicas<sup>155</sup>, lo que podría reflejar el efecto de estos fármacos sobre la función osteoblástica.

En relación con la monitorización de la densidad mineral ósea con métodos densitométricos clásicos (DXA en dos dimensiones), es necesario hacer algunas consideraciones prácticas, en virtud del singular mecanismo de acción sobre hueso que exhibe la hormona paratiroidea administrada intermitentemente. Aunque los resultados de los ensayos clínicos de fase III han mostrado de un modo consistente un incremento rápido y notable de la

densidad mineral ósea en la columna lumbar (8-10%) y la cadera (3-4%) en comparación con la situación basal, tras 18 meses de tratamiento, hay que tener en cuenta que la gran mayoría de los pacientes incluidos en estos estudios no habían recibido ningún tipo de tratamiento previo para la osteoporosis, por lo que teriparatida ejercía su acción osteoanabolizante sobre un hueso “virgen” a los efectos sobre el remodelado óseo inducido por fármacos. En la práctica clínica habitual en Europa, esta situación es muy poco frecuente, dado que las Guías de Tratamiento más generalmente aceptadas señalan a teriparatida como un tratamiento de segunda o tercera línea. El efecto de teriparatida sobre la densidad mineral ósea en pacientes que han recibido tratamiento previo prolongado con fármacos ARs potentes, como los bisfosfonatos, presenta algunas peculiaridades. En general, no se considera necesaria la monitorización con DXA durante los primeros meses del tratamiento con teriparatida, y algunos autores defienden que la frecuencia de las mediciones seriadas sea incluso superior a los 12 meses.

Por último, no existe ninguna recomendación regulada sobre la monitorización de parámetros analíticos de seguridad en pacientes que reciben teriparatida. A diferencia de lo que ocurre con la molécula completa de PTH (1-84)<sup>164</sup>, donde se señala la advertencia de la necesidad de monitorización de la calcemia y/o la calciuria a los 1, 3 y 6 meses del inicio del tratamiento, las autoridades reguladoras europeas y americanas no han considerado necesaria tal precaución en pacientes tratados con teriparatida, dada la baja incidencia de hipercalcemia significativa. Finalmente, la utilidad de monitorización rutinaria de la uricemia en ausencia de hiperuricemia o de sintomatología clínica sugestiva de gota o nefrourolitiasis es, probablemente, muy limitada<sup>118</sup>.

Efecto de los tratamientos previos con fármacos anti-remodelado óseo sobre la respuesta terapéutica a PTH

Como se ha señalado con anterioridad, la experiencia indica que la mayoría de los pacientes que reciben PTH en Europa, han sido previamente tratados con diversos fármacos ARs por periodos de tiempo variables<sup>165-168</sup>. Es por tanto de interés práctico conocer si la respuesta al tratamiento con PTH va a ser similar a la de los pacientes que nunca han recibido tratamientos previos. Aunque el tratamiento previo con estrógenos o raloxifeno no parece influir en la respuesta a PTH en pacientes con osteoporosis, evaluada tanto por los cambios en los marcadores bioquímicos como por la densidad mineral ósea<sup>112,169,170</sup>, algunos autores han señalado que el tratamiento previo prolongado con alendronato, un amino-bisfosfonato muy potente, podría disminuir la eficacia del tratamiento con PTH, mitigando y retrasando la respuesta de los marcadores bioquímicos de formación ósea y la densidad mineral ósea en varones y mujeres posmenopáusicas<sup>170,134,139</sup>.

Este aspecto ha sido analizado en el estudio Eurofors, en el que 503 mujeres fueron tratadas con teriparatida durante 24 meses consecutivos, habiendo recibido tratamiento previo con ARs el 83,3% de las mismas<sup>168</sup>. El análisis de estas pacientes reveló que, a nivel de la columna lumbar, los incrementos en la DMO fueron discretamente inferiores en las pacientes que habían recibido tratamiento previo con AR (aproximadamente un 3% menos tras 24 meses de tratamiento), mientras que a nivel de la cadera total la diferencia a los 24 meses fue de un 1.5%. No se observaron diferencias

estadísticamente significativas entre los grupos a nivel del cuello femoral. Los datos de Eurofors confirmaron el hallazgo previo de Ettinger<sup>170</sup>, de que las pacientes sometidas a un tratamiento con AR durante periodos prolongados muestran una disminución temprana y transitoria de la DMO a nivel de la cadera, que revierte y supera los valores basales tras periodos más prolongados de tratamiento con teriparatida. De hecho, los valores de DMO a nivel de la cadera prácticamente se duplican entre los 18 y los 24 meses de tratamiento continuado con teriparatida en aquellas mujeres que recibieron tratamiento previo con AR. Esta disminución temprana de la DMO observada en este subgrupo de pacientes, puede explicarse por el mecanismo de acción de teriparatida a nivel del hueso cortical, donde se va a producir simultáneamente una aposición perióstica de tejido óseo de nueva formación con el consiguiente incremento del diámetro del hueso tubular<sup>112,130,171</sup>, junto con un incremento en la porosidad cortical (fundamentalmente a nivel del tercio interior del córtex) sobre la base de una matriz ósea altamente mineralizada debido al prolongado proceso de mineralización secundaria inducido por los fármacos ARs potentes<sup>130,172</sup>. Ambos procesos pueden producir una disminución temporal de la DMO cortical, especialmente al reemplazarse tejido óseo hipermineralizado por otro joven, recién sintetizado y aún no totalmente mineralizado<sup>141</sup>. El dato de que aproximadamente el 90% de las pacientes en Eurofors recibieron bisfosfonatos, junto con el hallazgo de que en las no pretratadas la DMO no disminuye con el tratamiento con teriparatida, apoyan esta hipótesis.

## **2.- CONSOLIDACIÓN DE LAS FRACTURAS:**

### **2.1.- Fisiología de la reparación de las fracturas**

Clásicamente se habla de dos tipos de consolidación de las fracturas:

- Consolidación primaria, que ocurre cuando se produce una consolidación “osteonal”, es decir, los osteoclastos crean túneles a través del hueso necrosado en los bordes de la fractura y también atraviesan el foco de fractura. Los osteoblastos recubren los nuevos túneles y depositan nuevas láminas alrededor de ellos para formar nuevas osteonas, restaurando la continuidad del hueso. Esta consolidación primaria de la cortical no es una verdadera regeneración ósea sino una forma de unir los extremos óseos a través de los procesos de remodelación. Este tipo de consolidación requiere una gran estabilidad mediante fijación interna e inmovilización rígida y en la práctica es el tipo menos frecuente.

- Consolidación secundaria, es la que se produce con mayor frecuencia y da lugar al callo de fractura. Este tipo de consolidación se ve favorecido por los micromovimientos. Como este modelo es el más frecuente, será el que utilizemos en nuestro modelo experimental. Consta de 5 fases:

#### **Fases de la consolidación secundaria:**

##### **1.- Impacto y formación del hematoma:**

En el momento del traumatismo el hueso absorbe energía y se rompe. La fractura produce la rotura de los vasos sanguíneos periósticos y medulares, formándose un hematoma y se liberan factores que promueven la

consolidación: factores quimiotácticos, mitogénicos e inductores de la diferenciación celular a tejido óseo<sup>13,15</sup>.

## 2.- Inflamación:

Esta fase se inicia en el momento de la fractura con la aparición del hematoma y persiste hasta que comienza la formación de un callo de tejido blando. El hueso se necrosa en los bordes de la fractura y aparecen leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos, los cuales segregan citoquinas e infiltran el coágulo y eliminan el hueso necrótico.

## 3.- Formación del callo blando:

El desarrollo del callo blando implica la formación precoz de un callo externo que recubre la fractura y la formación más tarde de un callo medular. Este callo blando es el soporte mecánico para la formación del callo óseo duro. El coágulo se organiza con fibras de colágeno y elementos vasculares. Proliferan células precursoras óseas, osteoblastos y condroblastos. El callo blando está compuesto por osteoide, cartílago y colágeno.

## 4.- Formación del callo duro:

En esta fase el cartílago se calcifica y proporciona la base para los osteoblastos y el posterior depósito y mineralización de la matriz ósea. El osteoide y el cartílago del callo blando externo, perióstico y medular se mineralizan, a medida que se transforman en hueso fibroso. Para preparar la calcificación de la matriz, los condrocitos segregan dos tipos de enzimas las fosfatasas y las proteasas.

## 5.- Remodelación:

Es la fase final y durante ella el abundante callo duro se remodela lentamente desde hueso fibroso inmaduro hasta hueso laminar maduro. La actividad osteoclástica y osteoblástica transforman el hueso fibroso en hueso laminar.

Hay que tener en cuenta, también, que el proceso de consolidación no es homogéneo a lo largo de todo el callo. Hay 4 grandes zonas: el canal medular, el área entre las corticales, la capa subperióstica y los tejidos blandos adyacentes. El canal medular y el área entre corticales crean “callo blando” y crean hueso mediante osificación endocondral, mientras que el área subperióstica y los tejidos blandos que rodean a la fractura forman “callo duro” y crean hueso mediante osificación intramembranosa.

## 2.2.- Efectos de la osteoporosis en la consolidación de las fracturas:

Varios estudios experimentales en animales indican que en la osteoporosis parece haber una disminución de la capacidad de consolidación de las fracturas óseas<sup>173-175</sup>.

Los trabajos experimentales muestran un 40% de reducción en el área del callo de fractura y un 23% de reducción de la densidad mineral ósea en la consolidación de fracturas en fémures de ratas ovariectomizadas. Los análisis histomorfométricos revelaron un retraso en la formación del callo y desarrollo pobre de hueso maduro. Además, también se realizaron ensayos mecánicos que demostraron una menor resistencia del callo óseo<sup>176</sup>. Otro estudio demuestra que la osteoporosis en ratones inducida mediante ovariectomía



también afecta a las propiedades mecánicas del callo de fractura, conduciendo a una disminución de la consolidación ósea<sup>177</sup>.

El retraso en la consolidación ósea también se ha estudiado en el modelo de ovejas ovariectomizadas<sup>251</sup>. En este estudio se encontraron diferencias significativas entre los animales osteoporóticos y los normales, en cuanto al área del callo, pero no en la densidad del mismo en las primeras etapas de la consolidación ósea en osteotomías del tercio medio de diáfisis tibiales. Al final del estudio se encontró lo opuesto, las diferencias en la densidad del callo fueron significativas, pero no el área, indicando que la osteoporosis afecta a la formación del callo en las primeras etapas de la consolidación ósea, y a la mineralización del callo en las últimas etapas de la consolidación. También se encontró una diferencia significativa (33%) entre la tibia osteotomizada y la contralateral intacta en los animales osteoporóticos, pero no se hallaron diferencias en las ovejas normales. Por lo tanto este estudio demuestra un retraso de la consolidación ósea en las tibias de las ovejas osteoporóticas con respecto a la formación del callo, mineralización y propiedades mecánicas.

Aunque estos estudios han demostrado una consolidación ósea alterada en animales osteoporóticos, esto es más difícil de demostrar en pacientes ancianos. Es un hecho que las fracturas consolidan con mayor dificultad conforme aumenta la edad del paciente. Varios estudios han demostrado que las fracturas distales de radio tratadas mediante reducción cerrada e inmovilización con yeso sufren un porcentaje mayor de desplazamiento secundario proporcional a la edad del paciente<sup>178</sup>. Otros autores estudian el

efecto de la osteoporosis en el tiempo de consolidación de fracturas de diáfisis femoral tratadas mediante un clavo intramedular y observan que las fracturas tardan más en consolidar en los pacientes mayores osteoporóticos<sup>179</sup>. Además, también se produce un aumento de fallos en la fijación de implantes en el hueso osteoporótico<sup>17</sup>. Esto se ha atribuido a la selección del implante no adecuada, al aumento de comorbilidades en estos pacientes y a que la capacidad de regeneración tisular está alterada en este grupo de edad avanzada<sup>17,180</sup>.

Existen varios factores que influyen en la dificultad de consolidación de las fracturas en pacientes osteoporóticos de edad avanzada:

1.- La disminución de la resistencia mecánica del hueso osteoporótico reduce la estabilidad inicial de la fractura dando lugar a mayores complicaciones incluyendo una consolidación de las fracturas más lenta<sup>181</sup>.

2.- Sabemos que para la consolidación de una fractura es necesario un adecuado flujo sanguíneo que transporte factores angiogénicos. Se ha podido observar que en la gente mayor la angiogénesis está alterada por los cambios en la cascada hemostática relacionados con la edad, por la disminución de la expresión de los factores de crecimiento y las alteraciones de las células endoteliales<sup>179</sup>. Además otros factores como la arterioesclerosis pueden comprometer la vascularización en el lugar de la fractura.

3.- También conocemos que hay factores en los niños que aumentan la consolidación de las fracturas como un periostio biológicamente más activo, la abundancia de células madres mesenquimales y la mayor aportación de

factores de crecimiento<sup>182</sup>. Estos factores están claramente disminuidos en pacientes de edad avanzada<sup>179</sup>.

4.- Se ha observado tanto en estudios experimentales como clínicos que en el hueso osteoporótico hay una respuesta disminuida en la actividad osteoblástica mediada por distintos factores de crecimiento y de diferenciación y otros factores sistémicos como citocinas y hormonas<sup>179</sup>.

5.- Recientes estudios han descrito diferencias cuantitativas y cualitativas de las células madres mesenquimales en los pacientes ancianos. Las células madres mesenquimales de mujeres postmenopáusicas osteoporóticas tienen un porcentaje menor de crecimiento y muestran una menor habilidad para diferenciarse en la línea celular osteogénica que las de las mujeres premenopáusicas<sup>183</sup>. Además se sabe que con la edad el número de células madre mesenquimales con potencial osteogénico disminuye y puede ser la causa de la reducción del número de osteoblastos en este tipo de pacientes.

### **3.- EFECTOS DE LA PTH EN LA CONSOLIDACIÓN DE LAS FRACTURAS:**

#### **3.1.- Estudios clínicos**

Sólo existen dos estudios clínicos publicados sobre el efecto de la Hormona Paratiroidea en la consolidación de las fracturas en humanos.

El primero, escrito por Aspenberg<sup>184</sup> se trata de un estudio prospectivo, randomizado a doble ciego, en el que valora a 102 mujeres postmenopáusicas que sufrieron una fractura osteoporótica de radio distal tratada de forma ortopédica. Realiza tres grupos, y tras la fractura instaura tratamiento con placebo, hormona PTH 1-34 a dosis de 20 y 40 µg/kg/día durante 8 semanas. Todos los pacientes recibieron adicionalmente calcio y vitamina D. Encontró una reducción significativa (de 9 a 7 semanas) en el tiempo de consolidación radiográfica (definido como unión en 3 de las 4 corticales en dos proyecciones radiográficas) en las pacientes tratadas con dosis bajas (20 µg/kg/día) de PTH comparado con placebo. Sin embargo la dosis de 40µg/kg/día no mostró diferencias con respecto a placebo ni a dosis baja de PTH. Tampoco encontró diferencias estadísticamente significativas en las deformidades anatómicas residuales ni en los resultados funcionales entre grupos. La falta de efecto de PTH a dosis de 40 µg/kg/día fue un hallazgo inesperado. Los autores lo atribuyen al efecto de la PTH de aumento de la resorción endocortical en el radio distal publicado por otros autores<sup>130</sup>. Además Neer<sup>21</sup> publicó que el tratamiento con PTH a dosis de 40 µg/kg/día, pero no de 20 µg/kg/día disminuyó la densidad cortical de la diáfisis del radio, debido a un aumento en la remodelación ósea, por lo que hipotetiza que el aumento del remodelado

ocasionado por dosis más altas de PTH podría dar lugar a callos mayores y mecánicamente funcionantes, pero menos visibles radiográficamente por aumento de la porosidad cortical.

Peichl<sup>185</sup> estudió el efecto de la Hormona Paratiroidea de cadena completa PTH 1-84 a dosis de 100 µg/kg/día en el tratamiento de 65 mujeres osteoporóticas que sufrieron una fractura de ramas pélvicas. Veintiuna pacientes se trataron con inyecciones de PTH 1-84, y 44 sirvieron como controles no tratados y no recibieron inyecciones. Se valoró a las pacientes radiográficamente mediante el estudio con Tomografía Computerizada cada 4 semanas hasta la curación y funcionalmente con una Escala Visual Analógica para el dolor y un test de funcionalidad. Encontró diferencias significativas para los tres parámetros a favor del grupo tratado con PTH con respecto al grupo control. Los resultados fueron sorprendentes: Todos los pacientes tratados con PTH se habían curado a las 8 semanas, pero sólo 4 de los controles. La consolidación completa se alcanzó a las 7,8 semanas en el grupo tratado, mientras que en el grupo control ocurrió a las 12,6 semanas. Por otra parte, en una Escala Visual Analógica para el dolor y un examen clínico llamado "levántate y anda", también fueron sorprendentes y hubo diferencias estadísticamente significativas, con pocas probabilidades de deberse enteramente a efecto placebo. El estudio se describe como un estudio prospectivo aleatorizado, ensayo controlado (nivel 2). Sin embargo, no hay mención de la aprobación ética, el estudio no aparece en el registro de ensayos clínicos, y los autores mencionan como una debilidad que "la información fue extraída después de que el estudio se terminara". Por otra parte, el proceso de asignación del tratamiento y el procedimiento de

cegamiento no se describe claramente. Los autores admitieron que cada segundo paciente que llegó a un hospital recibió la PTH, y para cada paciente control en ese hospital, se reclutó otro paciente control en otro hospital, donde no se dio ningún tratamiento de PTH. Debido a esta falta de asignación aleatoria formal, el estudio probablemente sería mejor describirlo como un estudio de casos y controles. Fueron los mismos médicos que trataron a los pacientes los que hicieron la revisión radiográfica, aunque se menciona algún tipo de cegamiento. A pesar de estas deficiencias, los resultados son espectaculares, y es difícil de creer que las diferencias entre los grupos son todas debido al sesgo. Algunas de las sombras en el artículo podrían haberse evitado en el proceso de edición.

Estos dos ensayos mantienen la esperanza de que la PTH pueda consolidarse como un poderosa herramienta para la aceleración de la curación de la fractura, pero se necesitan estudios mejor diseñados. El estudio sobre fracturas de pelvis tiene la ventaja de utilizar una variable funcional (prueba de levántate y anda) y un diseño simple y directo. Si los resultados pudieran ser reproducidos con doble ciego y la aleatorización adecuada, sería una gran noticia para los pacientes con futuras fracturas.

En la actualidad un equipo británico liderado por Chester<sup>186</sup> ha diseñado un ensayo clínico para valorar el efecto del tratamiento de Hormona Paratiroidea PTH 1-34 en pacientes que hayan sufrido una fractura pertrocantérea de cadera. Se trata de un ensayo abierto, prospectivo, aleatorizado, multicéntrico, comparativo con un grupo control. Los pacientes aleatoriamente se incluirán en uno de los dos grupos. Unos recibirán PTH 1-34

a dosis de 20 µg/kg/día durante 6 semanas y otros su medicación habitual. Los resultados funcionales serán evaluados a las 6 y 12 semanas mediante un análisis a ciegas para minimizar el efecto del sesgo, mediante test validados (SPPB, SF-36, EQ-5D y la Escala Visual Analógica (EVA) para el dolor. Los resultados serán publicados a la comunidad médica cuando estén disponibles.

### 3.2.- Estudios experimentales

Existen diversos estudios experimentales en animales para observar la influencia de la Hormona Paratiroidea en la consolidación ósea. La mayoría de ellos se realizaron en animales pequeños, y con diferentes modelos desde osteotomías diafisarias o metafisarias, artrodesis espinal o agarre de implantes óseos, y con diferentes subunidades de la hormona. En la tabla siguiente se resumen los principales datos de dichos estudios, especificando la hormona utilizada, su dosis y frecuencia de administración, el animal utilizado y si éste tenía alguna característica que dificultase la consolidación, el modelo de fractura en su caso y tipo de osteosíntesis, tiempo en el que se sacrificaron los animales y las pruebas utilizadas como medición de resultados.

**Tabla 1: Principales estudios sobre PTH en la consolidación de fracturas.**

AUTOR (año)	HORMONA	DOSIS	ANIMAL	FRACTURA OSTEOSÍNTESIS	TIEMPO	MEDICION
Kim (1999)	1-84	15 µg/kg/día 150 µg/kg/día	Ratas ovariectomizadas	Diáfisis tibial Aguja IM	30 días	Morfométricos Biomecánicos
Andreassen (1999)	1-34	60 µg/kg/día 200 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis tibial Aguja IM	20 30 días	Rx, Densitometría Morfométricos Biomecánicos
Bostrom (2000)	PTH(RS-66271)	10 µg/kg/día	Conejos con prednisona	Cúbito defecto 1mm No fijación	6 semanas 10 semanas	Rx, Densitometría Biomecánicos
Holzer (1999)	1-34	80 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis femoral Aguja IM	21 días	Rx, Densitometría Biomecánicos Histología
Nakajima (2002)	1-34	10 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis femoral Aguja IM	28 días 42 días	Rx, Densitometría Biomecánicos Histología, Molecular
Seebach (2004)	1-34	60 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis femoral Fijador externo Distracción	37 días 57 días	Densitometría Morfometría Biomecánicos Histología
Andreassen (2001)	1-34	200 µg/kg/día	Ratas viejas	Diáfisis tibial Aguja IM	3 sem 8 sem	Densitometría Morfometría Biomecánicos
Andreassen (2004)	1-34 1-31 Monocyclic 1-31	60 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis tibial Aguja IM	8 sem 16 sem	Densitometría Morfometría Biomecánicos
Alkhiary (2005)	1-34	5 µg/kg/día 30 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis femoral Aguja IM	21 días 35 días 84 días	Rx, MicroQCT Morfometría Biomecánicos. Histología
Komatsubara (2005)	1-34	10 µg/kg 3d/sem 30 µg/kg 3d/sem	Ratas	Diáfisis femoral Aguja IM	3 sem 6 sem 12 sem	Rx, MicroQCT Morfometría Biomecánicos Histología
Nakazawa (2005)	1-34	10 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis femoral Aguja IM	2, 4, 7, 14, 21 y 28 días	Histología Molecular
Manabe (2007)	1-34	0,75 µg/kg 2d/sem 7,5 µg/kg 2d/sem	Monas adultas	Diáfisis femoral Placa atornillada	26 sem	Rx, Densitometría Morfometría Biomecánicos Histología
Kakar (2007)	1-34	30 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis femoral Aguja IM	2, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 días	Rx, MicroQCT Morfometría Histología Molecular y Bioquímico
Gardner (2007)	1-34	30 µg/kg/día	Ratones	Diáfisis tibial Aguja IM	18 días	MicroQCT Biomecánicos Histología
Tsiridis (2007)	1-34	10 µg/kg/día 40 µg/kg/día	Conejos	Metáfisis distal tibia Fijador externo	28 días	MicroQCT Biomecánicos Histología
Nozaka (2008)	1-34	100 µg/kg/día	Ratas ovariectomizadas	Defecto metáfisis tibial Cerclaje alambre	4 sem	Rx Morfometría Histología
Komatsu (2009)	1-38	3 µg/kg/día 10 µg/kg/día 30 µg/kg/día	Ratas ovariectomizadas	Defecto diáfisis femoral No osteosíntesis	5 sem	QCT Morfometría Biomecánicos Histología Marcadores suero
Aleksyniene (2009)	1-34	25 µg/kg/día	Conejos	Diáfisis tibial Fijador externo Distracción	5 sem	Densitometría Morfometría Biomecánicos
Abe (2007)	1-34	40 µg/kg 5d/sem	Ratas	Artrodesis espinal Autoinjerto cresta ilíaca	14 días 28 días 42 días	Rx, MicroQCT Morfométricos Biomecánicos Histología Molecular
Hashimoto (2007)	1-34 Zolendronato	10 µg/kg/día 100 µg/kg/día	Ratas	Injerto vascularizado de tibia. Aguja IM	4 sem	Rx Densitometría Marcadores bioquímicos Biomecánicos
Skripitz (2000)	1-34	60 µg/kg/día	Ratas	Cámara ósea	2,4,6 sem	Densitometría Morfometría Histología
Skripitz (2001)	1-34	60 µg/kg/día	Ratas	Implante óseo	4 sem	Biomecánicos
Skripitz (2005)	1-34	60 µg/kg/día	Ratas	Implante óseo	2 y 4 sem	Densitometría Histología
Gabet (2006)	1-34	5 µg/kg/día 25 µg/kg/día 75 µg/kg/día	Ratas ovariectomizadas	Implante óseo	8 sem	Morfométricos Biomecánicos.



La primera pregunta que debemos realizarnos es si la PTH es capaz de influir en el proceso de consolidación bajo circunstancias normales, sin ningún otro factor que pueda modificarlo. Los efectos de la PTH en la curación ósea han sido investigados en numerosos estudios experimentales en animales con una consolidación normal.

Uno de los primeros fue Andreassen<sup>61</sup> que compara en ratas el efecto de dos diferentes dosis (60 y 200  $\mu$ /kg/día) de PTH 1-34 con placebo tras realizar una fractura diafisaria de tibia y osteosintetizada con una aguja intramedular y lo analiza a los 20 y 40 días tras la fractura. Realiza estudio radiográfico morfométrico y biomecánico (destrutivo de flexión a 3 puntos) y densitométrico del callo de fractura.

Encuentra que la dosis de 200  $\mu$ /kg/día de PTH 1-34 aumentó de forma significativa los valores de resistencia y el volumen externo del callo de fractura tras 20 y 40 días de tratamiento, con respecto a placebo.

La dosis de 60  $\mu$ /kg/día de PTH 1-34 sólo lo hizo de forma significativa tras 40 días de tratamiento con respecto a placebo.

El contenido mineral óseo del callo de fractura aumentó significativamente en ambos períodos y con ambas dosis, siendo además dosis-dependiente. En la tibia contralateral intacta ambas dosis aumentaron el contenido mineral óseo y la densidad mineral ósea de forma dosis y tiempo dependiente.

En un estudio posterior Andreassen<sup>187</sup> compara el efecto de tres análogos de PTH (PTH 1-34; PTH 1-31 y monocyclic PTH 1-31) a dosis de 60

µg/kg/día con placebo en la consolidación de una fractura tibial osteosintetizada con aguja intramedular en ratas adultas. Las fracturas fueron analizadas tras 8 y 16 semanas. Realiza 7 grupos:

- Sacrificadas a las 8 semanas tratadas con: 1) Placebo, 2) PTH 1-34, 3) PTH 1-31, 4) Monocyclic PTH 1-31.

- Sacrificadas a las 16 semanas tratadas con: 5) Placebo, 6) PTH 1-34, 7) Monocyclic PTH 1-31.

Todos los animales fueron tratados sólo durante las primeras 8 semanas, dejando a los grupos que se sacrificaron a las 16 semanas sin tratar durante las últimas 6 semanas. Se realizaron estudios morfométricos, biomecánicos de flexión a tres puntos destructivos, y densitométricos del callo de fractura.

En el grupo de 8 semanas, se observó en los animales tratados con PTH (sin existir diferencia entre los tres tipos de hormona) un aumento del 66% en la resistencia máxima, del 58% en la rigidez máxima, y del 28% del volumen del callo y del 42% del contenido mineral óseo del callo con respecto a placebo. Al normalizar los resultados con el volumen del callo, no se observan diferencias en la calidad mecánica del callo óseo.

Tras 16 semanas, no existieron diferencias entre los grupos tratados y el grupo control en rigidez, volumen del callo ni calidad del callo, ni el contenido mineral óseo.

Desde las 8 hasta las 16 semanas, en animales tratados con PTH, la fuerza del callo y sus cualidades mecánicas continuaron aumentando, y el volumen disminuyó debido a la maduración y remodelado de éste.

Los autores concluyen que el tratamiento con PTH mejora la fuerza mecánica del callo de fractura debido al aumento en las dimensiones del callo y a su contenido mineral óseo. Además, desde la 8ª a la 16ª semana el remodelado de ese callo no se ve influenciado por el tratamiento previo con PTH.

Alkhiary<sup>188</sup> y sus colaboradores estudiaron el efecto del tratamiento de PTH 1-34 en ratas tras realizarle una osteotomía femoral y sintetizarla con aguja intramedular. Para ello realizaron 3 grupos, a los que trataron con inyecciones diarias de 5 ó 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  de PTH 1-34 o placebo (control), durante un máximo de 35 días.

Estos grupos fueron subdivididos en 3 subgrupos de animales, que fueron sacrificados a los 21, 35 u 84 días. Se realizaron estudios biomecánicos de torsión, análisis histomorfométrico y tomografía computerizada microcuantitativa.

En el análisis radiográfico cualitativo, a los 21 días de tratamiento, sólo los animales tratados a dosis de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  mostraron un puente óseo sobre la fractura y la radioopacidad se incrementó con respecto al grupo control. A los 35 días ambos grupos tratados con PTH habían mejorado la radioopacidad y el callo medular.

En el análisis radiográfico microcuantitativo mediante tomografía computerizada, a los 21 días, el contenido mineral óseo y la densidad de los callos de animales tratados a dosis de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  PTH 1-34 se incrementaron significativamente con respecto al grupo control.

A los 35 días de tratamiento, el contenido mineral óseo y la densidad de los callos aumentó significativamente en ambas dosis de tratamiento con PTH (5 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) con respecto al grupo control. A los 84 días de curación sólo se mantuvieron elevados significativamente ambos parámetros en los animales tratados a dosis más alta de PTH (30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ).

En el análisis biomecánico, en el grupo tratado con PTH a dosis de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  con respecto al grupo control, la rigidez fue significativamente mayor a los 21 días, y el par torsor máximo fue significativamente mayor a los 21, 35 y 84 días.

No existieron diferencias biomecánicas de ningún tipo a dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ .

En el análisis histológico e histomorfométrico, no existieron diferencias en el volumen de los callos. El porcentaje de cartílago del callo se incrementó significativamente a los 21 días para los animales tratados a dosis de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  con respecto a los controles y en ambos grupos (5 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) a los 35 días de curación, no existiendo diferencias en ningún grupo a los 84 días.

Respecto al porcentaje de tejido óseo, fue significativamente mayor con ambas dosis de PTH sólo a los 35 días de evolución. En cuanto a la cantidad de espacio vacío en el callo, se observó una disminución significativa con respecto al grupo control con ambas dosis de PTH a los 35 días de tratamiento.

No existieron diferencias en cuanto a la cantidad de osteoclastos con cualquier dosis y en ningún período de evolución, lo que sugiere según los autores que la administración de esta droga acelera la consolidación ósea aumentando el

remodelado del cartílago y la formación ósea, pero sin aumentar la resorción ósea.

Esto indica que la rigidez es una propiedad que se adquiere precozmente, y la resistencia máxima se alcanza posteriormente. La falta de efecto en las pruebas biomecánicas con la dosis más baja (5  $\mu$ /kg/día) podría indicar que esta dosis no fuera suficiente para mejorar la consolidación en este animal, sin embargo el aumento en el contenido y densidad mineral ósea a los 35 días con esta dosis demuestra que mejoró el desarrollo del callo. El aumento del volumen de cartílago en el callo a los 21 días a 30  $\mu$ g/kg/día sugiere un efecto precoz de la PTH de la proliferación de los condrocitos en el período de consolidación. La disminución posterior del volumen de cartílago a los 35 días con ambas dosis sugiere una aceleración de la osificación endocondral, que junto con la disminución de espacios vacíos en el callo a los 35 días con ambas dosis sugiere una aceleración del proceso de consolidación.

Otro aspecto importante de este estudio es que no se observó un aumento en el diámetro del callo ni en la densidad de osteoclastos, lo que sugiere que el efecto de la PTH fue mejorar la calidad del callo, ya que aumentaron las propiedades mecánicas y estructurales sin un incremento en el área del callo.

Holzer<sup>56</sup> investigó el efecto en ratas de la administración de PTH 1-34 a dosis de 80  $\mu$ g/kg/día tras provocarles una fractura femoral y osteosintetizarla con una aguja intramedular, sacrificando a los animales a los 21 días de la fractura.

Realizó estudios biomecánicos mediante ensayos de torsión que mostraron un aumento significativo de la resistencia del callo de fractura pero no un incremento de la rigidez del mismo en los animales tratados con PTH comparados con el grupo control. El estudio densitométrico mediante DEXA y la tomografía computerizada cuantitativa periférica confirmaron el incremento de densidad ósea de los callos tratados con PTH comparados con control, pero sus valores no llegaron a alcanzar significación estadística. En el estudio histológico, los callos tratados con PTH mostraron una mayor osificación central que el grupo control.

Nakajima<sup>189</sup> estudia el efecto en ratas adultas de la administración de PTH 1-34 a dosis bajas (10 µg/kg/día) tras realizarle una fractura femoral y tratarla con aguja intramedular y para el estudio radiográfico, biomecánico y densitométrico a los 28 y 42 días de la fractura, y el estudio histológico y molecular del callo de fractura a los 2, 4, 7, 14 y 21 días postoperatorios.

La consolidación radiográfica se aceleró en el grupo tratado con PTH 1-34 con callos más maduros en todas las fases (días 7-14-28-42) con respecto al grupo control.

En el estudio biomecánico los valores de resistencia de los callos de animales tratados con PTH 1-34 se incrementó significativamente con respecto al grupo control un 61% a los 28 días y un 119% a los 42 días.

El estudio densitométrico de los callos tratados con PTH 1-34 mostró un aumento significativo del contenido mineral óseo del 46% a los 28 días y del

74% a los 42 días, y de la densidad mineral ósea del 32% a los 28 días y del 55% a los 42 días.

En el estudio molecular observaron que el tratamiento con PTH 1-34 favorece la formación del callo mediante la estimulación temprana de la proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras, incrementa la producción de proteínas de la matriz ósea y estimula la osteoclastogénesis durante la fase de remodelado del callo.

Los autores concluyen que el tratamiento intermitente con dosis bajas de PTH (1-34) podría resultar una estrategia efectiva para mejorar la consolidación ósea.

Komatsubara<sup>190</sup> en su artículo estudia en ratas el efecto en el callo de una fractura femoral tratada con fijación intramedular de dos dosis de PTH 1-34 (10 y 30 µg/kg/día) cuando se daba durante 3 semanas antes y se interrumpía tras la osteotomía, o se pautaba antes y después de la osteotomía manteniéndose el tratamiento hasta el sacrificio, y comparándolos con un grupo control. El sacrificio se realizó a las 3, 6 y 12 semanas tras la fractura.

Se realizaron estudios radiográficos, de tomografía computerizada periférica cualitativa, ensayos mecánicos de flexión a 3 puntos y análisis histológico e histomorfométricos.

A las 3 semanas la línea de fractura era visible en todos los grupos; a las 6 semanas la línea de fractura todavía se observaba en casi todos los fémures. A

las 12 semanas, la fractura no era visible en ningún grupo. No se observaron diferencias entre grupos.

La densidad mineral ósea del callo de fractura calculada con la tomografía computerizada cuantitativa periférica aumentó significativamente a las 12 semanas tras la fractura en los grupos de tratamiento de 30  $\mu\text{g}$  previa y 10 y 30  $\mu\text{g}$  previa y posterior a la fractura. No existieron diferencias entre grupos con respecto al área transversal del callo.

En los ensayos biomecánicos, la resistencia máxima, rigidez, y la energía absorbida (tenacidad) no variaron significativamente entre grupos a las 3 y 6 semanas; sin embargo a las 12 semanas tras la fractura la resistencia máxima en el grupo tratado con 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  antes y después de la fractura fue significativamente mayor que en el grupo control.

Las propiedades materiales intrínsecas como la tensión máxima, módulo elástico y dureza no variaron significativamente entre los distintos grupos.

En el estudio histológico se observó que el área total del callo no varió entre grupos, pero el porcentaje de tejido óseo de dicha área aumentó en los grupos tratados con PTH, así como el porcentaje de tejido lamelar de dicho callo, el ratio de formación ósea/área unitaria de callo y el número de osteoclastos.

Los autores concluyen que el tratamiento con PTH incrementa la resistencia mecánica del callo de fractura acelerando el remodelado de hueso inmaduro a hueso lamelar y acelerando la formación de nuevo hueso cortical sin aumentar el tamaño del callo, lo que significa que el tratamiento con PTH acelera el proceso natural de consolidación y que la resistencia mecánica del hueso



remodelado fue significativamente mayor a las 12 semanas en los animales tratados con PTH 30 µg/kg/día. También demuestran que el tratamiento previo con PTH no dificulta en el proceso de la consolidación de la fractura.

Nakazawa<sup>191</sup> estudia el efecto de la administración de PTH 1-34 en la condrogénesis (formación del callo blando) durante la consolidación ósea. Para ello, tras realizar una osteotomía femoral en ratas y realizar una fijación intramedular, compara un grupo control con otro al que se le administra 10 µg/kg/día de PTH 1-34, sacrificando a los animales en los días 2, 4, 7, 14, 21, y 28 para realizar un estudio histológico y molecular del callo de fractura. Los callos tratados con PTH presentaron un mayor callo blando que el grupo control, que fue más evidente el día 14 tras la fractura, debido a un aumento de 1,4 veces en el área cartilaginosa en esa fecha, igualándose esas diferencias en fechas posteriores (días 21 y 28). En la etapa precoz de la condrogénesis (días 4-7) se produjo un incremento de las células mesenquimales condroprogenitoras, pero no de los condrocitos en los animales tratados con PTH. A los 14 días no encontraron diferencias entre grupos en cuanto a diferenciación celular ni niveles de expresión relacionados con la diferenciación cartilaginosa. Estos resultados sugieren que el tratamiento intermitente con bajas dosis de PTH 1-34 induce un callo cartilaginoso mayor, pero no retrasa la diferenciación de los condrocitos durante la consolidación ósea.

Kakar<sup>192</sup> trata de demostrar los mecanismos a través de los cuales el tratamiento con PTH 1-34 mejora la consolidación en ratas tras realizar una fractura femoral y osteosintetizarla con aguja intramedular.

Para ello realiza dos grupos de animales y los trata con placebo o con PTH 1-34 a dosis de 30 µg/kg/día durante 14 días tras la fractura. Sacrifica a los animales en los días 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28 y analiza el callo mediante radiografía e histomorfometría y además realiza análisis molecular y bioquímico.

El análisis cuantitativo con µCT mostró que el tratamiento con PTH producía unos callos con mayor área transversal, mayor longitud y mayor volumen total, comparado con el grupo control.

El análisis molecular de la expresión génica de la matriz extracelular asociada a la condrogénesis y a la osteogénesis demostró que las fracturas tratadas con PTH tuvieron un aumento 3 veces mayor de la condrogénesis con respecto a la osteogénesis en el transcurso del proceso de reparación. Además, la hipertrofia de condrocitos se produjo precozmente en los callos tratados con PTH.

Estos resultados demuestran que la mejora de la consolidación debido al tratamiento con PTH se asocia principalmente con un aumento de la reclutación de los condrocitos y la maduración precoz en el callo de fractura.

Gardner<sup>193</sup> estudió el efecto sinérgico de la PTH y la carga en la consolidación de las fracturas en ratones, a los que les realizaba una osteotomía tibial que fijaba con una aguja intramedular, y posteriormente los

dividió en 4 grupos, a los que trató con aplicación de cargas mecánicas diarias, PTH 1-34 (30 µg/kg/día), carga mecánica diaria + PTH a la misma dosis, y grupo control; sacrificando a los animales a los 18 días tras la fractura para realizar estudios histológicos, microtomografía computerizada y ensayos biomecánicos de flexión a cuatro puntos. El grupo tratado con carga + PTH incrementó la actividad osteoblástica y osteoclástica y fue el único grupo que formó callos más grandes, con mayor densidad y mayor porcentaje de volumen óseo. El grupo tratado sólo con PTH formó más osteoide en el callo que el grupo control, indicando un aumento precoz de la actividad osteoblástica. Este grupo mostró un mayor contenido mineral óseo y volumen de hueso comparado con el grupo control. El grupo tratado exclusivamente con carga tuvo una mayor actividad osteoclástica que el grupo control. Estos hechos apoyan la actividad sinérgica de la PTH y la carga en la consolidación de las fracturas. El estudio biomecánico de flexión a cuatro puntos no encontró diferencias significativas en la resistencia ni en la rigidez del callo entre los grupos estudiados.

La mayor parte de los estudios sobre el efecto de la PTH se han realizado en ratas, pero el proceso de remodelación en roedores no es similar al que se produce en humanos. Muy pocos son los estudios realizados en especies más cercanas a la fisiología ósea humana. Manabe<sup>194</sup> es el primero que estudia el efecto de la hormona paratiroidea (PTH 1-34) en la consolidación de fracturas en animales grandes (monos) con un sistema de

remodelado Haversiano. Para ello, compara dos dosis de PTH 1-34 0,75 µg/kg/día y 7,5 µg/kg/día inyectados subcutáneamente dos veces por semana y un grupo control, tras realizar una osteotomía femoral y fijarla con una placa en monas cynomolgus adultas, y sacrificarlas a las 26 semanas tras la fractura.

El estudio radiográfico mostró una unión completa en todos los grupos, independientemente del tratamiento.

En los estudios biomecánicos de flexión a 3 puntos, la tensión máxima y el módulo elástico del fémur fracturado fue significativamente mayor en el grupo tratado con una elevada dosis de PTH que en el grupo control.

El área total del callo y el porcentaje óseo de dicha área fue significativamente menor en ambos grupos de tratamiento con PTH que con el grupo control. El número de osteoclastos fue menor con ambas dosis de PTH que en el grupo control. La porosidad del callo disminuye con el tratamiento de PTH de forma dosis-dependiente. La densidad mineral ósea del callo fue significativamente mayor en el grupo de dosis alta de PTH que en el control.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con PTH disminuye el tamaño del callo y acelera la maduración de éste, aumentando el grado de mineralización del callo de fractura, restaurando así las propiedades intrínsecas tras una osteotomía diafisaria de fémur en monos cynomolgus, aunque no existieron diferencias entre grupos para los parámetros estructurales (resistencia máxima, rigidez y tenacidad).

Todos los estudios anteriormente citados utilizan un modelo de fractura diafisaria, pero las fracturas diafisarias y metafisarias consolidan de forma diferente, y la PTH podría interactuar de manera distinta en esos dos tipos de fracturas.

Tsiridis<sup>195</sup> comparó el efecto sistémico de la PTH con el efecto local de la OP-1 en la consolidación de una osteotomía cuneiforme metafisaria en tibia distal de conejos sintetizada con un fijador externo. Realiza 5 grupos: control (sin tratamiento) y en los otros 4 grupos rellena el defecto con fosfato tricálcico. De los cuatro grupos con fosfato tricálcico, en uno lo mezcla con OP-1, en otros dos recibieron inyecciones diarias subcutáneas de PTH 1-34 a dosis de 10 y 40 µg/kg/día respectivamente y el cuarto sólo con fosfato tricálcico. Tras sacrificar a los animales a los 28 días, realizó tomografía computerizada cuantitativa periférica, histología y estudios biomecánicos de compresión axial y torsión. Observó que la OP-1 estimuló la formación ósea localmente y ambas dosis de PTH aceleraron la consolidación sistémicamente comparado con el grupo control y con el fosfato tricálcico aislado. Todos los grupos habían consolidado a las 4 semanas, lo que indicó que el defecto no era crítico. Las tibias tratadas con bajas dosis de PTH mostraron mayor cantidad de contenido mineral óseo y área de sección transversal que los otros cuatro grupos. No existieron diferencias entre grupos en la densidad mineral ósea ni en los momentos de inercia. En los ensayos biomecánicos sólo el grupo OP-1+TCP alcanzó significativamente un par máximo mayor que el grupo control. En el estudio histológico, la presencia de hueso nuevo fue evidente en el grupo OP-1+TCP, y en menor medida en el de bajas dosis de PTH, y estos grupos un tejido óseo mucho mejor organizado en el defecto que el resto de los grupos.

No existieron diferencias entre ambas dosis de PTH en ningún parámetro observado.

La mayor parte de los estudios sobre los efectos de la PTH se han realizado utilizando animales jóvenes, donde podemos esperar un proceso de consolidación normal. Sin embargo, en humanos, el mayor número de problemas se producen en pacientes con factores de riesgo. Son numerosos los procesos que pueden retrasar la consolidación o conducir a una pseudoartrosis. Entre ellos se encuentran la edad avanzada, condiciones que incrementan la pérdida de masa ósea, como la menopausia, el tratamiento corticoideo, la malnutrición, el tabaquismo o el abuso de alcohol. Así sería de gran importancia el evaluar el efecto de la PTH en modelos con una consolidación ósea alterada. Sin embargo son pocos los estudios que se han realizado en condiciones donde la consolidación teóricamente está alterada.

Kim<sup>196</sup> estudia el efecto de dos dosis de PTH (1-84) 15 y 150  $\mu$ /kg/día en fracturas tibiales de ratas ovariectomizadas, estabilizadas con una aguja intramedular.

Realiza 5 grupos: ratas no ovariectomizadas(1), ovariectomizadas a las que se le suministra suero salino(2), 17 estradiol(3), PTH (1-84) a dosis 15 $\mu$ /kg/día(4), y 150 $\mu$ /kg/día(5).

Estudia los callos de fractura a los 30 días mediante análisis morfométrico y mecánico mediante test de flexión a 3 puntos.

Los animales no ovariectomizados presentaron un callo pequeño, formado por una red de hueso trabecular. Las ratas ovariectomizadas sin tratar o tratadas con 17 estradiol presentaron un callo con mucho menos tejido esponjoso y con mucha más cantidad de médula fibrosa y cartílago.

Los animales tratados con PTH (1-84) mostraron callos más grandes, con mayor porcentaje de volumen de hueso trabecular y del volumen total de hueso trabecular en el área del callo, comparable a las ratas no ovariectomizadas.

En los ensayos mecánicos, la administración de PTH incrementó la resistencia máxima a flexión, la absorción de energía y la rigidez con respecto a las tratadas con placebo o 17-estradiol.

El autor concluye que la PTH aumenta la cantidad de tejido óseo trabecular en el callo, lo que aumenta su volumen, pero con un aumento de la porosidad comparado con las ratas no ovariectomizadas. Faltaría comparar un grupo de ratas no ovariectomizadas tratadas con PTH.

Bostrom<sup>197</sup> estudia el efecto de la administración intermitente del RS-66271 (un análogo de la PTHr P(1-34)) en conejos con capacidad disminuida de consolidación de las fracturas debido a tratamiento corticoideo crónico.

Para ello utiliza conejos adultos, a los que comienza a administrar prednisona (0,15 mg/kg/día) dos meses antes de la cirugía y continúa hasta el sacrificio. Realiza una osteotomía en cúbito dejando un defecto no crítico de 1 mm, y no realiza osteosíntesis, pues el radio actúa como fijador interno.

El estudio se compone de dos partes: en la primera 10 animales (5 controles y 5 tratados) se sacrificaron a las 6 semanas para el estudio biomecánico del callo de fractura, mediante torsión, hasta su destrucción; la segunda parte 20 animales (10 placebo y 10 tratados) fue diseñada para analizar la evolución de la consolidación. Estos animales fueron sacrificados cuando se alcanzó la consolidación, o en su defecto a las 10 semanas.

Nueve de los 10 animales tratados con PTHrP consolidaron a las 6 semanas, mientras que sólo 2 de los 10 del grupo control lo hicieron. A las 6 semanas, los animales tratados mostraron mayor intensidad radiográfica en el lugar de la osteotomía que los animales control; la intensidad radiográfica del callo externo fue mayor, y el área del callo de fractura, y la intensidad radiográfica de las zonas adyacentes a la osteotomía. El análisis densitométrico no mostró diferencias estadísticamente significativas.

El estudio biomecánico a las 6 semanas mostró una mejoría significativa de la rigidez, la resistencia máxima a torsión y el índice fracturario en el caso de los animales tratados, respecto al grupo control.

En la segunda parte del estudio, los 10 animales tratados con PTHr P habían logrado la consolidación de la fractura a las 6 semanas y fueron sacrificados en esa fecha. Del grupo control, ningún animal había consolidado a las 6 semanas, dos lo hicieron a las 8 semanas y fueron sacrificados y los ocho restantes no habían logrado consolidar a las 10 semanas y fueron sacrificados en ese tiempo, mostrando una pseudoartrosis atrófica.

A las 4 semanas de la osteotomía, el grupo tratado con PTHr P mostraba una mayor intensidad radiográfica en el lugar de la osteotomía, en el callo externo y



en la diáfisis cubital comparado con el grupo control. Además, el área de sección transversal del callo fue mayor en el grupo de PTHr P. A las 6 semanas se mantenían esas diferencias.

No se logró establecer una diferencia significativa en el estudio de la densidad mineral ósea utilizado el análisis DXA entre ambos grupos.

Los autores concluyen que el tratamiento con PTHr P puede mejorar la consolidación de las fracturas en conejos con dicha capacidad de curación disminuida debido al tratamiento corticoideo, y señalan una vía de investigación en humanos, en sujetos con una capacidad de consolidación disminuida.

Andreassen<sup>60</sup> estudió los efectos de la administración de PTH 1-34 a dosis de 200 µg/kg/día en ratas ancianas tras provocarles una fractura tibial osteosintetizada con aguja K intramedular, y compararlo con grupo control, tras 3 y 8 semanas de curación. Realizaron estudios morfométricos, biomecánicos mediante flexión a 3 puntos y densitométricos con tomografía computerizada cualitativa periférica.

Estos autores ya realizaron un estudio similar en ratas jóvenes y ahora lo realizan en animales ancianos (ratas de 27 meses de edad) para intentar demostrar que la PTH también sería eficaz en favorecer la consolidación en sujetos ancianos, en los que ya de por sí dicha consolidación está disminuida.

A las 3 semanas, las ratas tratadas con PTH 1-34 mostraron un incremento de la resistencia máxima del 160%. A las 8 semanas, los callos tratados con PTH 1-34 incrementaron su resistencia en 270% y su rigidez en 130%. No existieron diferencias respecto a la deformación máxima.

A los 21 días, los callos tratados con PTH 1-34 sufrieron un incremento del volumen del 208%, un aumento de la dimensión de la línea de fractura del 43% y 41 % y del contenido mineral óseo medido por pQCT del 190% con respecto al grupo control.

A los 56 días el volumen externo de los callos tratados aumentó un 135%, las dimensiones a nivel de la línea de fractura del 35 y 60% y del contenido mineral óseo del 388%.

Los autores concluyen que el tratamiento con PTH 1-34 mejora la consolidación ósea en animales en los que dicha consolidación está disminuida por la edad.

Nozaka<sup>198</sup> es el primero que evalúa el efecto de la PTH tras una osteotomía en hueso esponjoso de la rata ovariectomizada.

Para ello realiza cuatro grupos de animales ovariectomizadas tratadas con PTH 1-34 a dosis 100 µg/kg/día, ovariectomizadas tratadas con placebo, no ovariectomizadas tratadas con PTH y no ovariectomizadas tratadas con placebo. Sacrifica a los animales a las 4 semanas después de realizarles una osteotomía longitudinal incompleta en la metáfisis proximal de la tibia y fijarla con un cerclaje de alambre.

El tratamiento con PTH 1-34 incrementó el volumen de hueso esponjoso y la superficie osteoide en el grupo de ratas ovariectomizadas y en el grupo de ratas no ovariectomizadas. PTH disminuyó los parámetros de resorción ósea

(superficie erosionada, superficie osteoclástica y número de osteoclastos) en las ratas ovariectomizadas, pero no en las normales.

En la médula ósea el tratamiento con PTH disminuyó el volumen adipocitario y el número de adipocitos en las ratas ovariectomizadas. PTH no influyó sobre el tamaño medio de cada adipocito en ningún grupo.

En el lugar de la osteotomía, el tratamiento con PTH incrementó el número de células con antígeno nuclear PCNA positivo tanto en ratas ovariectomizadas como no ovariectomizadas.

El tratamiento con PTH incrementó la consolidación tras la osteotomía del hueso esponjoso tanto en las ratas ovariectomizadas como en las no ovariectomizadas.

Estos resultados son debidos al menos en parte a la acción reguladora local que incrementa la osteoblastogénesis y disminuye la adipocitogénesis en el lugar de la osteotomía.

Komatsu<sup>199</sup> utilizó ratas osteoporóticas tras ovariectomía, y les realizaron un defecto cortical en la diáfisis femoral, tras el cual formaron 5 grupos de animales y los trataron con PTH 1-38 a dosis de 0, 3, 10 y 30  $\mu$ /kg/día, durante 5 semanas. A los animales les realizaron una tomografía computerizada cuantitativa semanal (in vivo) que mostró un aumento dosis-dependiente en la mineralización de las corticales del defecto, de la zona intramedular y de la totalidad del hueso de la localización del defecto.

En los estudios biomecánicos de flexión a 3 puntos, sólo la dosis más alta de PTH (30 µg/kg/día) aumentó significativamente la fuerza del callo con respecto al grupo control.

En los estudios histomorfométricos se confirmó que la PTH estimula la formación de hueso inmaduro en los defectos y en los espacios intramedulares, pero no en el periostio.

El estudio en suero del marcador de formación ósea PINP reveló un pico a la 3ª semana, tras la cual comenzó a disminuir hasta normalizarse a la 5ª semana. El marcador de resorción TRAP 56 disminuyó en todos los grupos inesperadamente.

En resumen, se produjo un efecto dosis-dependiente con el tratamiento con PTH en la reparación de un defecto cortical en ratas ovariectomizadas. Este defecto curó por una osificación intramembranosa que se inició intramedularmente y después avanzó hacia las corticales, sin observar una formación perióstica.

Esto hace presuponer que la PTH actúa predominantemente sobre los osteoblastos para estimular la aposición mineral a lo largo de la superficie endocortical, con alguna estimulación en los espacios intramedulares.

Se han estudiado otros modelos experimentales de consolidación, incluyendo la formación ósea tras una osteotomía sometida a distracción, los efectos de la PTH en el injerto óseo vascularizado, la fusión vertebral o la

osteointegración de materiales metálicos implantados en el hueso y el crecimiento óseo en el interior de una cámara ósea.

Aleksyniene<sup>200</sup> en este artículo estudia los efectos de dos regímenes de tratamiento de PTH 1-34 en un callo de fractura de la tibia de conejos, sometidos a distracción mediante un fijador externo.

Dividen a los animales en tres grupos y tras realizar la fractura y comenzar la distracción en el 5º día, realizan un alargamiento de 10 mm durante 10 días (1 mm/día) y posteriormente mantienen el fijador durante 20 días más, para sacrificar a los animales a los 35 días. Durante la fase de alargamiento y consolidación (30 días) tratan al 1<sup>er</sup> grupo con 25 µg/kg/día de PTH 1-34; al 2º grupo con salino durante los 10 días de alargamiento y PTH 1-34 a dosis de 25 µg/kg/día durante los 20 días del período de consolidación, y al 3<sup>er</sup> grupo con salino durante los 30 días.

En los dos grupos tratados con PTH los callos fueron radiográficamente más densos y mayores que en el grupo control.

Los dos grupos tratados con PTH tuvieron un volumen de tejido regenerado y un volumen en la mitad de la diáfisis significativamente mayor que el grupo control.

Las dimensiones externas del callo regenerado fueron significativamente mayores en los dos grupos de PTH que en el grupo control.

Los callos tratados con PTH tuvieron un mayor contenido mineral óseo y una mayor densidad ósea que el grupo control.

En el estudio biomecánico la resistencia máxima de los callos tratados con PTH fueron un 33% y un 30% mayores que el grupo control. La tenacidad fue mayor en los grupos de tratamiento con PTH comparado con el grupo control.

La rigidez del callo fue un 13% y un 8% mayor en los grupos de tratamiento con PTH que en el grupo control. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento con PTH en ninguno de los parámetros estudiados.

Seebach<sup>201</sup> estudió el efecto del tratamiento de PTH 1-34 a dosis 60µg/kg/día en el callo de distracción femoral en ratas adultas comparado con placebo.

Para ello realizó una osteotomía femoral, y la osteosintetizó con un fijador externo, y tras un período de latencia de 7 días comenzó la distracción a una velocidad de 0,5 mm/día (0,25 mm 2 veces al día) durante 10 días, logrando una longitud del callo de 5 mm. Posteriormente, un grupo de animales se mantuvo durante 20 días más con el fijador externo y se sacrificaron, y otro grupo durante 40 días hasta el sacrificio. (Ambos grupos se dividieron en dos, grupo placebo y PTH, que se inició 30 días antes del sacrificio).

Se realizaron estudios de morfometría, ensayos biomecánicos de flexión a 3 puntos, densitometría, e histología del callo de distracción.

A los 20 días de la osteotomía, el tratamiento con PTH 1-34 incrementó significativamente la resistencia máxima y la rigidez del callo más del 50%. El volumen total del callo y su área transversal fueron mayores en el grupo tratado

con PTH, y la densidad mineral ósea se incrementó en dicho grupo un 24%. El análisis histológico mostró un aumento de la densidad ósea del 35% y una disminución de la densidad en la superficie ósea del 19% en los animales tratados con PTH 1-34 sin que se modificase el grosor trabecular.

A los 40 días de la fractura, el tratamiento con PTH 1-34 incrementó la resistencia máxima y la rigidez del callo más de 50%, sin modificar el máximo tensional ni el módulo de elasticidad. No existieron diferencias en el volumen del callo ni en su área entre los grupos de tratamiento y control. La densidad mineral ósea del callo fue un 11% mayor y su contenido mineral óseo un 33% mayor en los animales tratados con PTH.

El análisis histológico mostró un incremento en la densidad ósea del 23%, una disminución de la densidad ósea en superficie del 38% y un gran incremento del grosor trabecular del 114% en los callos de distracción tratados con PTH. Las trabéculas se hicieron más escasas y gruesas, con un aumento de la masa ósea en el área cercana a la cortical.

Los autores hipotetizan que el tratamiento con PTH fue más efectivo en el grupo de distracción de 20 días porque se instauró el tratamiento con PTH en el inicio de la de distracción (en el día 7 tras la osteotomía), mientras que en el grupo de distracción de 40 días se comenzó el tratamiento en el día 27 tras la osteotomía (cuando ya había finalizado la distracción hacía 10 días).

Sin embargo, también podría deberse a que en el segundo grupo el callo ya fuese más maduro al llevar más tiempo de evolución y sus parámetros se acercasen más a la normalidad, tras un período mayor de remodelación.

Los autores también encontraron un aumento de las propiedades biomecánicas y de la densidad mineral ósea del fémur contralateral intacto, aunque en mucha menor medida que en el callo de distracción, y teorizan sobre el efecto de PTH 1-34 es mayor en el hueso cuando se activa la respuesta reparativa.

Abe<sup>202</sup> estudió el efecto del tratamiento de PTH 1-34 a dosis de 40 µg/kg/día en un modelo de artrodesis espinal en ratas, comparado con un grupo control tratado con suero salino. Para ello, tras realizar una artrodesis lumbar colocando autoinjerto de cresta ilíaca trataron a un grupo de animales con PTH y a otro con placebo, y sacrificaron a los animales en los días 14, 28 y 42 tras la cirugía.

Basándose en un test de palpación manual, observaron que el grupo tratado con PTH alcanzó la fusión antes que el grupo de control y el estudio radiográfico mostró que se formó una masa de fusión más densa y mayor en los animales tratados con PTH comparado con el grupo control.

En el estudio con microtomografía computerizada 3D mostró en los animales tratados con PTH una reabsorción más precoz del injerto y una masa de fusión mayor que en el grupo control. En el estudio microestructural, el volumen trabecular y los parámetros de conectividad de la masa de fusión fueron significativamente mayores en el grupo de PTH que en el grupo control.

El examen histológico mostró que el grupo tratado con PTH tenía un mayor porcentaje de aposición mineral, de superficie mineralizada y de superficie de osteoclastos, comparado con el grupo control.



En el estudio de los niveles de marcadores de metabolismo óseo, la osteocalcina (OC) se mantuvo más alta durante todo el período de estudio en los animales tratados con PTH que en el grupo control. Los niveles del colágeno tipo I cruzado C-telopeptido (CTH) tendieron a disminuir gradualmente con el paso del tiempo en ambos grupos. El nivel de este marcador fue significativamente más alto en el grupo de PTH comparado con el grupo control sólo en el día 42.

Hashimoto<sup>203</sup> estudió en ratas el efecto de la terapia secuencial (tratamiento con PTH seguido de tratamiento con bifosfonatos) en la consolidación de un injerto libre vascularizado de diáfisis tibial tras 8 semanas, comparándolo con placebo o con tratamiento aislado con bajas (10 µg/kg/día) y altas (100 µg/kg/día) dosis de PTH 1-34.

El grupo control mostró una evidente pérdida ósea en ambas uniones del injerto con el receptor, pérdida que no se observó en los animales tratados sólo con PTH o con terapia secuencial (PTH + Zolendronato). El tratamiento durante 8 semanas con PTH aumentó el contenido mineral óseo y la resistencia de una forma dosis-dependiente. Estos efectos disminuyeron significativamente si sólo se mantuvo el tratamiento con PTH durante 4 semanas, seguido de 4 semanas de placebo, pero se evitó esta pérdida en la terapia secuencial.

Skripitz<sup>204</sup> mostró en ratas que el tratamiento con PTH 1-34 a dosis de 60 µg/kg/día incrementa la formación de una red de hueso trabecular y la

densidad del hueso regenerado en el interior de una cámara ósea de titanio implantada en tibia proximal de forma tiempo-dependiente.

El mismo autor<sup>205</sup> en otro estudio observa que el tratamiento en ratas con PTH 1-34 durante 4 semanas mejora la fijación en tibia proximal de implantes roscados de acero triplicando la fuerza del par torsor de extracción y duplicando la fuerza de extracción con respecto al grupo control. El autor concluye remarcando que la fijación de un implante depende de la densidad del hueso adyacente y puede ser considerado como el resultado final de la respuesta de consolidación a una fractura ocasionada por el implante, y por tanto el tratamiento con PTH podría mejorar la fijación de los implantes ortopédicos.

En una publicación posterior, Skripitz<sup>206</sup> compara la fijación de dos implantes con rugosidades diferentes (acero inoxidable y cemento PMMA) implantados en metafisis proximal tibial de ratas y tratadas con PTH 1-34 a dosis de 60 µg/kg/día con un grupo control, sacrificando a los animales a las 2 y 4 semanas. El tratamiento con PTH incrementó de forma significativa el porcentaje de contacto óseo con ambos implantes a las 2 y 4 semanas comparado con el grupo control. En los animales tratados con PTH las trabéculas óseas adyacentes al implante disminuyeron en número, haciéndose más gruesas, con un incremento en la masa ósea en el área adyacente al implante, comparado con el grupo control.

Gabet<sup>207</sup> estudió en ratas ancianas ovariectomizadas el anclaje de implantes de titanio en la metáfisis proximal de la tibia, y cómo el tratamiento durante 8 semanas con PTH 1-34 a dosis de 0, 5, 25 y 75  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  afectaba a dicho anclaje. Estudió la osteointegración mediante microtomografía computerizada cuantitativa ( $\mu\text{CT}$ ), y también realizó ensayos biomecánicos de extracción del implante. Todos los parámetros  $\mu\text{CT}$  (densidad ósea, grosor trabecular, número de trabéculas y densidad de su conectividad) fueron estimulados por la PTH de manera dosis-dependiente. En los ensayos biomecánicos, los tres parámetros medidos (fuerza máxima, rigidez y tenacidad) aumentaron significativamente de manera dosis-dependiente, excepto entre las dosis más altas, donde no encontró diferencias significativas entre la dosis de 25 y la de 75  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ .

Como se puede observar, el número de trabajos experimentales que estudia los efectos de la PTH en la consolidación ósea tras una fractura, en la fusión vertebral, o la formación de hueso tras un implante metálico es muy numeroso y heterogéneo. Así mismo también varía la secuencia de la hormona utilizada, la dosis, el tiempo de tratamiento y el periodo de exposición a la misma, así como si se complementa con otros tratamientos locales o sistémicos. Respecto al animal de experimentación, la mayoría de los estudios se realizaron con animales pequeños (ratas o conejos) y sólo hemos encontrado un autor que utiliza animales grandes (monos) con sistema de consolidación haversiana similar a los humanos. También es muy elevada la variabilidad respecto a individuos que tengan o no alguna característica que

dificulte la consolidación ósea (ovariectomía, tratamiento corticoideo, edad avanzada), así como el modelo de fractura utilizado y el tiempo de sacrificio del animal. Además, la manera de medir el efecto del fármaco se ha realizado de diferentes formas, ya sea con estudios radiográficos, densitométricos, biomecánicos, morfométricos, histológicos y moleculares.

Todo ello hace que la extracción de conclusiones sea dificultosa, difícil de interpretar y en ocasiones contradictoria. Sin embargo, la mayoría de autores encuentran un aumento de las propiedades biomecánicas del callo y de su contenido mineral óseo, así como una aceleración de la consolidación radiográfica del mismo, tanto en animales sanos como en aquellos que tienen disminuida la capacidad de consolidación ósea.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La incidencia de fracturas osteoporóticas en España es elevada y seguirá aumentando gracias al incremento en la esperanza de vida de la población española<sup>208</sup>.

Numerosos estudios experimentales indican que en la osteoporosis existe una disminución importante de la capacidad reparadora de las fracturas, como también ocurre con la edad avanzada, la diabetes y el tratamiento con corticosteroides<sup>179-183</sup>.

La hormona paratiroidea constituye un prometedor agente, que ha cambiado en gran medida el pilar de tratamiento de la osteoporosis. Desde su aprobación por la FDA en 1992, numerosos estudios han evaluado el beneficioso efecto terapéutico<sup>21,109</sup>. Gracias a su efecto anabólico no sólo es eficaz en el aumento de la densidad ósea y en la prevención de las fracturas, sino que también tiene el potencial para mejorar la microarquitectura del hueso<sup>125,129</sup>.

El concepto de un agente anabólico óseo que pueda estimular la formación de hueso nuevo y los prometedores resultados de los estudios iniciales en el tratamiento de la osteoporosis podrían ampliar las indicaciones de la PTH en casos de fracturas óseas. En los últimos 10 años, muchos estudios experimentales se han diseñado con el propósito de identificar el papel de la PTH en la reparación de fracturas. Acelerar la consolidación ósea, la estimulación de la osteogénesis (formación de callos más resistentes) y la mejora de la resistencia mecánica del callo se han documentado en el examen

histológico y análisis histomorfométrico en modelos animales. Pero la mayoría de estos estudios están realizados en ratas, las cuales poseen un proceso de consolidación ósea bastante diferente al humano, o en animales no osteoporóticos.

En nuestro caso hemos elegido la oveja como animal de experimentación, por su proceso de consolidación ósea mucho más cercano al humano y además en ovejas osteoporóticas para acercar aún más las condiciones en las que se producen estas fracturas<sup>19,175</sup>.

Nos planteamos estudiar el efecto de la hormona paratiroidea de cadena completa PTH 1-84 (utilizada actualmente en el tratamiento de la osteoporosis) en la consolidación de las fracturas en ovejas osteoporóticas.

El efecto de la PTH en la consolidación de las fracturas ha sido determinado sobre todo por estudios histológicos. Pero en la práctica clínica, lo más interesante es conocer la resistencia mecánica del callo para saber en qué momento se puede considerar una fractura perfectamente consolidada desde un punto de vista biomecánico. Por ello, hemos realizado ensayos biomecánicos de flexión a cuatro puntos y de torsión que son los que información más precisa nos proporcionarán sobre el comportamiento mecánico del callo de fractura.

Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo es que si la PTH actúa como agente anabólico favoreciendo la consolidación ósea, la utilización de este fármaco durante la reparación de una fractura mejorará las propiedades morfológicas, densitométricas y biomecánicas del callo.

Para comprobarlo utilizaremos un modelo de fractura diafisaria de tibia en una oveja osteoporótica estabilizada mediante un fijador externo. Este modelo de fractura experimental reproduce de forma fidedigna las condiciones del proceso de consolidación ósea que se produce en las fracturas en humanos. Otros autores han utilizado anteriormente este modelo para distintos estudios de la consolidación de fracturas<sup>209-218</sup> pero ninguno de ellos en ovejas osteoporóticas.





## **OBJETIVOS**

- Reproducir un modelo experimental en animales grandes para estudiar la consolidación de una fractura en la tibia de ovejas osteoporóticas ovariectomizadas y alimentadas con dieta pobre en calcio y vitamina D.
- Estudiar el proceso de consolidación ósea en este modelo de experimentación en ovejas osteoporóticas, mediante estudios de densitometría y biomecánicos del callo de fractura.
- Estudiar el efecto de la PTH (1-84) en el proceso de consolidación de las fracturas comparándolo con un grupo control.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **1.- Animal de experimentación:**

### **1.1.- Manipulación animal:**

La manipulación y la experimentación animal de este proyecto se ha adecuado a la norma del 21 de octubre del 2005, Real Decreto 1201/2005.

### **1.2.- Animal de experimentación:**

Para la elección de un animal como modelo de experimentación para el estudio de la osteoporosis necesitamos un animal vivo en el que se pueda estudiar la pérdida ósea debida a la deficiencia hormonal ovárica de forma espontánea o adquirida y en el que las características de esta pérdida ósea y sus secuelas sean lo más parecidas posibles a las de la menopausia en las mujeres<sup>252</sup>.

Aunque la mayoría de los trabajos experimentales publicados sobre la influencia de la PTH en la curación de las fracturas se han realizado en ratas como animal de experimentación hay que tener en cuenta que este modelo de reparación ósea tiene como principal limitación el hecho de que la consolidación que se produce en roedores es principalmente membranosa y ésta se correlaciona débilmente con el proceso de consolidación endocondral que se produce en los humanos<sup>247,175,249</sup>. A pesar de ello, las ratas proporcionan un modelo de fractura que también permite el estudio mediante

biología molecular, se puede utilizar gran número de animales y la consolidación es potencialmente más rápida<sup>189,191</sup>.

Nosotros hemos elegido las ovejas osteoporóticas como modelo experimental en la consolidación de fracturas.

Los animales grandes, como la oveja, son más adecuados para el estudio de pruebas biomecánicas ya que su tamaño facilita la cirugía y los análisis biomecánicos<sup>175,247,249</sup>. Además el tamaño de las ovejas también es importante pues permite reproducir un modelo de experimentación de fractura ósea como es la osteotomía tibial estabilizada mediante un fijador externo<sup>76,209,211,214,215,218</sup>.

Un inconveniente de utilizar las ovejas como animal de experimentación es el coste en comparación con los animales más pequeños lo que obliga a utilizar menos animales. Además hay que tener en cuenta que son animales rumiantes y por lo tanto no se les puede administrar medicación oral y deben estar en ayunas de al menos 24 horas antes de proceder a cualquier procedimiento quirúrgico<sup>249</sup>. Para ello hemos utilizado trece ovejas esqueléticamente maduras de la raza Guirra, a las que se le realizó una ovariectomía bilateral y fueron sometidas a una dieta pobre en calcio y vitamina D, durante 6 meses, para conseguir un modelo comparable a la osteoporosis humana con respecto a los cambios en la densitometría, estructura ósea y fuerza<sup>19,20</sup>.

La ovariectomía se ha realizado bajo anestesia general, mediante una laparotomía media, localización de los ovarios, ligadura de la arteria ovárica y de la trompa y extracción de los 2 ovarios.

Durante 6 meses, las ovejas fueron sometidas a una dieta restringida que ha consistido en pienso con 1,5 gramos de calcio y 100 unidades internacionales de vitamina D diarias (las dosis normales son 5 gramos de calcio y 1000 unidades de vitamina D).

Se ha trabajado con dos grupos:

- Grupo 1: 6 ovejas a las que se les ha administrado hormona paratiroidea de cadena completa PTH (1-84) vía subcutánea en dosis de 100 µg diarios (dosis equivalente a la utilizada en la clínica) tras la intervención quirúrgica para realizar la osteotomía (PTH).
- Grupo 2: 7 ovejas en el grupo control, que no han recibido medicación (CON).

Para estudiar la consolidación ósea hemos realizado una osteotomía en la tibia de la pata posterior derecha y la hemos estabilizado mediante un fijador externo, dejando un espacio entre los fragmentos óseos de 3 mm.

La técnica se describe en el siguiente epígrafe.

## **2.- Técnica quirúrgica:**

### **2.1.- Procedimiento quirúrgico**

Las ovejas se mantienen en ayunas de agua y pienso durante 24 horas antes de la intervención quirúrgica. Hay que tener en cuenta que estos

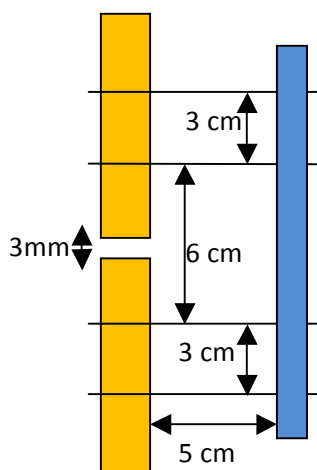
animales son rumiantes y por tanto no son suficientes los periodos menores de ayuno, ya que retienen el alimento en el rumen.

La relajación del animal se ha conseguido mediante la inyección intramuscular de 3-4 mL de clorhidrato de Xilacina (Rompum<sup>®</sup>, Bayer) con una posología de 0.01 mg/kg. La anestesia se realiza mediante Propofol (Diprivan<sup>®</sup>, Astrazeneca) al 1% con dosis de 4.5 mg/kg, inyección subcutánea de 1 ampolla de atropina (Atropina Braun, B. Braun Medical SA) y 1 ampolla subcutánea de Hidrocloruro de mepivacaína (Mepivacaína Braun<sup>®</sup> 1%, Braun Medical SA).

En la mesa de quirófano se colocan en decúbito lateral con la pata trasera derecha (a operar) sobre la mesa. Se sujetan las patas delanteras y la trasera izquierda y se coloca un soporte para la cabeza.

La pata se afeita, se lava con cepillo y solución jabonosa yodada y se seca. Posteriormente se pinta de forma estéril con solución yodada y se aísla con paños estériles.

Bajo condiciones asépticas se monta un fijador externo unilateral monotubo (Sistema DynaFix, Biomet) mediante una técnica de 4 tornillos de forma que la distancia entre los 2 tornillos centrales sea de 6 cm para que la osteotomía se realice justo en el centro, a 3 cm de cada tornillo central. Este fijador externo nos servirá como plantilla para colocar sobre él los tornillos en la cara anteromedial de la tibia derecha (figura 2).



**Figura 2. Esquema de la tibia de la oveja (naranja) y la colocación del fijador externo (azul) con las referencias utilizadas.**

Se marca la piel con las guías de broca colocadas sobre el fijador y se comienza por el tornillo más proximal. El fijador se colocará de tal forma que los pernos que sujetan las fichas queden posteriores y los que solidarizan los patinetes al cuerpo queden anteriores. Hay que recordar que la orientación del tornillo es anterointerno y que el tornillo más distal debe estar separado del tobillo aproximadamente 2-3 cm según el tamaño de la pata.

Se incide la piel y el tejido celular subcutáneo hasta llegar al periostio y se identifican los límites de la tibia para colocar la broca justo en el centro de la diáfisis. Se marca con el punzón a través de la guía corta y posteriormente se perfora con broca de 3,2 mm de diámetro hasta atravesar las dos corticales. Se retira la broca y su guía y se coloca el tornillo de 5 mm de diámetro con el berbiquí manual. Una vez colocado el primer tornillo se repite el proceso con el más distal, asegurándose de que se coloca en el centro del hueso. Cuando están colocados el tornillo más proximal y el más distal, se intercambian las

guías cortas por las largas, colocando las primeras para los tornillos intermedios. Se incide la piel de forma menos extensa, se marcan con el punzón, se taladran y se colocan los tornillos intermedios. Se palpan por la cara posterior las puntas de los tornillos para comprobar que han atravesado las dos corticales.

Se retira el fijador y se cosen las incisiones con Vicril rapide de 3/0. Se incide la piel algo más posterior entre los 2 tornillos centrales. Se disecan los planos hasta llegar al periostio. Se desperiostiza la tibia y se colocan dos separadores de Hoffman para protección de las partes blandas y se realiza la osteotomía con sierra oscilante. Se comprueba que la osteotomía es completa y se monta el cuerpo del fijador externo sobre las fichas. Se colocan los tubos de plástico para que los patines hagan mejor presa sobre las fichas. Se coloca un espaciador sobre la osteotomía para mantener un espacio interfragmentario de 3 mm y se aprietan todos los pernos del fijador. Se cierra la herida por planos, prestando atención al cierre del periostio y de las partes blandas, con Vicril 3/0 y Vicril rapide 3/0 para la piel.

Tras suturar la piel, se vendan las heridas y los tornillos con gasas estériles y se repasan los pernos con la llave dinamométrica con un par de apriete de 4,0 Nm y posteriormente se coloca una férula metálica de protección, que se mantendrá durante 4 semanas.

En el postoperatorio se administra una inyección intramuscular de 1 g de Amoxicilina (Amoxicilina + Acido Clavulánico Cinfa EFG<sup>®</sup>, Cinfa) como profilaxis antibiótica y una inyección intramuscular de Metamizol Magnésico (Nolotil<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim).



A las ovejas se les permite andar sin restricción en su establo después de recuperarse de la anestesia, y se vigilan diariamente la actividad, la herida quirúrgica y si desarrollan una infección del trayecto de los tornillos. La profilaxis antibiótica con 1 g de Amoxicilina (Amoxicilina + Acido Clavulánico Cinfa EFG, Cinfa) se repite al 2º y 3º día post-cirugía. Las heridas son revisadas y el vendaje se cambia en condiciones asépticas de forma semanal, comprobando con la llave dinamométrica cada uno de los pernos del fijador externo. La férula de aluminio se retira a las 4 semanas.

A las 8 semanas tras la intervención quirúrgica se sacrifican los animales tras una inducción de anestesia general con pentobarbital sódico a dosis de 30 mg/kg (Penta-Hypnol®, Agrovvet Market SA), y mediante la administración intravenosa de una ampolla de cloruro potásico (Cloruro Potásico Braun sol. 14,9%, Braun Medical SA).

Tanto la pata derecha intervenida como la izquierda, no intervenida, se recogen, se retiran las partes blandas (piel y músculo) y se congelan a -70°C hasta su procesamiento.

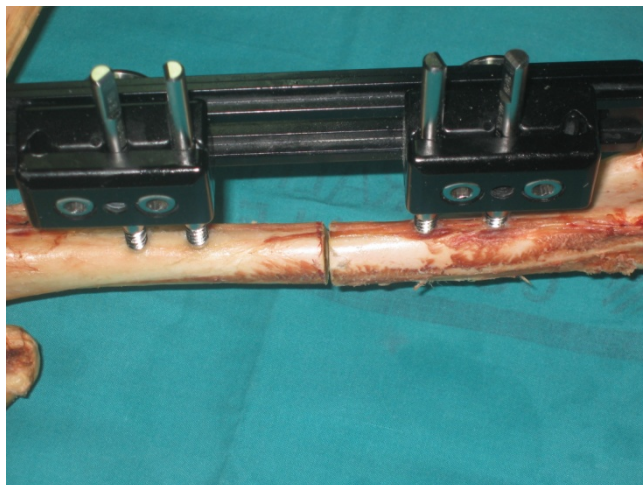
El día del ensayo se descongelan, a temperatura ambiente y una vez descongeladas se envuelven en gasas humedecidas con suero salino fisiológico para evitar al máximo la modificación de las propiedades mecánicas de los tejidos por evaporación de agua y desecación, ya que se ha observado que la desecación influye en el comportamiento mecánico<sup>219,220</sup>. Este proceso se repite siempre en las mismas condiciones para todas las muestras. Una vez descongeladas las muestras se realizan los estudios mediante TAC y las

pruebas biomecánicas no destructivas de flexión a cuatro puntos y por último las destructivas de torsión.

Las intervenciones quirúrgicas se han realizado en el quirófano de la Unidad Central de Investigación, de la Facultad de Medicina y Odontología de Valencia, donde se ha controlado también el postoperatorio, y posteriormente los animales han sido estabulados en las condiciones que marca la ley en las instalaciones de estabulación animal de la Escuela de Ingenieros Agrónomos en la Universidad Politécnica de Valencia (Número de licencia 250V091).

### **3.- Características del fijador externo**

El sistema de fijación externa está compuesto por 4 tornillos tronco-cónicos y autoterrajantes de 6 mm de diámetro y 90 mm de longitud. Éstos se sitúan a 30 mm de por encima y por debajo de la osteotomía. La distancia de la piel a la barra del fijador es de 30 mm. La barra se sujeta a los tornillos con dos rótulas que se ajustan a la barra mediante dos tuercas que se ajustan con una llave dinamométrica con un par de apriete de 4,0 Nm. El espacio interfragmentario a nivel de la osteotomía es de 3 mm. Este sistema ha sido el mismo en todas las ovejas intervenidas (figura 3).



**Figura 3. Fotografía del sistema de fijación externa utilizado para la estabilización de la osteotomía en la tibia de la pata de la oveja.**

#### **4.- Métodos de medición:**

##### **4.1.- Estudios de imagen mediante TAC:**

Se han tomado imágenes de TAC de todas las muestras, tanto de las tibias intervenidas como de su tibia contralateral no intervenida, del grupo sin medicación control (CON) y del grupo estudio tratadas con Hormona Paratiroidea (PTH).

Se ha realizado un estudio morfológico, comprobando la consolidación de la fractura y evaluando el callo y su superficie en los cortes axiales, así como el estudio densitométrico del callo, descrito más adelante.

El estudio se ha realizado en el centro ERESA Campanar de Valencia con TAC multidetector de 16 canales (GEH, CT Light Speed 16 plus, Wakesha, WI, USA) practicando adquisición helicoidal (kW 120, MA 440, FOV 33 cm,

matriz 512 x 512, grosor de corte de 1,2 mm y algoritmo de reconstrucción bone plus).

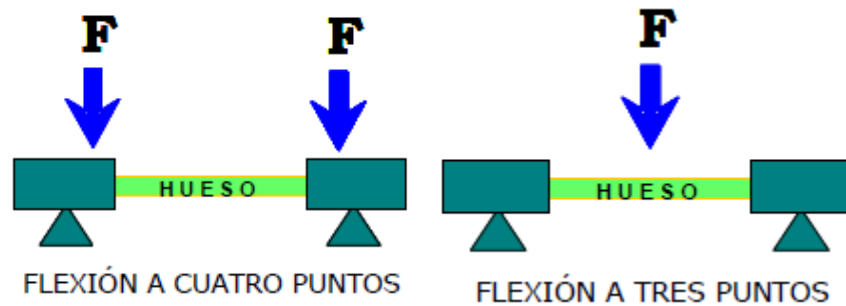
#### 4.2.- Estudios biomecánicos:

Los estudios biomecánicos y densitométricos se han realizado en el Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV).

Para evaluar mecánicamente el hueso reparado, este ha sido sometido a dos tipos de ensayos *in vitro*:

- Ensayos no destructivos de flexión a cuatro puntos; ensayos sensibles a la asimetría ósea que se produce durante el proceso de reparación y, por tanto, a la orientación del espécimen durante la realización de los mismos<sup>221-225</sup>. De estos ensayos se obtienen las gráficas del perfil polar de rigidez, a partir de estas se obtienen tres parámetros importantes: índice de rigidez, índice de áreas y el índice de planitud.

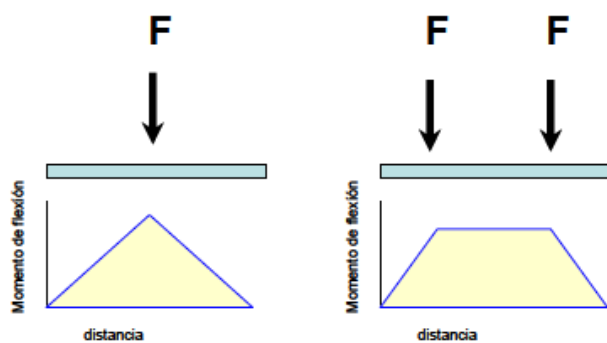
El ensayo de flexión se ha utilizado comúnmente en multitud de experiencias para evaluar las características mecánicas de huesos largos. Los ensayos de flexión, atendiendo al modo de aplicación de la carga, se dividen en dos tipos: de flexión en 3 puntos y de flexión en 4 puntos (figura 4):



**Figura 4. Esquemas de los ensayos de flexión, a cuatro y tres puntos.**

El ensayo de flexión a cuatro puntos muestra claras ventajas frente al de tres puntos:

- En el ensayo de tres puntos se aplica la carga directamente sobre el hueso, el cual sufrirá una deformación local en ese punto, subestimándose, de este modo, el módulo de Young<sup>20,226</sup>.
- En el ensayo a tres puntos, el momento de flexión no es uniforme a lo largo de la muestra, siendo máximo en el lugar donde se aplica la carga. En el de cuatro puntos, sin embargo se logra un momento uniforme a lo largo del hueso entre las dos fuerzas aplicadas<sup>227</sup> (figura 5).



**Figura 5. Representación de los momentos flectores en los ensayos de flexión a tres y cuatro puntos.**

El ensayo a flexión a 4 puntos que hemos realizado se lleva a cabo en 12 planos diferentes a lo largo del eje longitudinal del hueso siguiendo una modificación del procedimiento propuesto por Foux<sup>228</sup>. Para ello se va rotando el hueso a intervalos de  $15^\circ$  en la máquina de ensayos. El hecho de evaluar la rigidez en diferentes planos se justifica porque hay evidencias de que los huesos largos muestran diferencias en su rigidez dependiendo del plano dónde se realiza el ensayo de flexión<sup>229,230</sup>. Además, estas diferencias son todavía más pronunciadas después de la fijación de una fractura<sup>231</sup>. Es importante tener estos aspectos en cuenta al evaluar la rigidez del hueso ya que si elegimos aleatoriamente un solo plano del hueso, podríamos estar sobreestimando o subestimando los valores de rigidez registrados.

Por esta razón se elige este método que supone una ligera modificación del que fue desarrollado por Foux. En su caso se empleó un ensayo no destructivo a flexión de tres puntos en 24 planos diferentes. En nuestro caso el ensayo es de flexión a cuatro puntos, pero en 12 planos. De esta manera no obtenemos un único valor de rigidez para cada hueso si no que se registran 12

valores de rigidez para cada hueso, correspondientes a los 12 planos ensayados. Estos valores se representan gráficamente dando lugar a una elipse, o perfil polar de rigidez que refleja los valores de rigidez de los 12 planos ensayados.

- Ensayos destructivos de torsión; no son sensibles a la asimetría del hueso y del callo, y por tanto, tampoco a su orientación relativa al realizar el ensayo, obteniéndose los parámetros de rigidez torsional, par torsor máximo y tenacidad. El objetivo de esta prueba es la obtención de información relacionada con las características resistivas del hueso en consolidación, ya que la fuerza aplicada alcanza el punto de rotura del hueso. Este ensayo de torsión destructivo es un método estandarizado y ha sido empleado por numerosos autores<sup>232-241</sup>.

El ensayo destructivo a torsión permite conocer diversas características mecánicas tanto de la tibia osteotomizada como de la contralateral sana. Este tipo de ensayo no es sensible a la asimetría del hueso y del callo y, por tanto a la orientación de los especímenes durante la realización del mismo.

**• Preparación de las muestras y procedimiento del ensayo:**

Como en todo ensayo científico, es importante que todas las muestras sean sometidas al mismo proceso de conservación y manipulación. Como ya se ha descrito, la descongelación se realiza a temperatura ambiente y una vez

descongelados se envuelven en gasas humedecidas con suero salino fisiológico para evitar al máximo la modificación de las propiedades mecánicas de los tejidos por evaporación de agua y desecación, ya que se ha observado que la desecación influye en el comportamiento mecánico.

La inclusión de las tibias en mordazas se realiza siguiendo un procedimiento riguroso con el fin de conseguir una unión sólida y una buena alineación de los fragmentos óseos. Las mordazas están constituidas por unas cazoletas mecanizadas en aleación de aluminio, diseñadas para un montaje sencillo en una máquina de ensayos. La cazoleta de la parte proximal, lleva en su extremo 12 caras planas que permiten su orientación en intervalos de 30° para el ensayo de flexión. La cazoleta de la parte distal es totalmente lisa.

Las tibias, una vez descongeladas se preparan para su introducción en las cazoletas:

1. Se recortan las zonas epifisarias con una sierra oscilante.
2. Con el taladro se realizan dos nuevas perforaciones perpendiculares a las ya existentes para el paso de las agujas del fijador externo.
3. Se vuelven a introducir las agujas de Kirschner recortándolas a una longitud aproximada de 25 mm con el fin de impedir la torsión de las piezas óseas en el interior de las mordazas.
4. En el caso de la tibia control, se procede a realizar todas las perforaciones con el taladro a la misma distancia que en el caso de la tibia osteotomizada.
5. A continuación se introduce en la mordaza achaflanada la parte distal de la tibia; se centra, empleando para ello cuatro tornillos colocados en la



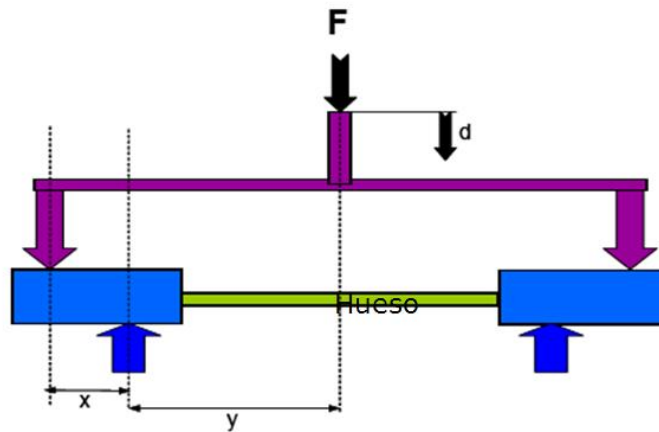
parte superior de la mordaza. Se marca con un rotulador permanente de la cara achaflanada la zona que corresponde con la cresta tibial, esto es fundamental a la hora de la realización de los ensayos, porque marcará el plano 0 de inicio de los ensayos. Con la tibia centrada totalmente y fija se vierte sobre la cazoleta metal de Wood (aleación de estaño y bismuto que presenta un punto de fusión de 47°C)<sup>242</sup>. Se espera el tiempo necesario hasta que ésta se enfríe. Se gira el montaje 180° y se repite la operación dejando un espacio libre entre cazoletas de 40mm. Para conseguir una buena alineación durante la preparación del espécimen, las mordazas se sujetan a un dispositivo de accionamiento manual que permite acercarlas y alejarlas manteniendo dicha alineación.

6. Cuando se ha enfriado el metal de Wood se liberan las cazoletas del dispositivo de alineación. El espécimen óseo es envuelto en una gasa que permanecerá húmeda durante todo el ensayo.

- **Ensayo de flexión a 4 puntos:**

Este ensayo a flexión se lleva a cabo en 12 planos diferentes a lo largo del eje longitudinal del hueso siguiendo una modificación del procedimiento propuesto por Foux<sup>228</sup>. Para ello se va rotando el hueso a intervalos de 15° en la máquina de ensayos.

El esquema de la configuración del ensayo de flexión a cuatro puntos se muestra en la Figura 6.



**Figura 6. Esquema de la configuración del ensayo de flexión a cuatro puntos.**

Para el cálculo de la rigidez a flexión  $(EI)_{\text{hueso}}$  se aplica la Ecuación 1 donde,  $x$  e  $y$  corresponden a las distancias entre los puntos representados en el esquema de la Figura 3,  $d$  es el desplazamiento que sufre la muestra tras la aplicación de la fuerza.  $F$  es la fuerza aplicada.  $(EI)_c$  se corresponde con la rigidez del material de las cazoletas.

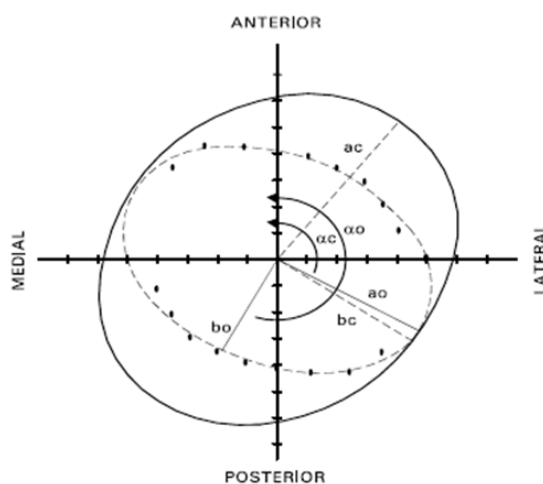
$$(EI)_{\text{hueso}} = \frac{\frac{1}{2} \left[ \frac{F}{d} \right] x^2 y}{1 - \left[ \frac{F}{d} \right] \frac{x^3}{6(EI)_c}}$$

**Ecuación 1. Rigidez a flexión.**

Para la definición del protocolo de realización de los ensayos se ha tomado como modelo las experiencias de Foux<sup>228,231</sup>, Bramer<sup>243</sup> y Lewandowski<sup>244</sup> en las que se repiten los ensayos girando las mordazas hasta completar el giro, obteniendo la distribución de rigideces en función del plano

de ensayo. Esta descripción de la rigidez da lugar a lo que se conoce como perfil polar de rigidez a flexión (PPRF).

Teóricamente, considerando que la rigidez es simétrica en cada plano (la misma para una orientación de  $0^\circ$  y  $180^\circ$ ), asumiendo que los tejidos presentan las mismas rigideces a compresión que a tracción<sup>228</sup> la distribución polar de la rigidez a flexión adquiere la forma de una elipse centrada en el origen y, por tanto, se define por tres parámetros (semieje mayor  $a$ , semieje menor  $b$  y ángulo de inclinación  $\alpha$ ) (Figura 7). La relación existente entre estos tres parámetros del PPRF del hueso osteotomizado y los de su contralateral intacto que se utiliza como control, sirven para definir parámetros de eficiencia (índice de rigidez, relación de áreas e índice de planitud), que caracterizan las propiedades mecánicas del hueso reparado.



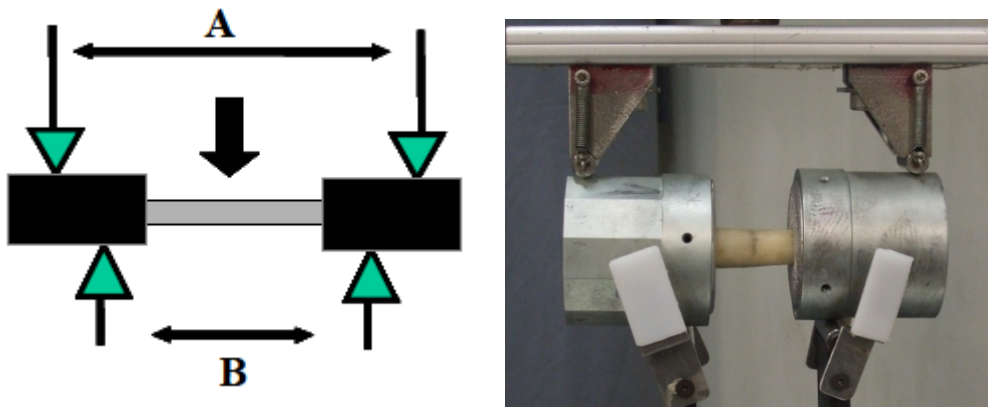
**Figura 7. Perfil polar de rigidez de un hueso osteotomizado y su contralateral sano.**

Las condiciones de ensayo realizadas en este trabajo han sido adaptadas a las características específicas del animal de experimentación empleado y a la máquina de ensayos utilizada. El hueso se posiciona en la

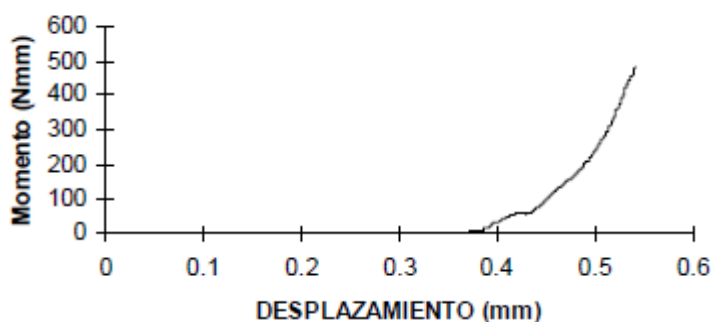
máquina universal de ensayos (Modelo INSTRON 8874/511/147) con una carga máxima de 15 kg y se procede a la realización del ensayo en el primer plano; obteniéndose gráficas similares a la observada en la figura 9.

Las condiciones son las siguientes:

1. Control por desplazamiento.
2. Velocidad de desplazamiento del actuador: 0.008 mm/min.
3. Carga fin de ensayo: 15 N.
4. Distancia entre apoyos (figura 8):
  - A. 140 mm
  - B. 64 mm



**Figura 8. Figura esquemática de los puntos de apoyo en el ensayo de flexión a cuatro puntos y fotografía del ensayo.**



**Figura 9. Gráfica típica de un ensayo de flexión en uno de los planos.**

Los ensayos comienzan aplicando en el plano AP marcado como un 0 (zona de la cresta tibial). Una vez alcanzada la condición de fin de ensayo, se descarga y se gira la muestra 30°, así sucesivamente hasta alcanzar los 360° que correspondería con los 12 planos. Para cada uno de estos planos ensayados se calcula la rigidez como la pendiente de la curva carga-desplazamiento. Los ensayos se realizan tanto en la tibia osteotomizada como en la contralateral sana. La ecuación de la elipse que se obtiene del PPRF es la siguiente (ecuación 2):

$$R^2 = \frac{A}{B + \cos 2(\theta - \alpha)}$$

**Ecuación 2: Ecuación de la elipse obtenida del PPRF.**

Donde **R** es el vector del radio en el punto donde la dirección de la elipse coincide con la del ángulo de orientación de la placa (**θ**); **α** es el ángulo de inclinación de la elipse, medido desde la dirección y al eje menor, y **A** y **B** son

función de los semiejes **a** y **b** de la elipse y están definidos por las ecuaciones siguientes (ecuación 3):

$$A = \frac{2a^2b^2}{a^2 - b^2}$$

$$B = \frac{a^2 + b^2}{a^2 - b^2}$$

**Ecuación 3. Parámetros que definen la ecuación de la elipse.**

Para determinar la elipse que mejor se ajusta al perfil polar de rigidez a flexión, se asigna a la variable  $r$  los valores de rigidez a flexión obtenidos experimentalmente para cada ángulo  $\theta$  y se realiza una regresión no lineal mediante el método de Levenberg-Marquardt, incluyendo como variable dependiente la  $r^2$ , como variable independiente el ángulo  $\theta$  y como parámetros a determinar  $A$ ,  $B$  y  $\alpha$ .

La verdadera importancia del cálculo de estas elipses radica en la obtención a partir de ellas de tres parámetros que aportan una importante información respecto a la eficiencia de la reparación del hueso. Estos parámetros están estandarizados permitiendo conocer la relación entre el hueso osteotomizado y contralateral sano, por lo tanto los valores obtenidos son adimensionales referidos al hueso intacto contralateral.

Para cuantificar las diferencias entre las elipses del hueso reparado y el contralateral sano se definen los siguientes parámetros de eficiencia de la reparación<sup>228</sup>:

- **Índice de rigidez** (Stiffness-Index, **SI**) (ecuación 4), que es el más importante, el cual se obtiene dividiendo la rigidez en los doce planos del hueso osteotomizado ( $EI_{os}$ ) por la rigidez en los mismos planos de su contralateral sano ( $EI_c$ ) para obtener resultados estandarizados, y de este cociente se elige el valor mínimo. Representa el mayor salto de rigidez del sistema, es decir, la dirección del plano de carga donde se da una mayor diferencia entre la rigidez del hueso sano y el osteotomizado. Este índice nos indica el plano donde el valor de rigidez es menor.

$$SI = [(EI)_{os}/(EI)_c]_{min}$$

**Ecuación 4. Ecuación que define el índice de rigidez.**

- Otro parámetro es el **índice de área** (Area-Ratio, **AR**) (ecuación 5), que nos permite evaluar la rigidez del hueso de una forma global respecto a la de su contralateral sano, partiendo de los valores del semieje mayor (a) y semieje menor (b) que definen la elipse. Es una forma de analizar la relación que existe entre las superficies de ambas elipses, representándose con ella la relación entre la rigidez total en cada uno de los casos. El valor de esta relación varía entre 0 y 1; cuánto más se aproxime a la unidad será indicativo de que la rigidez de la tibia osteotomizada es más similar a la de la tibia intacta.

$$AR = (ab)_{os}/(ab)_c$$

**Ecuación 5: Ecuación que define la relación de áreas.**

- El tercer parámetro es el **índice de planitud** (Flatness-Ratio, FR) (ecuación 6), que se define como la relación entre las planitudes de ambas elipses, de forma que los valores inferiores a 1 indican que la planitud de la rigidez del callo es inferior a la del hueso, es decir que el callo presenta una rigidez menos simétrica y más orientada que el hueso sano. A medida que el callo vaya reparando y remodelándose, la elipse deberá ir orientándose y acercando su excentricidad a la del hueso sano. Cuando se alcanza el valor de 1, indicaría que no existen diferencias entre el hueso control y el osteotomizado.

$$FR = (b/a)_{os} / (b/a)_c$$

**Ecuación 6.: Ecuación que define el índice de planitud.**

Una vez completados los ensayos de flexión, los huesos son ensayados de nuevo para caracterizar su comportamiento a torsión mediante ensayo destructivo.

- **Ensayo de torsión destructivo:**

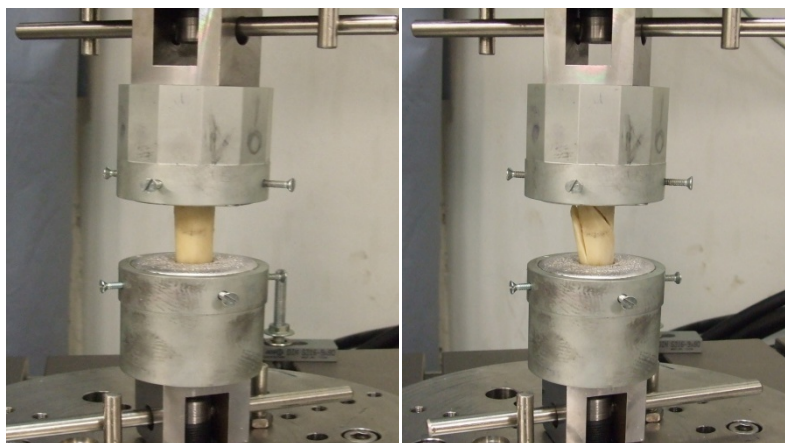
Para la realización del ensayo a torsión se fija el espécimen a una máquina universal de ensayos (Modelo INSTRON 8874/511/147) con una carga máxima de 15 kg. Quedando una longitud libre del espécimen de 40 mm.

Las condiciones de ensayo son:

- Control por desplazamiento angular.
- Velocidad del desplazamiento de actuador de 0.25°/min.
- Fin de ensayo: rotura de la tibia.



El ensayo destructivo a torsión permite conocer diversas características mecánicas tanto de la tibia osteotomizada como de la contralateral sana. Este tipo de ensayo no es sensible a la asimetría del hueso y del callo y, por tanto tampoco a la orientación de los especímenes durante la realización del mismo<sup>210,234,240,241</sup> (figura 10).



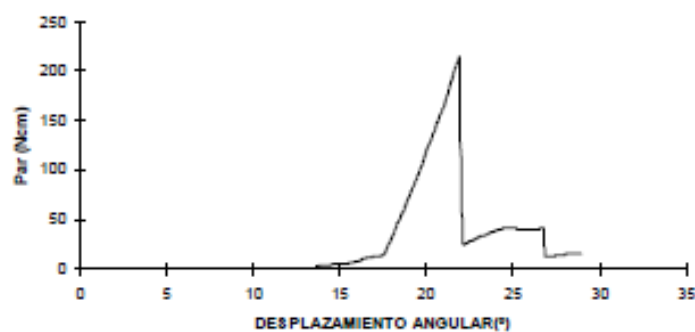
**Figura 10. Ensayo de torsión y fin del ensayo con rotura tibial.**

El ensayo se realiza en control por desplazamiento, con una velocidad de  $0.25^\circ/\text{min}$ <sup>245</sup> registrando simultáneamente el momento torsor aplicado y el giro relativo entre los extremos de la muestra. Se utiliza esta baja velocidad debido al comportamiento viscoelástico del tejido óseo que es capaz de absorber una mayor cantidad de energía a velocidades elevadas, por lo que, pequeñas variaciones en la velocidad de aplicación podrían provocar grandes diferencias en la absorción de energía<sup>241</sup>. Una baja velocidad minimiza estos efectos inerciales.

Puesto que los callos incipientes presentan un comportamiento plástico y es difícil llevarlos a rotura, la condición de fin de ensayo es la rotura del hueso

reparado (en los que esta se alcanza) o un giro relativo máximo entre mordazas de 90°.

Mediante este ensayo obtenemos un tipo de gráfica similar a la que se muestra en la Figura 11.



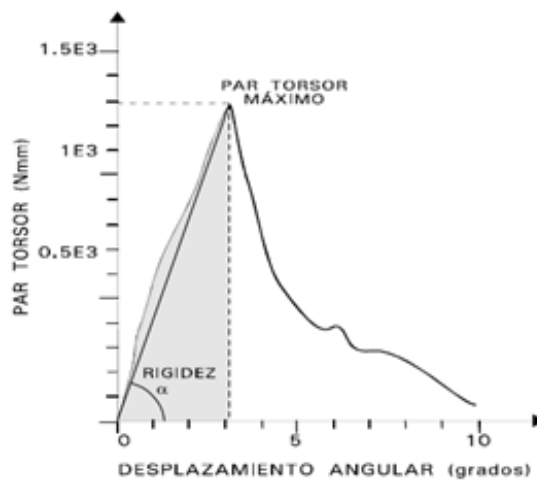
**Figura 11. Grafica obtenida del ensayo a torsión.**

Los parámetros obtenidos del ensayo de torsión son de especial interés desde el punto de vista de la resolución de una fractura; más concretamente el **par torsor máximo**, que es aquel punto en el que el hueso llega al punto de rotura, obteniéndose por tanto información sobre las características resistivas del hueso en la fase en que se encuentra, bajo este modo de carga.

Los parámetros obtenidos a partir de esta gráfica son (figura 12):

1. **Par torsor máximo (Ncm):** es el valor del par torsor en el que el hueso rompe. Se obtiene directamente a partir de la curva par torsor-desplazamiento angular, siendo el par torsor máximo o resistencia a torsión el valor máximo que alcanza la curva.
2. **Ángulo de torsión o deformación angular máxima (°):** es aquel desplazamiento que sufre el hueso hasta que rompe.

3. **Energía absorbida o tenacidad ( $\text{Ncm}^\circ$ ):** energía que absorbe el hueso hasta su rotura. Corresponde al área de la gráfica a partir de que el hueso empieza a deformarse hasta su punto de rotura (Área sombreada de la figura 12).
4. **Rigidez torsional ( $\text{Ncm}/^\circ$ ):** relación que existe entre la carga aplicada y el desplazamiento observado. Corresponde a la pendiente de la curva en su zona lineal<sup>241</sup>.



**Figura 12. Gráfica de la curva par torsor- desplazamiento angular<sup>241</sup>.**

Al igual que los valores de los parámetros de flexión, estos también se muestran adimensionales referidos al hueso contralateral sano, de tal manera que se adquiere el valor de 1 cuando el parámetro analizado coincide con el valor del contralateral intacto.

### **4.3.- Estudios densitométricos:**

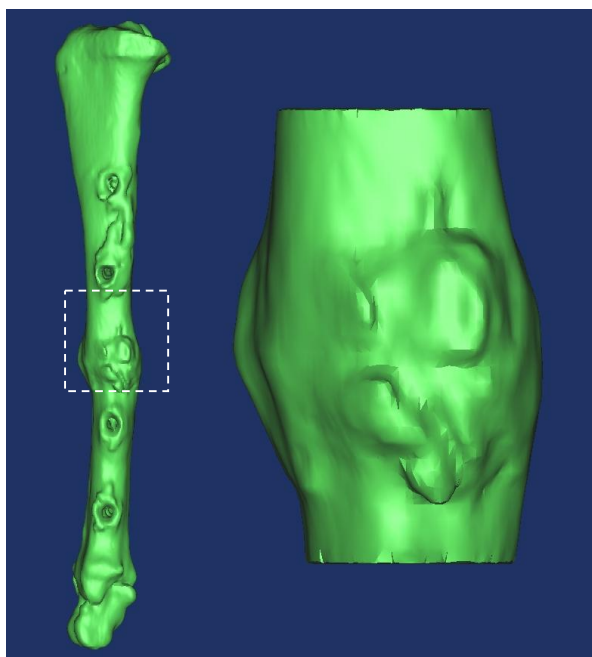
El estudio densitométrico ha sido realizado a partir de las imágenes de TAC suministradas por FIHCUV, mediante el uso del software de análisis de imagen clínica MIMICS v8.11 (Materialise).

Dado el tamaño y características del callo que presentaban las muestras, se decidió realizar dos tipos de estudios, un estudio que consideraba la totalidad del callo de fractura que se había generado en el proceso de reparación y otro estudio que consideraba exclusivamente el tejido comprendido entre los dos extremos de hueso sano.

#### **• Estudio densitométrico de la totalidad del callo:**

En este estudio se considera la totalidad del callo de fractura. Las variables con las que se trabajó en este caso fueron el volumen total del callo y la densidad media del mismo.

Con el objetivo de poder comparar todos los callos entre sí de forma sencilla, se consideró un tamaño de imagen que garantizara que en todos los casos se contaba con la totalidad del callo. Tras revisar la totalidad de muestras se determinó que el tamaño más adecuado correspondía al resultante de tomar 15 imágenes en sentido proximal desde la zona de fractura y otras 15 en sentido distal. Para ello se localizaba la imagen correspondiente a la zona de fractura y se seleccionaban las imágenes desde este punto de partida. Por tanto, el tamaño total de la zona de interés corresponde a 31 cortes (38,75 mm) en la dirección del eje axial de las imágenes (figura 13).



**Figura 13. Selección de la región de interés para la el estudio densitométrico de la totalidad del callo.**

Las variables de estudio consideradas son:

- **Volumen total del tejido óseo** en la zona de estudio ( $V_{tot31}$ ). Este se obtiene mediante la generación de una “máscara” o isodensidad en la cual se selecciona todo el tejido que posee una densidad mayor a 226 unidades de Hounsfield (HU), cifra a partir de la cual se considera que el tejido seleccionado es tejido óseo mineralizado<sup>246</sup>.
  - **Densidad media del tejido** en la zona de estudio ( $D_{tot31}$ ). Este valor corresponde a la densidad media del volumen total seleccionado en la variable anterior.
- ***Estudio densitométrico de la zona de fractura***

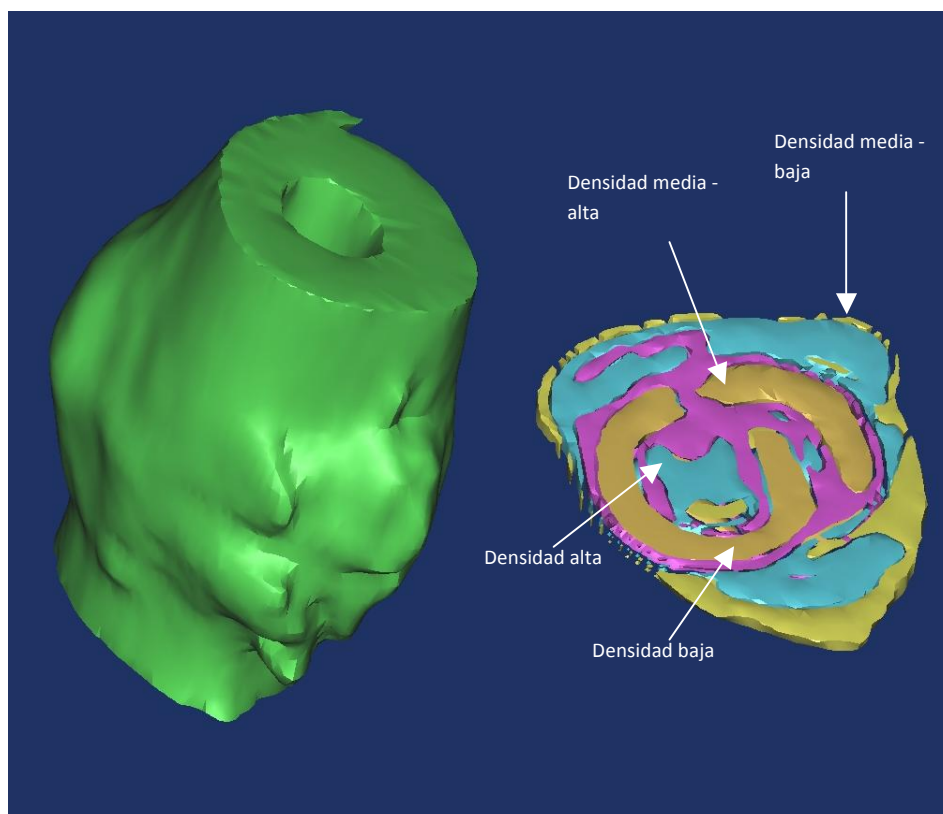
En este estudio sólo se considera el tejido óseo mineralizado que se encuentra en la zona de fractura. Este espacio de fractura varía entre

muestras, por lo que la selección de esta región de interés se realiza de forma manual para cada una de las muestras de callo (tabla 2).

**Tabla 2. Número de cortes considerados para cada una de las muestras del estudio.**

<b>Control 1 (1 Corte)</b>	<b>PTH. 1 (2 Cortes)</b>
<b>Control 2 (1 Corte)</b>	<b>PTH. 2 (2 Cortes)</b>
<b>Control 3 (3 Cortes)</b>	<b>PTH. 3 (2 Cortes)</b>
<b>Control 4 (3 Cortes)</b>	<b>PTH. 4 (2 Cortes)</b>
<b>Control 5 (2 Cortes)</b>	<b>PTH. 6 (2 Cortes)</b>
<b>Control 6 (1 Corte)</b>	<b>PTH. 7 (2 Cortes)</b>
<b>Control 7 (1 Corte)</b>	

El objetivo de esta parte del trabajo es estudiar la distribución de la densidad mineral ósea y los volúmenes del tejido presente en la zona de fractura, con el objetivo de encontrar diferencias entre la estructura de los callos generados en cada uno de los grupos del estudio. Para ello, el rango total de densidades óseas se divide en cuatro, de modo que se generan las cuatro isodensidades o máscaras de densidad similar en las cuales se basará el estudio (figura 14).



**Figura 14. Representación 3D de las isodensidades generadas para el estudio del callo en la zona de fractura.**

En la tabla 3 encontramos los rangos de densidad comprendidos en cada una de las capas de isodensidad consideradas en el estudio.

**Tabla 3. Rangos de densidades consideradas en cada una de las isodensidades o “máscaras” utilizadas para el estudio densitométrico.**

Isodensidad total	226 HU - densidad máxima de la muestra	$0,163 \text{ g/mm}^3$ – densidad máxima de la muestra
Isodensidad 1	226 HU - 876 HU	$0,163 \text{ g/mm}^3$ – $0,657 \text{ g/mm}^3$
Isodensidad 2	877 HU - 1527 HU	$0,658 \text{ g/mm}^3$ – $1,152 \text{ g/mm}^3$
Isodensidad 3	1528 HU - 2178 HU	$1,153 \text{ g/mm}^3$ – $1,648 \text{ g/mm}^3$
Isodensidad 4	2179 HU - densidad máxima de la muestra	$1,649 \text{ g/mm}^3$ – densidad máxima de la muestra

Para la conversión de las unidades de número de Hounsfield en densidad mineral se utiliza un patrón interno realizado por el IBV en estudios densitométricos previos. Se utiliza este patrón por dos razones:

- La no utilización de patrones internos en los análisis de TAC, sin los cuales no puede hacerse la conversión correspondiente a las unidades de densidad ósea mineral.
- El patrón utilizado ha sido realizado en las mismas instalaciones y con el mismo equipo de TAC que el análisis realizado para las muestras del presente estudio.

En la ecuación 7 se expresa la ecuación de la recta que permite la conversión de la HU a unidades de densidad, g/mm<sup>3</sup>.

$$\rho = 0,000761 \cdot HU - 0,0094866$$

**Ecuación 7: Recta de calibrado para el cálculo de densidades óseas a partir del número de Hounsfield obtenido por TAC.**

Las variables que se han tenido en cuenta son las siguientes:

- Volumen de hueso total en la zona del espacio de fractura (Vhuesot).
- Volumen de hueso correspondiente a la Isodensidad 1 en la zona del espacio de fractura (Vhueso1).



- Volumen de hueso correspondiente a la Isodensidad 2 en la zona del espacio de fractura ( $V_{\text{hueso2}}$ ).
- Volumen de hueso correspondiente a la Isodensidad 3 en la zona del espacio de fractura ( $V_{\text{hueso3}}$ ).
- Volumen de hueso correspondiente a la Isodensidad 4 en la zona del espacio de fractura ( $V_{\text{hueso4}}$ ).
- Densidad media total del hueso en el espacio de fractura ( $dm_t$ ).
- Densidad media correspondiente a la Isodensidad 1 en el espacio de fractura ( $dm_1$ ).
- Densidad media correspondiente a la Isodensidad 2 en el espacio de fractura ( $dm_2$ ).
- Densidad media correspondiente a la Isodensidad 3 en el espacio de fractura ( $dm_3$ ).
- Densidad media correspondiente a la Isodensidad 4 en el espacio de fractura ( $dm_4$ ).

#### **4.4.- Tratamiento estadístico:**

Todas las herramientas estadísticas empleadas en el análisis de resultados del presente trabajo se encuentran implementadas en el programa SPSS para Windows (v. 16.0).

El análisis de los resultados se ha basado en la realización de una comparación entre las medias de las variables de interés, con el objetivo de encontrar diferencias estadísticamente significativas debida al tratamiento

utilizado en el presente estudio respecto al grupo control. El método más adecuado para realizar esta comparación es el test de ANOVA o de análisis de varianzas. Para garantizar una correcta aplicación del mismo deben de cumplirse tres premisas:

1. Independencia: cada serie de datos debe ser independiente de las demás, esto es, los datos de una serie no deben estar correlacionados con los de otra.
2. Normalidad: la distribución interna de cada serie debe ser normal.
3. Homogeneidad: las varianzas de las series deben ser iguales.

Dado el tipo de estudio y las variables de interés consideradas, las dos primeras condiciones para la aplicación del test de análisis de varianza ANOVA se cumplen, por lo que solo habrá que comprobar la homogeneidad de varianzas de las variables a comparar, para lo cual se ha realizado el test estadístico de Levene.

Adicionalmente al test de ANOVA se ha realizado un test de contraste de comparación múltiple DMS, el cual permite realizar comparaciones entre medias por parejas de variables.

Tras el análisis de las variables densitométricas y mecánicas, se ha procedido a realizar un análisis de correlación de Pearson de dichas variables, con el objetivo de encontrar relaciones entre ellas que pudieran ayudar a explicar los resultados obtenidos.

# RESULTADOS

## 1.- MUESTRAS

Una vez obtenidas todas las muestras se tomaron las imágenes de TAC y se prepararon las tibias para la realización de los ensayos mecánicos.

Al estudiar las muestras comprobamos que algunas de ellas no podían utilizarse por diversos motivos que se detallan a continuación. Concretamente en el grupo control la muestra 4 presentaba un callo hipertrófico de elevado tamaño. Esta pata pertenecía a una oveja que durante el postoperatorio había sufrido una infección superficial del trayecto de los tornillos del fijador externo que se resolvió con curas locales y tratamiento antibiótico, pero que produjo alteraciones en la consolidación ósea; por lo que decidimos excluirla de los estudios densitométrico y biomecánico.

Al descongelar las muestras para realizar el estudio biomecánico se produjo la rotura del callo en cuatro muestras más, las muestras 3 y 6 del grupo control y las muestras 3 y 7 del grupo PTH. En la tabla 15 se recoge las observaciones e incidencias para cada una de las muestras, con el objetivo de excluir aquellas que presentaron un comportamiento anómalo y que pudiera interferir en el posterior tratamiento e interpretación de los resultados.

**Tabla 4. Recopilación de observaciones para cada una de las muestras tras la preparación y realización de los ensayos mecánicos y estudios densitométricos.**

	<b>Observaciones densitometría</b>	<b>Validez densitometría</b>	<b>Observaciones mecánicos</b>	<b>Validez mecánicos</b>
CON 1 (89)	-	Válido	-	Válido
CON 2 (29)	-	Válido	-	Válido
CON 3 (54)	-	Válido	Al ser descongelado el callo está aparentemente roto. No se prepara para ser ensayado	No válido
CON 4 (10)	Callo muy grande, posiblemente debido a una mala colocación del fijador	No válido	-	No válido
CON 5 (17)	Fractura desplazada	Válido	-	Válido
CON 6 (87)	Fractura colapsada	Válido	Se realiza el ensayo de F4P, pero en la preparación para el ensayo de torsión el callo se rompe	No válido
CON 7 (70)	Fractura ligeramente desplazada	Válido	-	Válido
PTH 1 (59)	Fractura desplazada	Válido	-	Válido
PTH 2 (80)	Fractura desplazada	Válido	-	Válido
PTH 3 (81)	Fractura desplazada	Válido	-	No Válido
PTH 4 (107)	Fractura desplazada	Válido	-	Válido
PTH 6 (96)	-	Válido	-	Válido
PTH 7 (14)	Fractura ligeramente desplazada	Válido	Se realiza el ensayo de F4P, pero en la preparación para el ensayo de torsión el callo se rompe	No válido

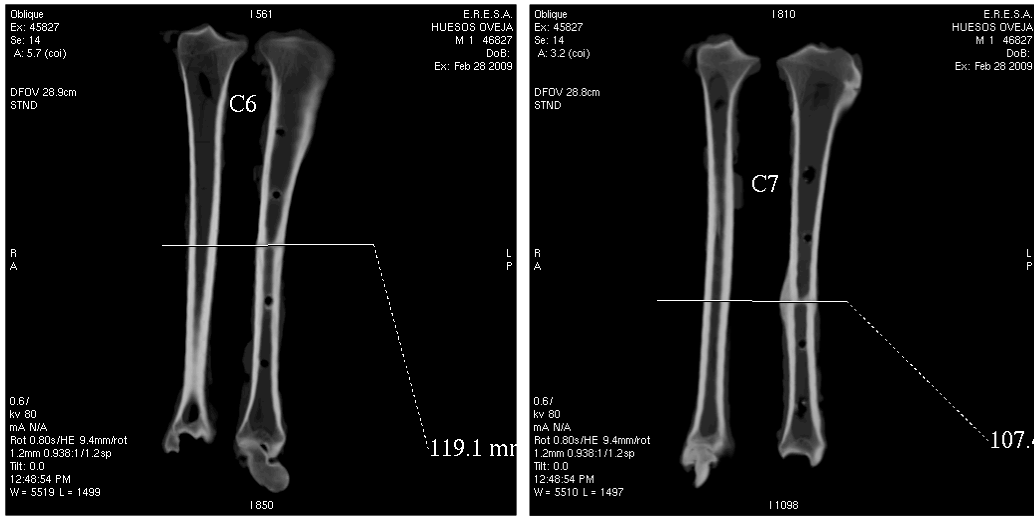
Por lo tanto, al final de la parte experimental hemos conseguido analizar 6 ovejas en el grupo control y 6 en el grupo PTH para los estudios densitométricos, y 4 ovejas en el grupo control y 4 en el grupo PTH para los estudios mecánicos.

Estas incidencias han disminuido de forma importante el número de muestras pero han sido suficientes, desde el punto de vista estadístico para analizar los resultados gracias a su distribución normal dentro del estudio.

## 2.- ESTUDIO MEDIANTE TAC

En la figura 15 podemos observar las imágenes de los cortes coronales de las parejas de tibias de los animales del grupo control. En cada imagen aparece la tibia sana y la contralateral observando el trayecto de los tornillos del fijador y la zona de la osteotomía que está señalizada con una línea y que ha servido de referencia para el número del corte a partir del cual se ha reconstruido los cortes axiales.

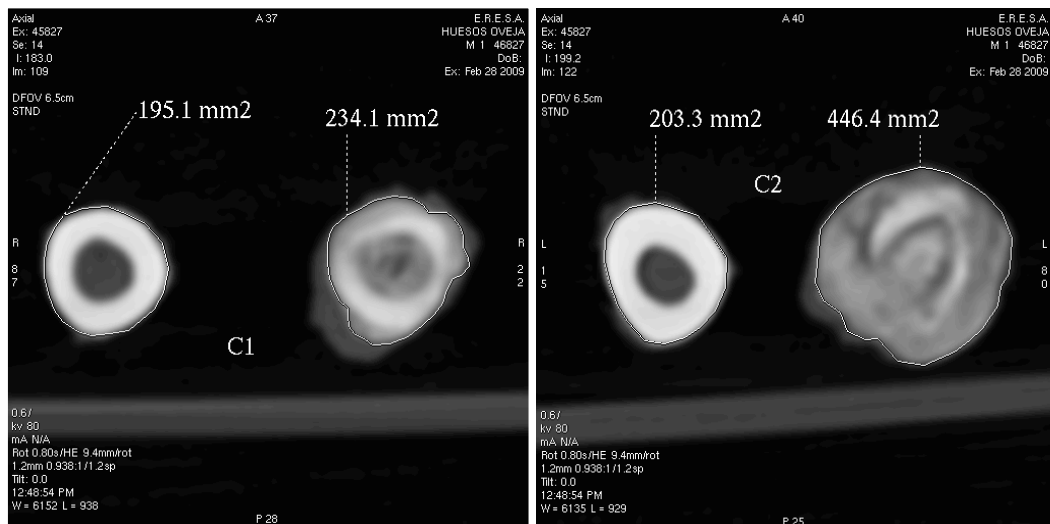


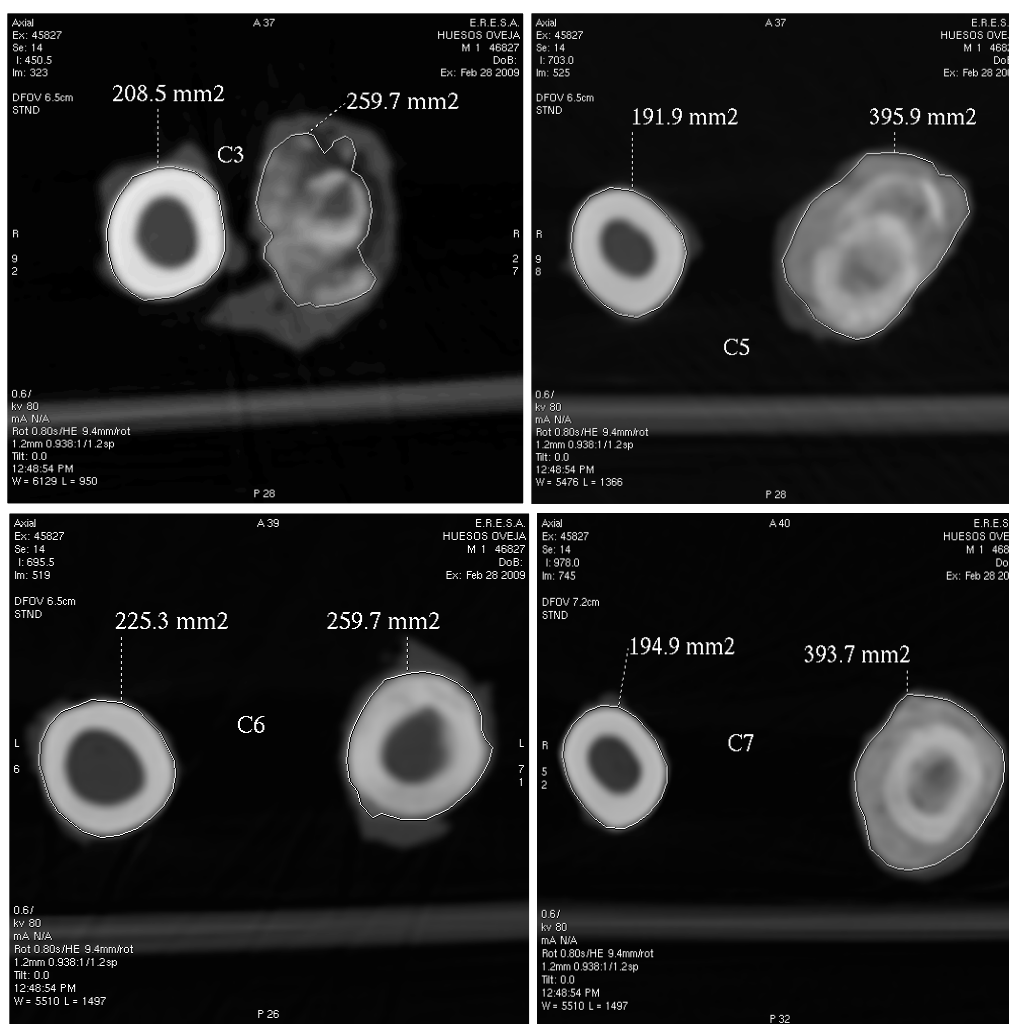


**Figura 15: Imágenes de las tibias del grupo control en cortes coronales.**

**La línea horizontal corresponde al corte a partir del cual se ha reconstruido la proyección axial.**

En la figura 16 podemos observar los cortes axiales de las tibias operadas y no operadas de las ovejas del grupo control. La imagen se ha reconstruido a partir del corte del punto medio de la tibia, en el lugar de la osteotomía de la tibia intervenida. En estas imágenes se indica la superficie ocupada por el callo en cada corte (en  $\text{mm}^2$ ).

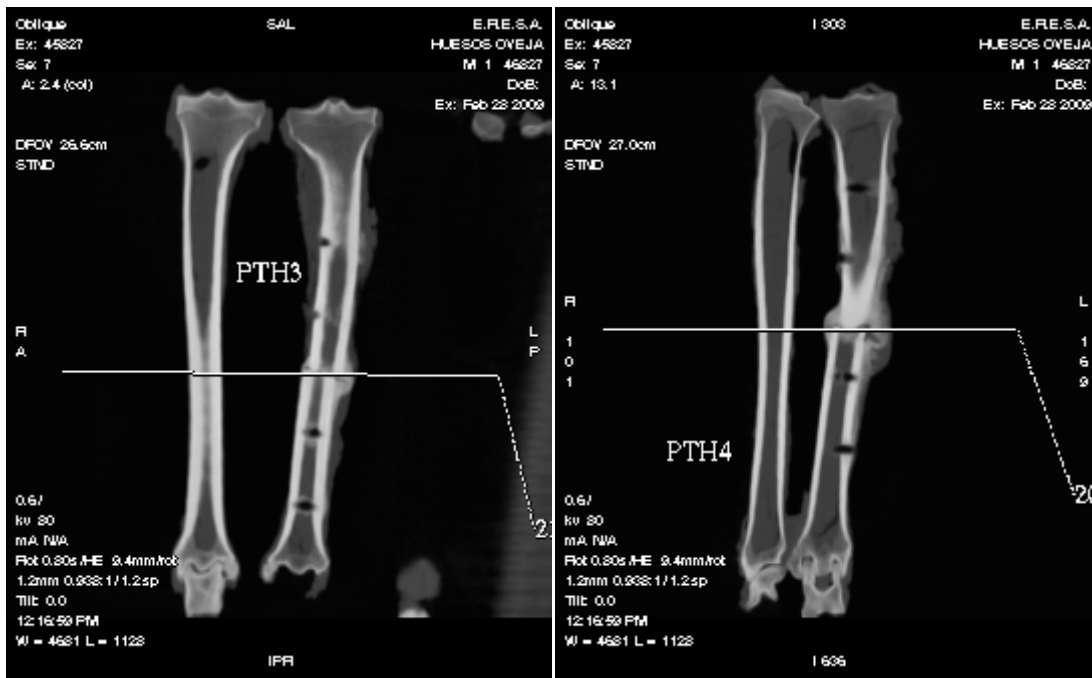




**Figura 16. Cortes axiales a nivel de la osteotomía de las tibias intervenidas y al mismo nivel en las tibias contralaterales del grupo control. Se ha medido la superficie de cada corte.**

De la misma forma se ha procedido en la toma de imágenes para las tibias que forman el grupo de ovejas tratadas con Hormona Paratiroidea. En la figura 17 podemos observar las imágenes de los cortes coronales de las parejas de tibias de los animales del grupo PTH. En cada imagen vemos la tibia sana y la contralateral observando el trayecto de los tornillos del fijador y la zona de la osteotomía que está señalizada con una línea que ha servido de referencia para el número del corte a partir del cual se han reconstruido los cortes axiales.



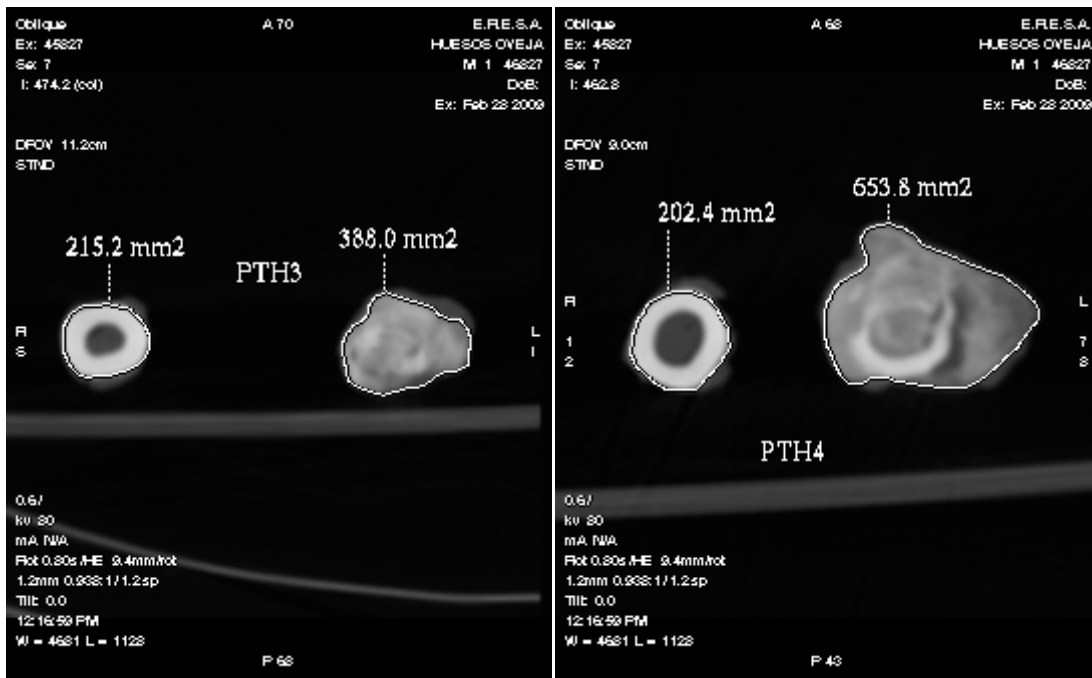
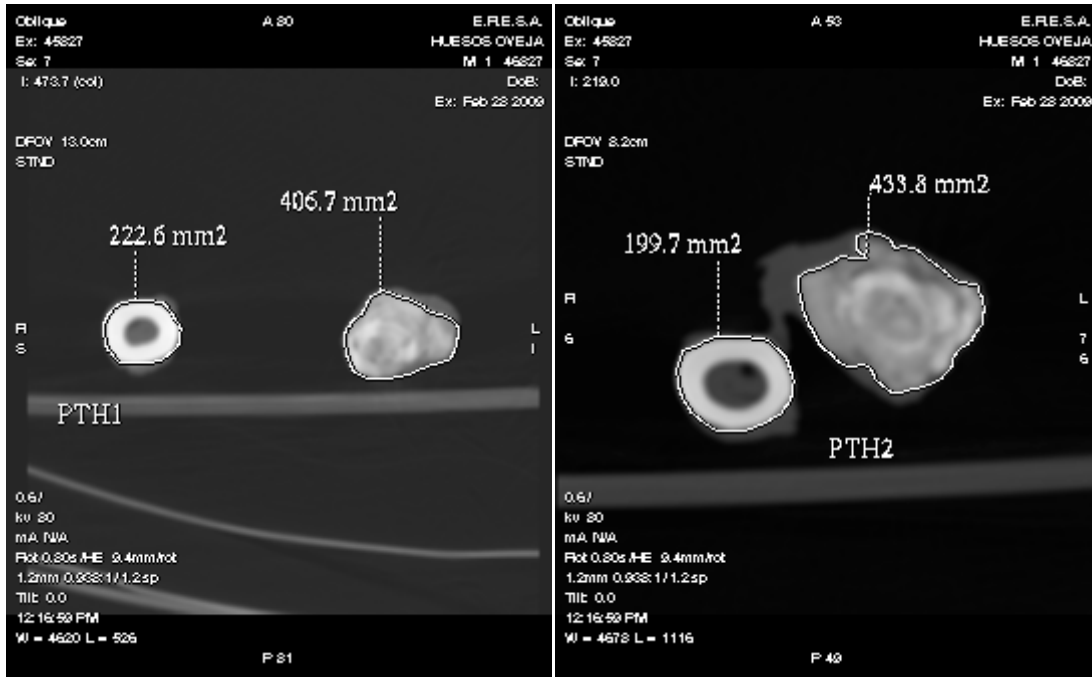


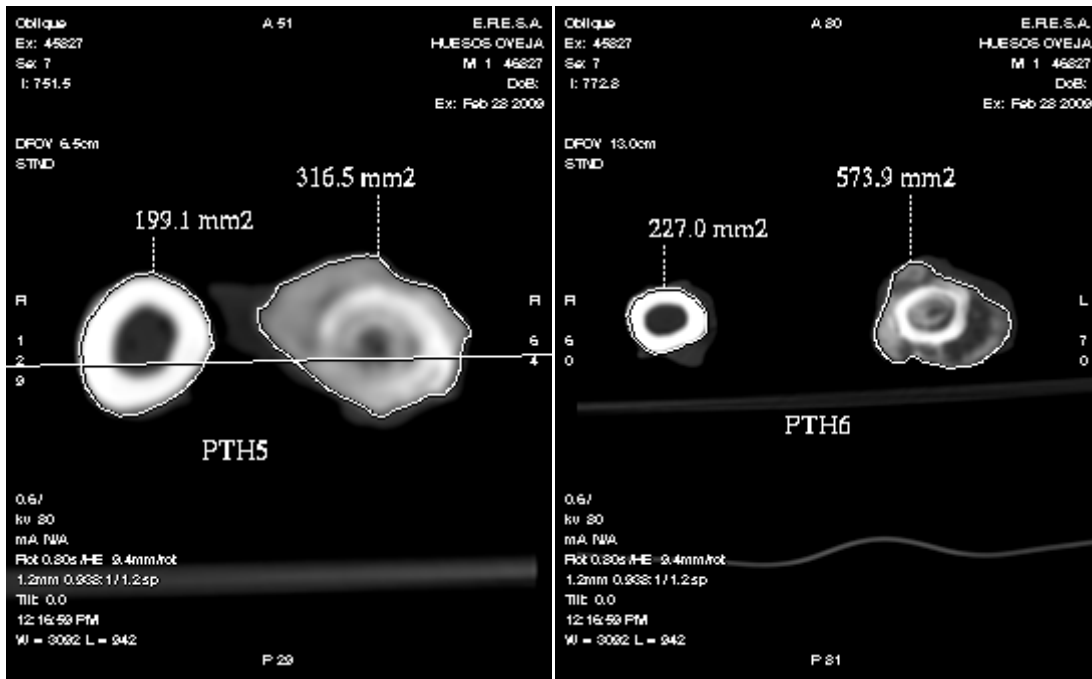


**Figura 17: Imágenes de las tibias del grupo tratado con Hormona Paratiroidea (PTH) en cortes coronales. La línea horizontal corresponde al corte a partir del cual se ha reconstruido la proyección axial.**

En la figura 18 podemos observar los cortes axiales de las tibias operadas y no operadas de cada oveja del grupo PTH. La imagen se ha reconstruido a partir del corte del punto medio de la tibia, en el lugar de la osteotomía de la tibia intervenida. Se ha medido la superficie del corte en  $\text{mm}^2$ .

RESULTADOS





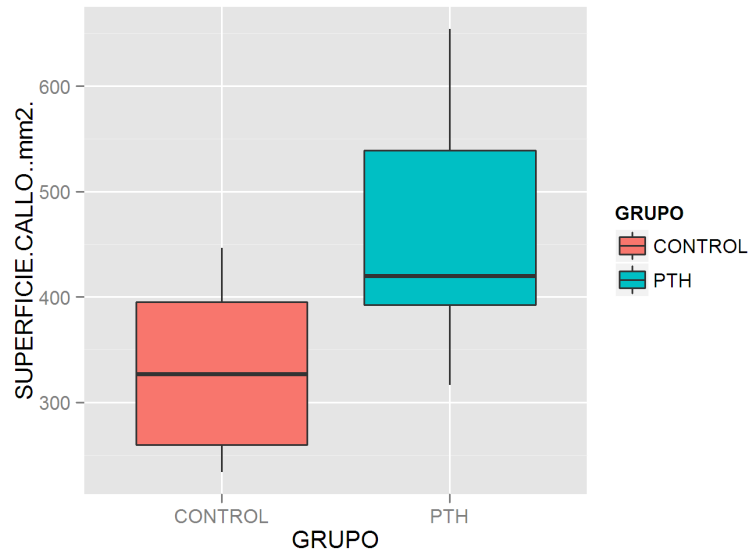
**Figura 18. Cortes axiales a nivel de la osteotomía de las tibias intervenidas y al mismo nivel en las tibias contralaterales del grupo tratado con Hormona Paratiroidea (PTH). Se ha medido la superficie de cada corte.**

En los cortes axiales hemos medido el área del callo en el corte medio de la osteotomía y el área de la diáfisis tibial en el corte equivalente de la tibia sana y hemos calculado el aumento de la misma en la zona del callo con respecto a la diáfisis normal de la tibia no operada. En la tabla 5 se recogen estos datos para los dos grupos.

**Tabla 5. Valores de las superficies de corte de la tibia no operadas y del callo de fractura de las operadas tanto del grupo control como del grupo PTH expresado en mm<sup>2</sup> y medidos en los cortes axiales de TAC. También se expresa el aumento proporcional de la superficie del callo respecto a la de la tibia (REL).**

<b>GRUPO CON</b>	SUPERFICIE TIBIA no operada (mm <sup>2</sup> )	SUPERFICIE CALLO (mm <sup>2</sup> )	REL	<b>GRUPO PTH</b>	SUPERFICIE TIBIA no operada (mm <sup>2</sup> )	SUPERFICIE CALLO (mm <sup>2</sup> )	REL
C1	195,1	234,1	1,2	PTH1	222,6	406,7	1,8
C2	203,3	446,4	2,2	PTH2	199,7	433,8	2,2
C3	208,5	259,7	1,2	PTH3	215,2	388,0	1,8
C5	191,9	395,9	2,1	PTH4	202,4	653,8	3,2
C6	225,3	259,7	1,1	PTH5	199,1	316,5	1,6
C7	194,9	393,7	2,0	PTH6	227,0	573,9	2,6

En la figura 19 se representa el diagrama de cajas para la variable área del callo de los grupos control y PTH y en ella podemos observar que los callos de los huesos que habían sido tratados con PTH no variaron significativamente su área comparados con los callos del grupo control. Hay que destacar que aunque los valores medios de ambos grupos están bastante alejados entre sí (28.3%), la dispersión de los datos es también muy elevada (coeficiente de variación del 27.3%) lo que provoca que estas diferencias no sean significativas. En la tabla 6 se presenta la tabla de resumen de los descriptivos correspondientes a esta variable.



**Figura 19. Diagrama de cajas para la variable área de hueso obtenida a partir de imágenes de TAC para los callos de los grupos control y PTH.**

**Tabla 6. Descriptivos correspondientes a la variable área de hueso obtenida a partir de imágenes de TAC para los callos de los grupos control y PTH.**

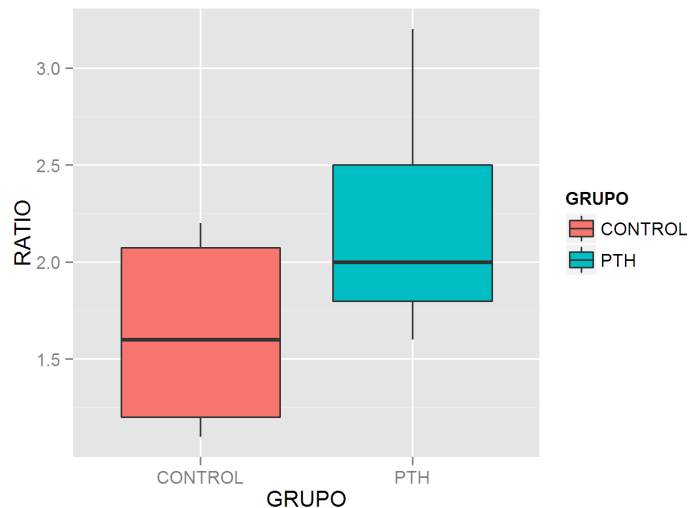
	GRUPO	Mean	St. Deviation	Valid N
1	<b>CONTROL</b>	<b>331.00</b>	<b>90.49</b>	<b>6</b>
2	<b>PTH</b>	<b>461.50</b>	<b>126.15</b>	<b>6</b>

Al realizar el Anova de los datos de la variable área del callo entre el grupo control y PTH comprobamos que las diferencias no son estadísticamente significativas (Tabla 7).

**Tabla 7. Test de ANOVA para la variable área de hueso obtenida a partir de imágenes de TAC para los callos de los grupos control y PTH.**

	F	(num df,denom df)	p-value
<b>SUP_TIBIA</b>	1.20	(1,10)	0.2984
<b>SUP_CALLO</b>	4.24	(1,10)	0.0665
<b>RATIO_CALLO_TIBIA</b>	3.04	(1,10)	0.1121

Además, también hemos analizado la variable de relación de áreas, es decir, la relación del área del callo con respecto al área del mismo corte en la diáfisis de la tibia contralateral no intervenida para asegurarnos que las diferencias en los diámetros de las tibias no distorsiona los resultados encontrados. En la figura 20 se representa el diagrama de cajas para esta variable y en la tabla 8 se presenta la tabla resumen de los descriptivos correspondientes.



**Figura 20. Diagrama de cajas correspondiente a la variable relación de áreas para los callos de los grupos control y PTH.**

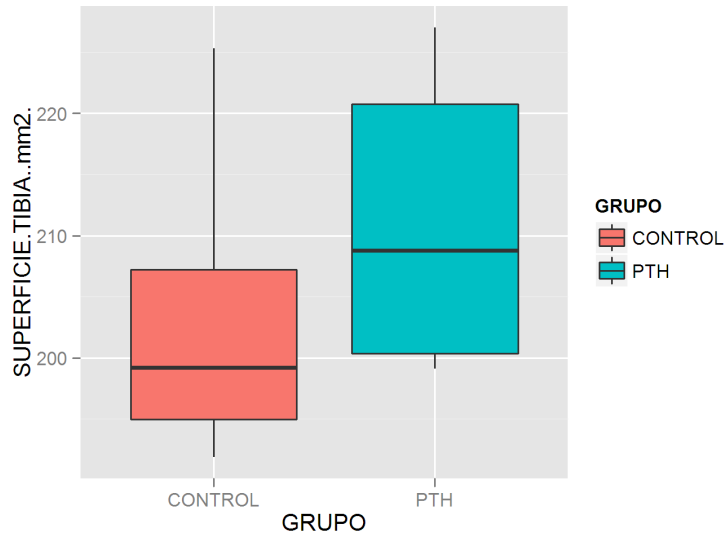
**Tabla 8. Descriptivos correspondientes a la variable relación de áreas para los callos de los grupos control y PTH.**

	GRUPO	Mean	St. Deviation	Valid N
1	CONTROL	1.63	0.516	6
2	PTH	2.20	0.607	6

Al realizar el test de Anova comprobamos que las diferencias no son estadísticamente significativas cuando comparamos los valores obtenidos para la variable relación de áreas de los grupos control y PTH (tabla 7).

También hemos comparado el área de la diáfisis de las tibias no operadas de los dos grupos para analizar si el tratamiento con PTH afecta a los huesos osteoporóticos no operados y hemos comprobado que esta hormona no produce diferencias significativas en el área de la diáfisis de las tibias analizadas. En la figura 21 se representa el diagrama de cajas para la variable de hueso no operado de los dos grupos, en la tabla 10 se presenta la tabla resumen de los descriptivos correspondientes y en la tabla 8 el análisis de Anova realizado que demuestra que este aumento no es estadísticamente significativo.





**Figura 21. Diagrama de cajas para la variable área de hueso obtenida a partir de imágenes de TAC para los huesos no operados de los grupos control y PTH.**

**Tabla 9. Descriptivos correspondientes a la variable área de hueso obtenida a partir de imágenes de TAC para los huesos no operados de los grupos control y PTH.**

	GRUPO	Mean	St. Deviation	Valid N
1	CONTROL	203.17	12.48	6
2	PTH	211.00	12.26	6

### **3.- ENSAYOS BIOMECÁNICOS**

Se presentan de forma descriptiva los resultados de los ensayos biomecánicos de flexión a cuatro puntos y de torsión.

Para describir los resultados de **flexión a cuatro puntos** se ha utilizado dos tipos de gráficas:

- Elipses del perfil polar de rigidez a flexión (PPRF).
- Gráficas de cajas y arbotantes.

Para describir los resultados de los ensayos de **torsión** se han utilizado:

- Gráficas de cajas y arbotantes.

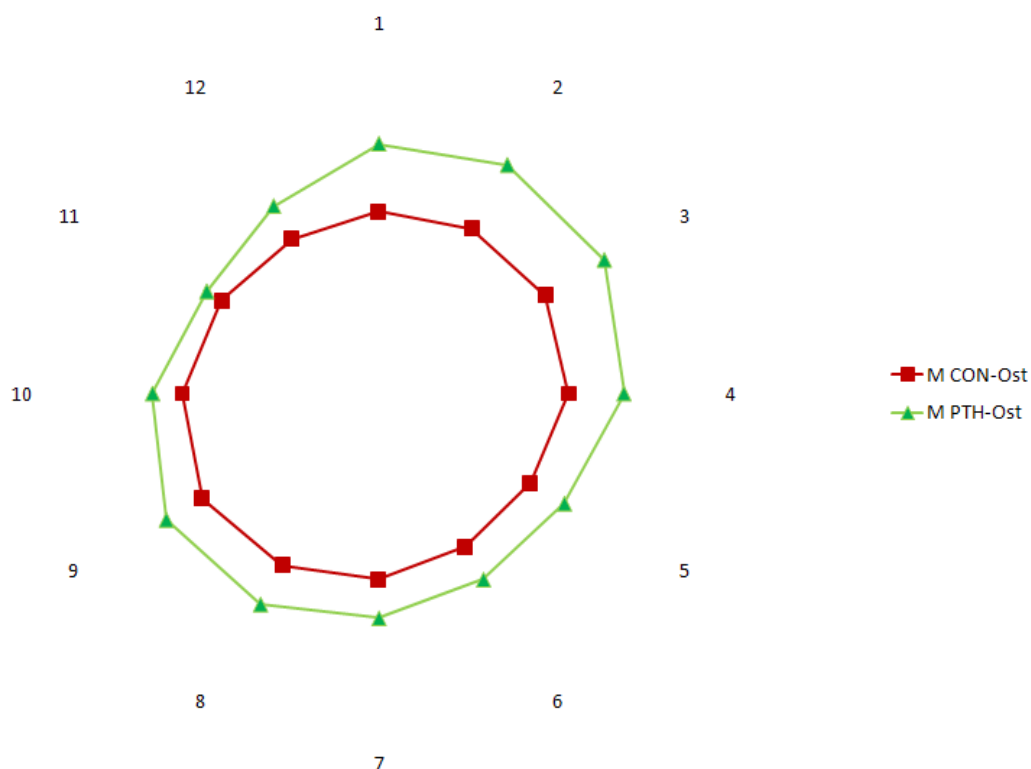
#### **3.1.- Ensayos de flexión a 4 puntos (F4P)**

El objetivo del ensayo de flexión a cuatro puntos es la determinación de la rigidez del callo de fractura, frente a los distintos tratamientos, en la fase de reparación en el que se encuentra la fractura en el momento de sacrificio del animal.

- **Perfil polar de rigidez (PPRF)**

Como se ha descrito anteriormente en el apartado de Materiales y Métodos, a partir de los valores de rigidez en los distintos planos se generan las gráficas

del perfil polar de rigidez que a continuación se muestran en las figuras 22 y 23. Este tipo de gráficos nos muestra de una manera cualitativa las diferencias que existen entre los dos grupos. Los resultados se detallan por un lado, en el análisis de los huesos osteotomizados (figura 22) y por otro, en el análisis de los huesos contralaterales no operados (figura 23).

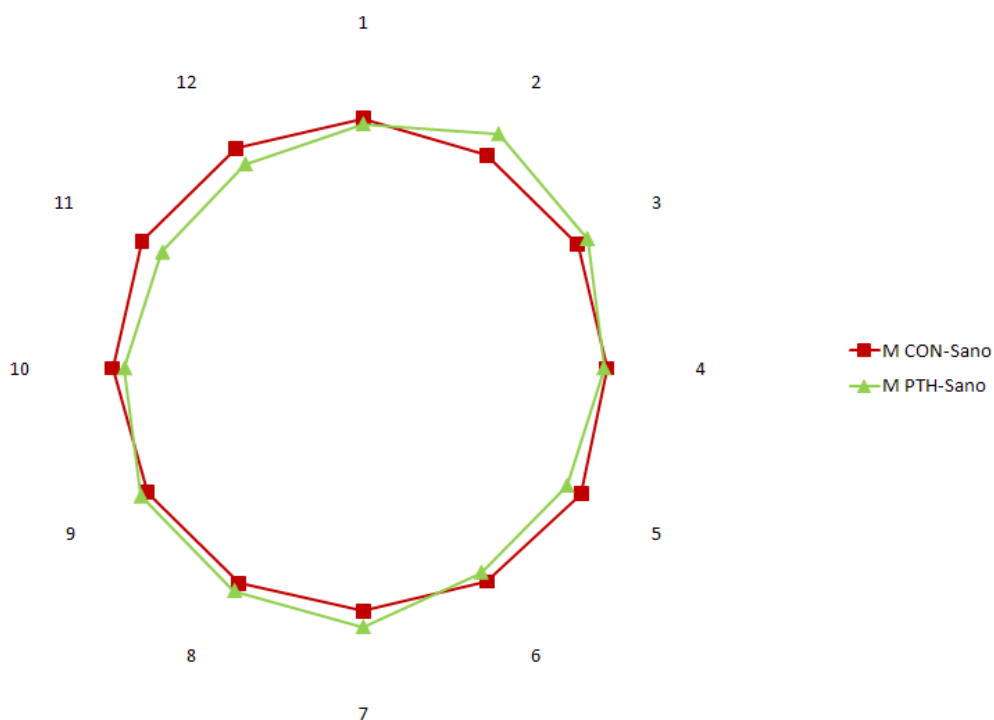


**Figura 22. Elipses de perfil polar de rigidez de los huesos osteotomizados.**

En el análisis de los datos del perfil polar de rigidez en los huesos osteotomizados observamos que el grupo Control, que no ha estado sometido a tratamiento farmacológico, muestra rigideces menores a las de los huesos tratados con PTH, pero lo más significativo es el cambio en el patrón de distribución de los valores de rigidez en los diferentes planos. Mientras que el grupo Control tiene una distribución prácticamente circular, el grupo PTH

muestra una elipse aplanada en el eje transversal de modo que los máximos valores los encontramos en los planos 2-8 y 3-9 (Figura 22).

Al comparar sólo los huesos no operados vemos que el grupo PTH obtiene valores similares al grupo control (Figura 23). En este caso no se observan diferencias de orientación de los planos de rigidez en ambos grupos, siendo ambos gráficos circulares.



**Figura 23. Elipses de perfil polar de rigidez para los huesos contralaterales no operados.**

- **Tablas y gráficas de cajas y arbotantes**

En la tabla 10 se muestran los valores de parámetros a flexión: índice de área (AR), índice de rigidez (SI) e índice de planitud (FR). Los descriptivos correspondientes se muestran en la tabla 11.

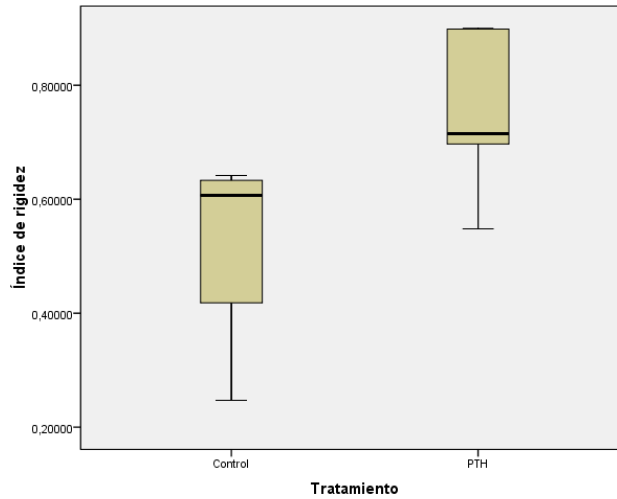
**Tabla 10. Tabla de valores del ensayo de flexión a cuatro puntos.**

	Índice de área (AR)	Índice de planitud (FR)	Índice rigidez (SI)
Control 1 (89)	0,593	0,909	0,625
Control 2 (29)	0,109	0,962	0,247
Control 5 (17)	0,974	0,416	0,642
Control 7 (70)	0,540	0,763	0,589
PTH. 1 (59)	0,518	0,688	0,548
PTH. 2 (80)	1,146	0,494	0,697
PTH. 3 (81)	0,635	1,116	0,715
PTH. 4 (107)	1,069	1,249	0,899
PTH. 6 (96)	1,185	0,681	0,899

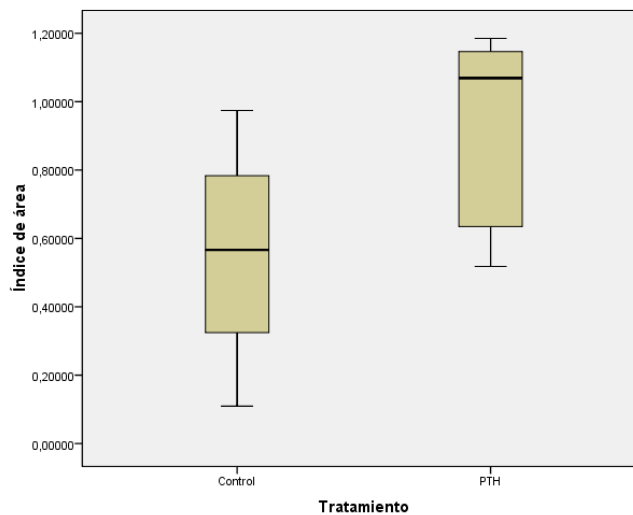
**Tabla 11. Tabla de descriptivos para las variables obtenidas mediante el ensayo de flexión a cuatro puntos.**

		Descriptivos							
		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Índice de rigidez	Control	4	,5256254	,18699217	,09349608	,2280791	,8231717	,24706	,64168
	PTH	4	,7606478	,17078021	,08539011	,4888983	1,0323972	,54800	,89923
	Total	8	,6431366	,20800648	,07354140	,4692388	,8170344	,24706	,89923
Índice de área	Control	4	,5540602	,35400792	,17700396	-,0092454	1,1173658	,10928	,97406
	PTH	4	,9795895	,31143821	,15571911	,4840218	1,4751572	,51808	1,18497
	Total	8	,7668249	,38342377	,13556077	,4462746	1,0873752	,10928	1,18497
Índice de planitud	Control	4	,7625377	,24561902	,12280951	,3717030	1,1533724	,41633	,96201
	PTH	4	,7779963	,32678853	,16339427	,2580028	1,2979897	,49361	1,24918
	Total	8	,7702670	,26775156	,09466447	,5464211	,9941129	,41633	1,24918

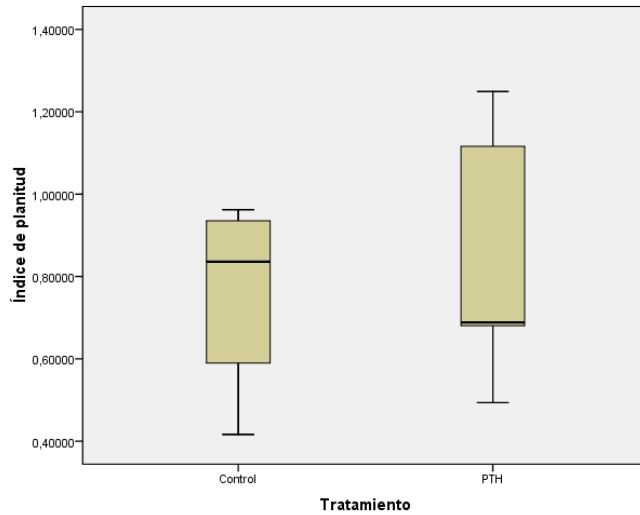
En las figuras 24, 25 y 26 se presentan los diagramas de cajas y arbotantes correspondientes a los valores de los parámetros de flexión: índice de rigidez (SI), índice de área (AR) e índice de planitud (FR).



**Figura 24. Gráfica de cajas y arbotantes de la variable índice de rigidez.**



**Figura25. Gráfica de cajas y arbotantes de la variable índice de área.**



**Figura 26. Gráfica de cajas y arbotantes de la variable índice de planitud.**

Tras realizar un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (Tabla 12), tomando como variables dependientes los parámetros biomecánicos de flexión, índice de área, índice de rigidez e índice de planitud, y como variable independiente el factor tratamiento, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los 2 grupos para los parámetros biomecánicos obtenidos de los ensayos de flexión realizados. Este hecho indica que el comportamiento a flexión de los callos de fractura del grupo tratado con PTH no difiere significativamente del grupo control.

**Tabla 12. ANOVA de un factor de los parámetros de flexión para la comparación entre los grupos control y PTH.**

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Índice de rigidez	Inter-grupos	,110	1	,110	3,445	,113
	Intra-grupos	,192	6	,032		
	Total	,303	7			
Índice de área	Inter-grupos	,362	1	,362	3,258	,121
	Intra-grupos	,667	6	,111		
	Total	1,029	7			
Índice de planitud	Inter-grupos	,000	1	,000	,006	,942
	Intra-grupos	,501	6	,084		
	Total	,502	7			

### 3.2.- Ensayos de torsión

El objetivo del ensayo de torsión es la obtención de información relacionada con las características resistivas del hueso en reparación bajo distintos tratamientos, ya que la fuerza aplicada alcanza el punto de rotura del hueso.

En la tabla 13 se muestran los valores obtenidos para los porcentajes (%) de los parámetros de ensayos a torsión (tenacidad, rigidez torsional, par torsor), y en la tabla 14 el resumen de los descriptivos correspondientes a estos datos. Estos datos se expresan en % con respecto al valor del hueso contralateral sano del mismo animal.

**Tabla 13. Valores de los parámetros del ensayo a torsión.**

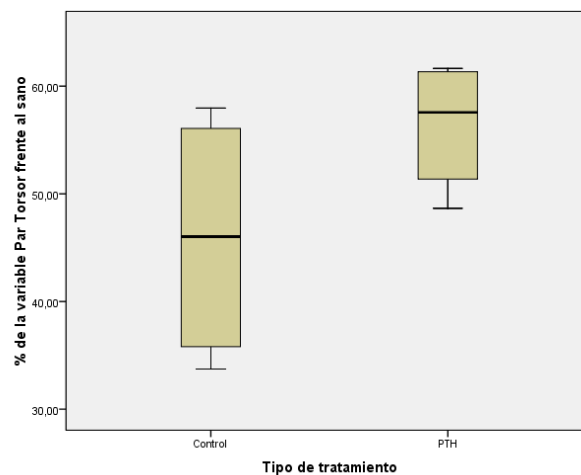
	<b>% Par torsor</b>	<b>% Tenacidad</b>	<b>% Rigidez torsional</b>
Control 1 (89)	37,87	7,12	117,53
Control 2 (29)	33,73	19,86	70,70
Control 5 (17)	54,19	27,79	121,31
Control (70)	57,97	34,78	88,94
PTH. 1 (59)	54,1	35,68	105,97
PTH. 2 (80)	48,65	26,12	93,20
PTH. 4 (107)	61,03	25,02	166,53
PTH. 6 (96)	61,65	38,28	144,83



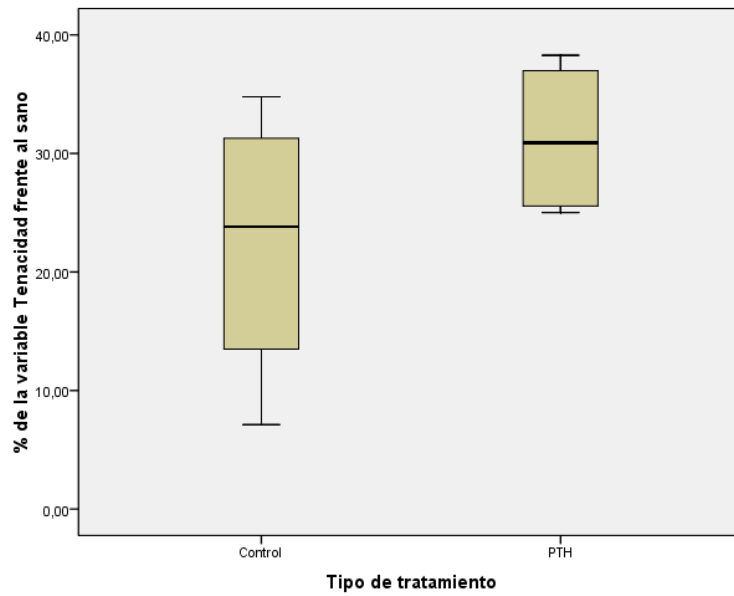
**Tabla 14. Tabla de descriptivos para las variables obtenidas mediante el ensayo de torsión para los huesos osteotomizados.**

		Descriptivos							
		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
% Par torsor	Control	4	45,94000	11,930247	5,965124	26,95631	64,92369	33,730	57,970
	PTH	4	56,35750	6,173726	3,086863	46,53372	66,18128	48,650	61,650
	Total	8	51,14875	10,408689	3,680027	42,44687	59,85063	33,730	61,650
% Tenacidad	Control	4	22,38750	11,863753	5,931876	3,50962	41,26538	7,120	34,780
	PTH	4	31,27500	6,687628	3,343814	20,63349	41,91651	25,020	38,280
	Total	8	26,83125	10,102293	3,571700	18,38552	35,27698	7,120	38,280
% Rigidez torsional	Control	4	99,62000	24,094626	12,047313	61,28007	137,95993	70,700	121,310
	PTH	4	127,63250	33,978574	16,989287	73,56501	181,69999	93,200	166,530
	Total	8	113,62625	31,109676	10,998932	87,61791	139,63459	70,700	166,530

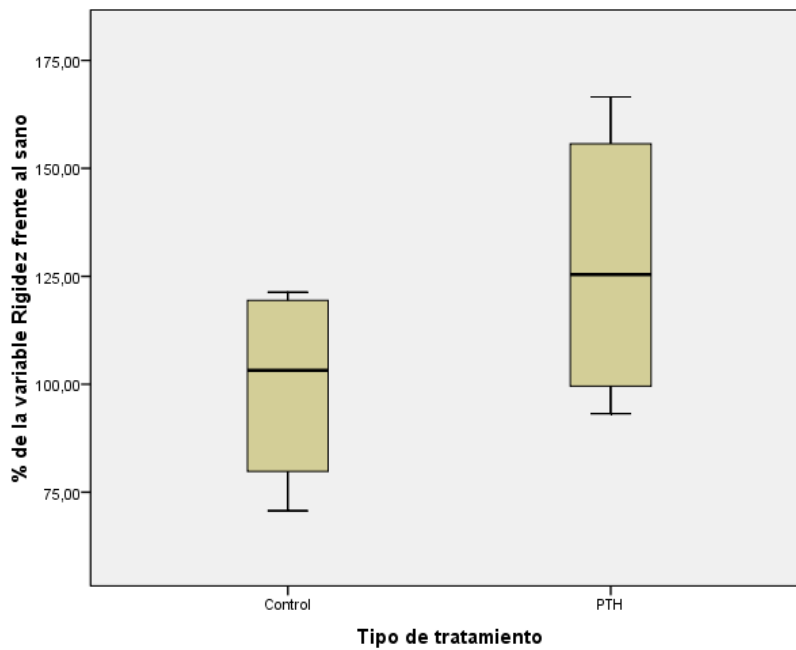
A continuación mostramos los diagramas de cajas para las variables de % del par torsor (figura 27), % de la tenacidad (figura 28) y % de la rigidez torsional (figura 29).



**Figura 27. Diagrama de cajas de la variable % par torsor para los huesos osteotomizados.**



**Figura 28. Diagrama de cajas de la variable % de tenacidad para los huesos osteotomizados.**



**Figura 29. Diagrama de cajas de la variable % rigidez torsional para los huesos osteotomizados.**

Para la variable de par torsor las diferencias entre el grupo control y el grupo PTH que parecen apreciarse no son estadísticamente significativas (figura 27). Para la variable de tenacidad, no hemos podido encontrar diferencias entre el control y el tratamiento con PTH (figura 28). En el análisis del diagrama de cajas para la rigidez torsional tampoco observamos diferencias cualitativas entre el grupo control y el grupo tratado con PTH (figura 29).

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor tomando como variables dependientes los % de los parámetros biomecánicos a torsión de tenacidad, par torsor y rigidez, y como variable independiente el factor tratamiento (tabla 15) y comprobamos que no había diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 15. ANOVA de un factor de las variables de % de par torsor, tenacidad y rigidez para los huesos osteotomizados.**

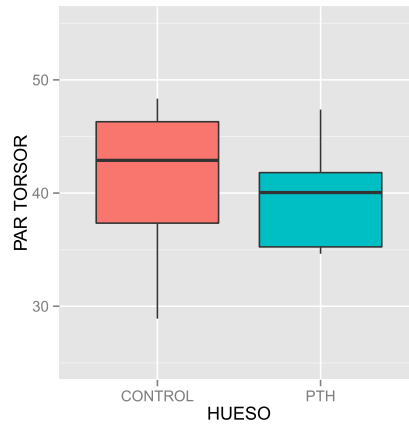
		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
% Par torsor	Inter-grupos	217,049	1	217,049	2,406	,172
	Intra-grupos	541,337	6	90,223		
	Total	758,386	7			
% Tenacidad	Inter-grupos	157,975	1	157,975	1,703	,240
	Intra-grupos	556,419	6	92,736		
	Total	714,394	7			
% Rigidez torsional	Inter-grupos	1569,400	1	1569,400	1,809	,227
	Intra-grupos	5205,283	6	867,547		
	Total	6774,684	7			

Hemos analizado también los resultados de los ensayos de torsión en las tibias contralaterales no operadas. En la tabla 16 se recogen los

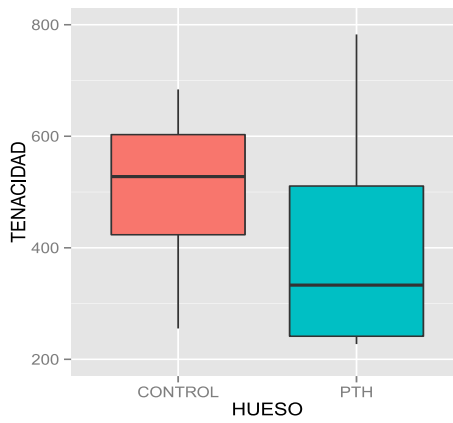
descriptivos para las variables obtenidas mediante el ensayo de torsión y en las figuras 30, 31 y 32 mostramos los diagramas de cajas para las variables de % del par torsor, % de la tenacidad y % de la rigidez torsional.

**Tabla 16. Tabla de descriptivos para las variables obtenidas mediante el ensayo de torsión para los huesos no operados.**

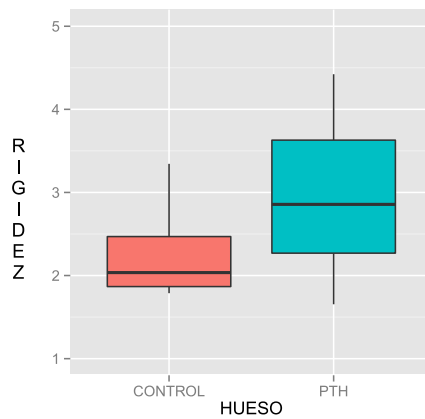
		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
<b>Par torsor:</b>	<b>Control</b>	4	40.75	8.60	28.90	48.33
	<b>PTH</b>	5	39.82	5.22	34.63	47.38
<b>Tenacidad:</b>	<b>Control</b>	4	498.67	182.48	255.30	683.96
	<b>PTH</b>	5	371.89	246.63	183.26	782.61
<b>Rigidez torsional:</b>	<b>Control</b>	4	2.30	0.715	1.79	3.34
	<b>PTH</b>	5	2.97	1.093	1.65	4.42



**Figura 30. Diagrama de cajas de la variable % par torsor para los huesos no operados.**



**Figura 31. Diagrama de cajas de la variable % de tenacidad para los huesos no operados.**



**Figura 32. Diagrama de cajas de la variable % rigidez torsional para los huesos no operados.**

En el análisis del diagrama de cajas podemos observar que no hay diferencias estadísticamente significativas, entre el grupo control y el grupo PTH para la variable de par torsor (figura 30), tenacidad (figura 31), ni tampoco rigidez torsional (figura 32).

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor tomando como variables dependientes los % de los parámetros biomecánicos a torsión de tenacidad, par torsor y rigidez, y como variable independiente el factor tratamiento (tabla 17) que confirmó los hallazgos descritos.

**Tabla 17. ANOVA de un factor de las variables de % de par torsor, tenacidad y rigidez torsional para los huesos no operados.**

	<b>F</b>	<b>(num df, denom df)</b>	<b>p-value</b>
<b>Par torsor</b>	0.0409	(1.7)	0.845
<b>Tenacidad</b>	0.7286	(1.7)	0.422
<b>Rigidez torsional</b>	1.0922	(1.7)	0.331

## **4.-ENSAYOS DENSITOMÉTRICOS**

A continuación vamos a detallar los resultados obtenidos tras el análisis estadístico de los datos obtenidos para cada uno de los dos estudios densitométricos que se han realizado, el estudio para el callo completo y el estudio para la zona de fractura.

### **4.1.- Estudio densitométrico del callo completo**

El objetivo del estudio ha sido analizar las variables volumen total del callo y densidad media del callo, entre los grupos control y PTH para, de este modo, evaluar el efecto global que posee el tratamiento con Hormona Paratiroidea en la reparación del callo de fractura.

En la tabla 18 se presentan los resultados obtenidos para cada una de las variables consideradas. Hay que destacar que cuando se trata del hueso contralateral no operado, estas variables han sido calculadas con dos cortes de TAC a la misma altura de donde se realiza la osteotomía en la tibia operada. En la tabla 19 se presenta el cuadro resumen de los parámetros estadísticos descriptivos correspondientes a las variables densitométricas del callo completo.

**Tabla 18. Resultados obtenidos para las variables Volumen total del callo (Vtot31) y densidad media del callo (Dtot31).**

	Volumen total del callo (Vtot31) en mm <sup>3</sup>	Densidad media del callo (Dtot31) en HU	Densidad media del callo (Dtot31) en g/mm <sup>3</sup>
CON 1 (89)	7154,5	1793	1,3
CON 2 (29)	11891,1	1595,1	1,2
CON 3 (54)	10195,3	1609,6	1,2
CON 5 (17)	10878,2	1716,4	1,2
CON 6 (87)	8269,3	1631,2	1,2
CON 7 (70)	11434,1	1788,7	1,3
PTH 1 (59)	10009,8	1850,5	1,3
PTH 2 (80)	13035,2	1660,8	1,2
PTH 3 (81)	11033,8	1817,0	1,3
PTH 4 (107)	17227,9	1436,5	1
PTH 6 (96)	9803,1	1648,4	1,2
PTH 7 (14)	13384,8	1535,7	1,1

**Tabla 19. Tabla de descriptivos para las variables obtenidas en el estudio densitométrico del callo completo para los hueso osteotomizados.**

Descriptivos

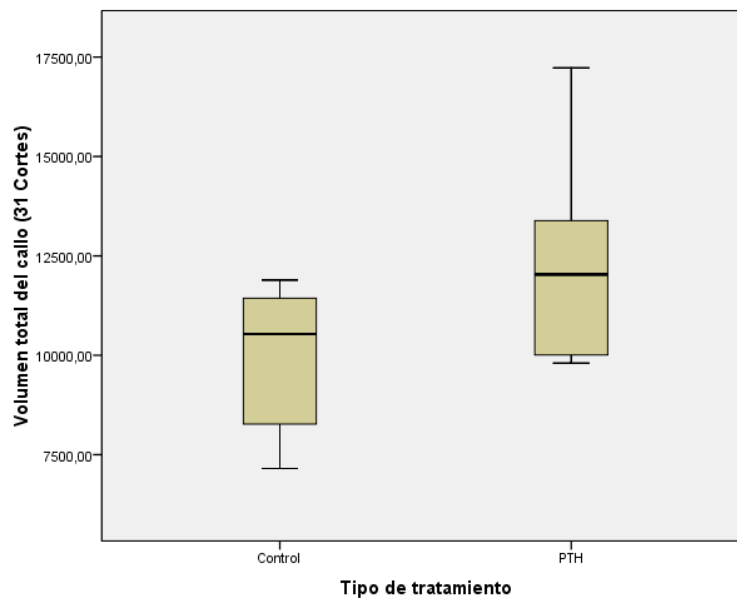
Volumen total del callo (31 Cortes)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	6	9970,4396	1872,39087	764,40037	8005,4859	11935,3933	7154,54	11891,12
PTH	6	12415,8193	2792,98583	1140,23169	9484,7605	15346,8782	9803,12	17227,93
Total	12	11193,1294	2601,97012	751,12408	9539,9165	12846,3424	7154,54	17227,93

A continuación, en las figuras 33 y 34, se muestran los diagramas de cajas obtenidos para cada una de las variables y tratamientos. Estas gráficas



permiten estimar, de forma inicial, las posibles diferencias existentes entre ovejas sin tratar y ovejas tratadas con Hormona Paratiroidea.



**Figura 33. Diagramas de cajas para la variable volumen total del callo entre grupo control y grupo PTH de los huesos osteotomizados.**

De la figura 33, volumen total del callo en función del tratamiento, podríamos intuir en una primera aproximación diferencias entre los volúmenes de callo de ovejas no tratadas y ovejas tratadas con PTH. Estas observaciones son comprobadas estadísticamente mediante el test de análisis de varianzas (ANOVA). Los resultados del test se resumen en la tabla 20. En ella se presentan los resultados del test ANOVA en el que a pesar de esa primera aproximación se comprueba que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y PTH ( $p=0,105$ ).

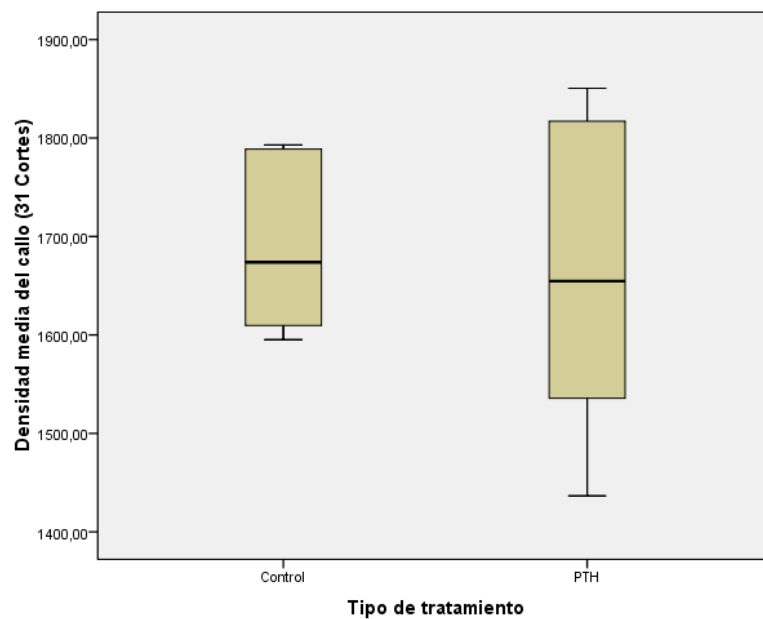
**Tabla 20. Tabla resumen de los test ANOVA para la variable volumen del callo obtenida para los dos grupos de estudio.**

**ANOVA**

Volumen total del callo (31 Cortes)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,794E7	1	1,794E7	3,173	,105
Intra-grupos	5,653E7	10	5653308,711		
Total	7,447E7	11			

En el caso de la densidad media del callo, el diagrama de cajas (figura 34) no muestra diferencias entre los grupos control y PTH.



**Figura 34. Diagramas de cajas para la variable densidad media del callo entre el grupo control y el grupo PTH de los huesos osteotomizados.**

El resultado del test ANOVA (tabla 21) no señala diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,024$ ) entre los grupos control y PTH.

**Tabla 21. Tabla resumen de los test ANOVA para la variable densidad media del callo obtenida para los dos grupos de estudio.**

**ANOVA**

Densidad media del callo (31 Cortes)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2854,726	1	2854,726	,172	,688
Intra-grupos	166454,077	10	16645,408		
Total	169308,803	11			

De estos resultados se deduce que el grupo tratado con Hormona Paratiroidea da lugar a callos similares al grupo control tanto en volumen total como en densidad mineral ósea media.

Igual que en el análisis de las pruebas biomecánicas de flexión y torsión, también hemos analizados los datos densitométricos de los huesos no operados del grupo control y del grupo PTH. En la tabla 22 se presenta el cuadro resumen de los parámetros estadísticos descriptivos correspondientes a

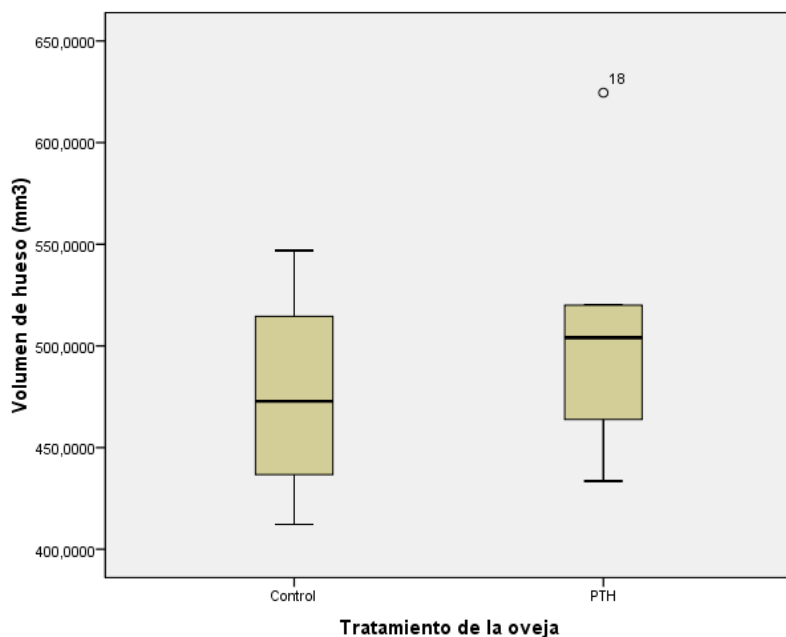
la variable volumen total del hueso en la zona equivalente a la osteotomía y en la figura 35 el diagrama de cajas correspondiente.

**Tabla 22. Tabla de descriptivos para la variable Volumen de hueso en la zona de osteotomía calculada para dos cortes. Comparación entre los huesos no operados del grupo control y del PTH.**

Descriptivos

Volumen de hueso (mm3)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	7	476,356086	51,2430595	19,3680560	428,964160	523,748011	412,2289	546,9386
PTH	6	508,358833	65,5537447	26,7622042	439,564397	577,153269	433,5440	624,5250
Total	13	491,126585	58,1309226	16,1226171	455,998420	526,254750	412,2289	624,5250



**Figura 35. Diagramas de cajas obtenido para la variable volumen total de la zona de osteotomía calculada para dos cortes entre grupo control y grupo PTH de los huesos no operados.**

El resultado del test ANOVA (tabla 23) no señala diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el PTH para la variable volumen de hueso total.

**Tabla 23. Test de ANOVA correspondiente a la comparación entre los valores obtenidos para la variable Volumen de hueso calculada para dos cortes de los huesos no operados del grupo control y del grupo PTH.**

ANOVA

Volumen de hueso (mm3)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3308,876	1	3308,876	,977	,344
Intra-grupos	37241,574	11	3385,598		
Total	40550,450	12			

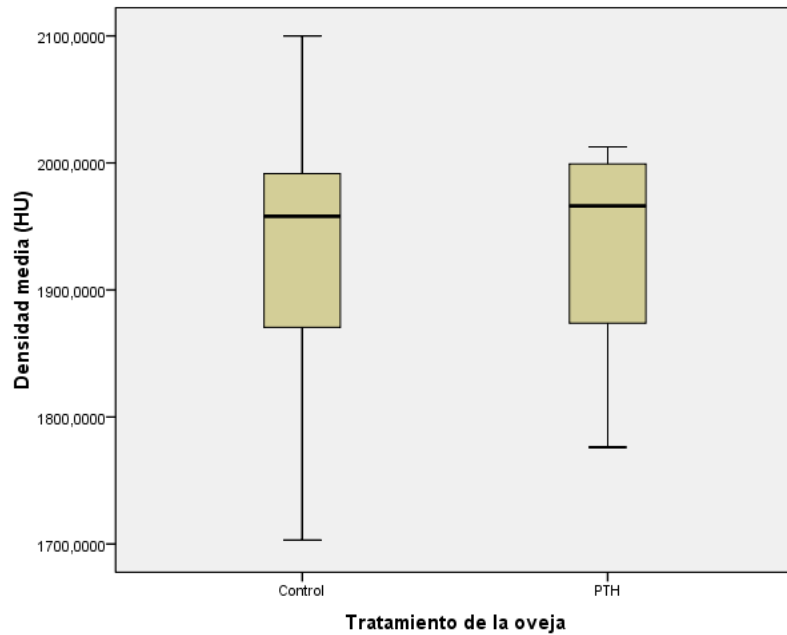
En la tabla 24 se presenta el cuadro resumen de los parámetros estadísticos descriptivos correspondientes a la variable densidad media total del hueso en la zona de osteotomía y en la figura 36 el diagrama de cajas correspondiente.

**Tabla 24. Tabla de descriptivos para la variable Densidad media del hueso en la zona de osteotomía calculada para dos cortes. Comparación entre los huesos no operados del grupo control y del PTH.**

Descriptivos

Densidad media (HU)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	7	1926,496471	131,1475186	49,5691027	1805,205246	2047,787696	1703,1106	2099,9441
PTH	6	1932,370167	91,9647298	37,5444437	1835,859102	2028,881232	1776,0920	2012,6230
Total	13	1929,207408	110,1502950	30,5501951	1862,644251	1995,770565	1703,1106	2099,9441



**Figura 36. Diagramas de cajas obtenido para la variable densidad media de la zona de osteotomía calculada para dos cortes entre grupo control y grupo PTH de los huesos no operados.**

El resultado del test ANOVA (tabla 25) tampoco señala diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el PTH para la variable densidad media de hueso total.

**Tabla 25. Test de ANOVA correspondiente a la comparación entre los valores obtenidos para la variable Volumen de hueso calculada para dos cortes de los huesos sanos del grupo control y del grupo PTH.**

ANOVA

Densidad media (HU)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	111,462	1	111,462	,008	,929
Intra-grupos	145485,587	11	13225,962		
Total	145597,050	12			

## 4.2.- Estudio densitométrico de la zona de fractura

Tal y como se ha comentado en el apartado de Material y Métodos, las variables que se han tenido en cuenta para realizar el estudio densitométrico de la zona de fractura han sido de dos tipos:

- Volumen: corresponden a los volúmenes de tejido óseo total y a los volúmenes para cada una de las isodensidades en la zona de fractura (Vhuesot, Vhueso1, Vhueso2, Vhueso3 y Vhueso4).
- Densidad media total del tejido óseo (Dmt) y las densidades medias para cada una de las isodensidades en la zona de fractura. (Dm1, Dm2, Dm3 y Dm4).

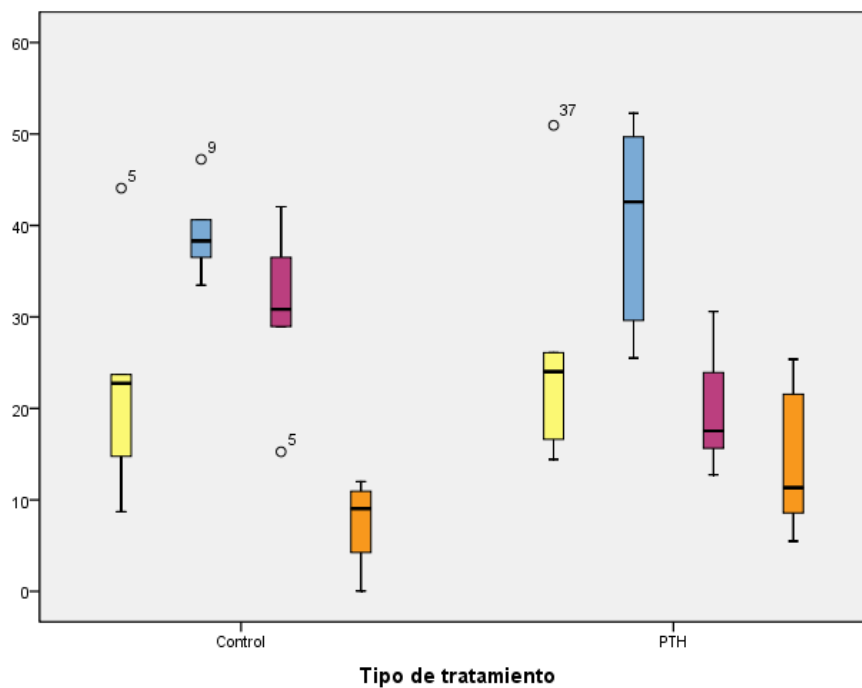
Dado que en cada una de las muestras de callo se ha considerado un número de cortes axiales distinto (entre 1 y 3 cortes axiales), las variables de volumen han tenido que ser transformadas para normalizar todos los volúmenes. A continuación se detallan las variables resultantes de la normalización y la forma de cálculo de las mismas:

- PorVol1 -> % del volumen de la Isodensidad 1 frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura. ( $V_{hueso1}/V_{huesot}$ ).
- PorVol2 -> % del volumen de la Isodensidad 2 frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura. ( $V_{hueso2}/V_{huesot}$ ).
- PorVol3 -> % del volumen de la Isodensidad 3 frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura. ( $V_{hueso3}/V_{huesot}$ ).

- PorVol4 -> % del volumen de la Isodensidad 4 frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura. ( $V_{hueso4}/V_{huesot}$ ).

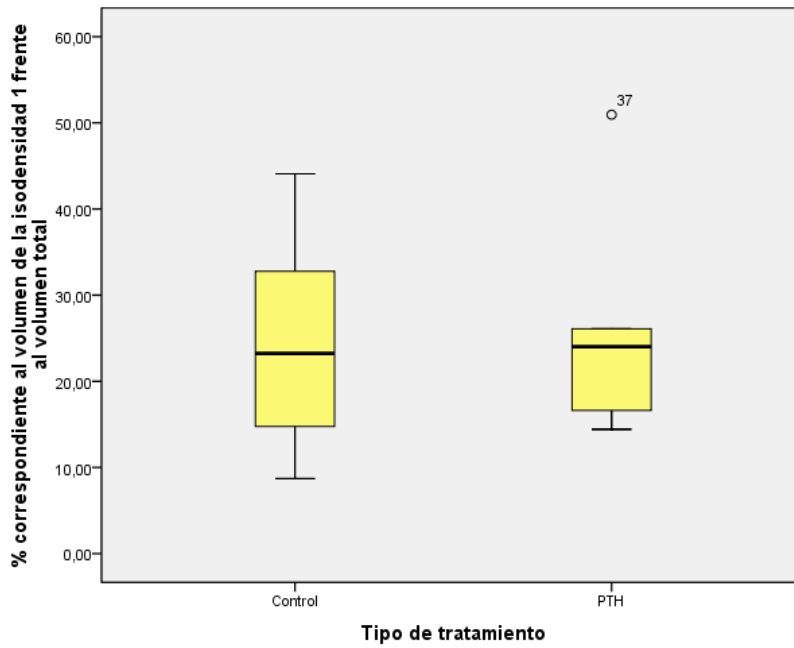
Estas cuatro variables nos permiten realizar un estudio más profundo acerca de la distribución de las densidades en la zona de fractura, es decir conocer cuánto volumen de hueso hay en la zona de fractura para cada una de las isodensidades consideradas en el estudio respecto al volumen total.

En las figuras 37, 38, 39, 40 y 41 se representan los diagramas de cajas para cada una de las isodensidades del estudio.

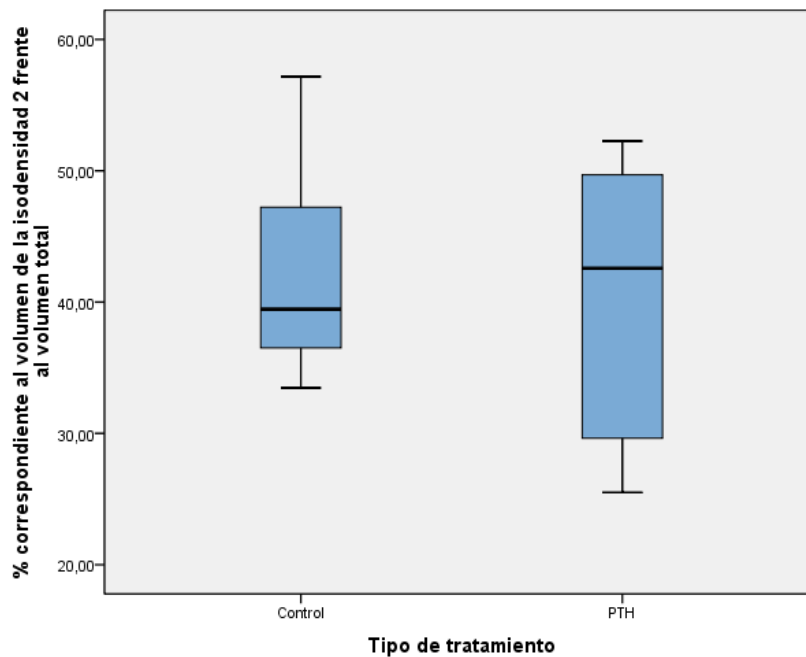


**Figura 37. Diagrama de cajas agrupado para la variable % del volumen de la isodensidad frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura. En amarillo la isodensidad 1, en azul la isodensidad 2, en morado la isodensidad 3 y en naranja la isodensidad 4.**

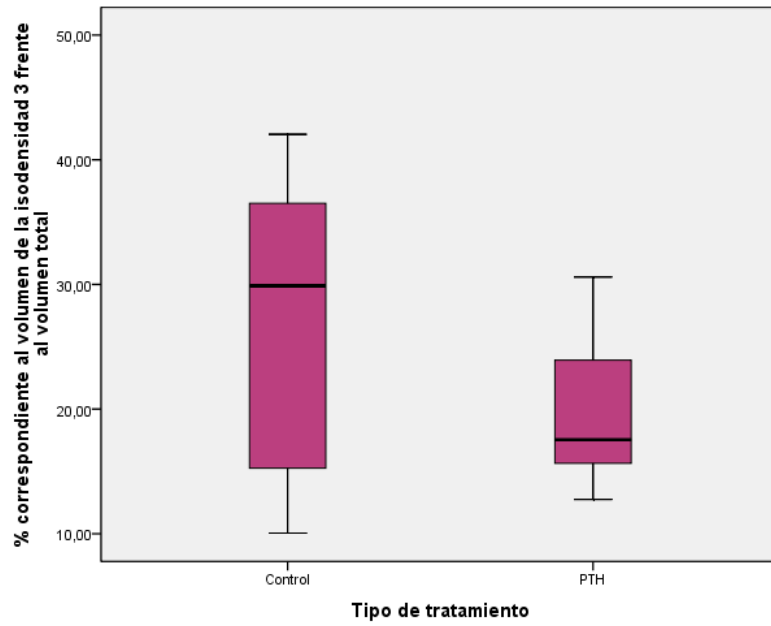




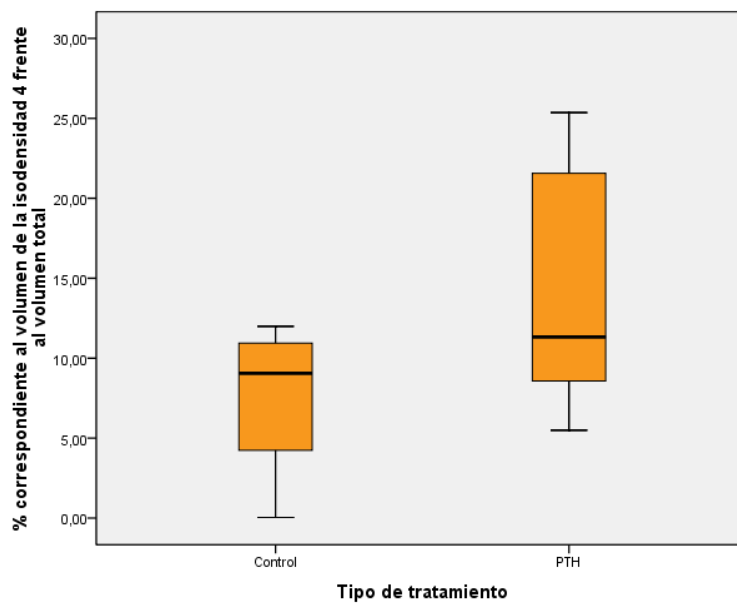
**Figura 38. Diagrama de cajas para la variable % del volumen de la Isodensidad 1 frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura.**



**Figura 39. Diagrama de cajas para la variable % del volumen de la Isodensidad 2 frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura.**



**Figura 40. Diagrama de cajas para la variable % del volumen de la Isodensidad 3 frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura**



**Figura 41. Diagrama de cajas para la variable % del volumen de la Isodensidad 4 frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura.**

En las tablas 26, 27, 28 y 29 se presentan las tablas de resumen de descriptivos correspondientes al % de volumen regenerado en cada una de las isodensidades consideradas en el estudio.

**Tabla 26. Resumen de descriptivos para la variable % de volumen regenerado de la isodensidad 1 para los dos grupos de estudio.**

**Descriptivos**

% correspondiente al volumen de la isodensidad 1 frente al volumen total

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	6	,2447	,12647	,05163	,1119	,3774	,09	,44
PTH	6	,2602	,13071	,05336	,1230	,3974	,14	,51
Total	12	,2524	,12289	,03548	,1743	,3305	,09	,51

**Tabla 27. Resumen de descriptivos para la variable % de volumen regenerado de la isodensidad 2 para los dos grupos de estudio.**

**Descriptivos**

% correspondiente al volumen de la isodensidad 2 frente al volumen total

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	6	,4221	,08666	,03538	,3312	,5131	,33	,57
PTH	6	,4037	,11120	,04540	,2870	,5204	,26	,52
Total	12	,4129	,09553	,02758	,3522	,4736	,26	,57

**Tabla 28. Resumen de descriptivos para la variable % de volumen regenerado de la isodensidad 3 para los dos grupos de estudio.**

**Descriptivos**

% correspondiente al volumen de la isodensidad 3 frente al volumen total

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	6	,2727	,12324	,05031	,1434	,4021	,10	,42
PTH	6	,1967	,06493	,02651	,1285	,2648	,13	,31
Total	12	,2347	,10198	,02944	,1699	,2995	,10	,42

**Tabla 29. Resumen de descriptivos para la variable % de volumen regenerado de la isodensidad 4 para los dos grupos de estudio.**

Descriptivos

% correspondiente al volumen de la isodensidad 4 frente al volumen total

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	5	,0725	,05010	,02241	,0103	,1348	,00	,12
PTH	6	,1394	,07784	,03178	,0577	,2211	,05	,25
Total	11	,1090	,07247	,02185	,0603	,1577	,00	,25

Cabe destacar que, en la zona de fractura, el tejido más abundante (alrededor de un 40% del total de volumen) en todos los casos es el que se corresponde con la isodensidad 2 (azul), la cual comprende un rango de densidades medio-bajas (desde 877 HU hasta 1527 HU). El menor volumen en los dos grupos se observa en el caso de la mayor DMO (isodensidad 4). Estos datos nos indica el grado de maduración del callo en el momento del sacrificio del animal.

Los test estadísticos realizados (tablas 30, 31, 32 y 33) no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de volúmenes generados con cada uno de los grupos y en las isodensidades consideradas, por lo que no podemos afirmar que el tratamiento influya de forma considerable en la distribución del volumen por densidades en la zona del callo de fractura.

**Tabla 30. Test de ANOVA para la variable % de volumen regenerado en la isodensidad 1 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.**

**ANOVA**

% correspondiente al volumen de la isodensidad 1 frente al volumen total

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,001	1	,001	,044	,838
Intra-grupos	,165	10	,017		
Total	,166	11			

**Tabla 31. Test de ANOVA para la variable % de volumen regenerado en la isodensidad 2 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.**

**ANOVA**

% correspondiente al volumen de la isodensidad 2 frente al volumen total

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,001	1	,001	,102	,756
Intra-grupos	,099	10	,010		
Total	,100	11			

**Tabla 32. Test de ANOVA para la variable % de volumen regenerado en la isodensidad 3 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.**

**ANOVA**

% correspondiente al volumen de la isodensidad 3 frente al volumen total

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,017	1	,017	1,790	,211
Intra-grupos	,097	10	,010		
Total	,114	11			

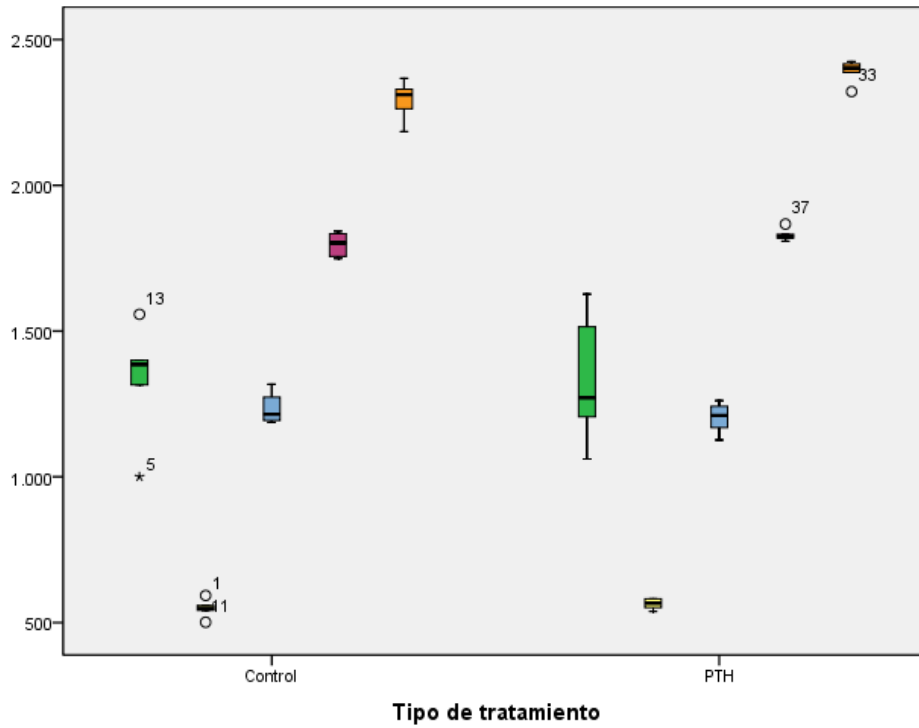
**Tabla 33. Test de ANOVA para la variable % de volumen regenerado en la isodensidad 4 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.**

**ANOVA**

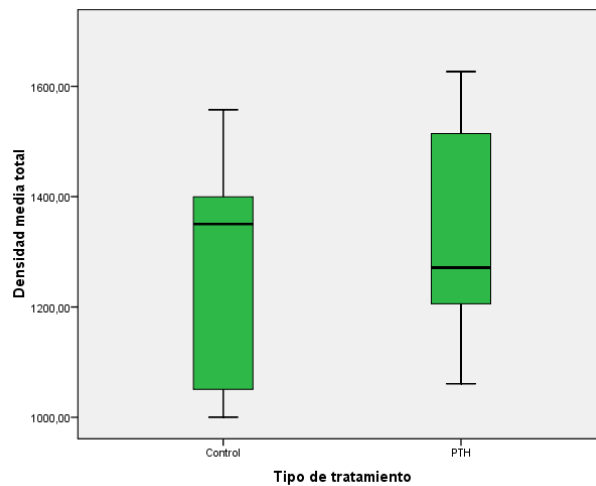
% correspondiente al volumen de la isodensidad 4 frente al volumen total

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,012	1	,012	2,720	,133
Intra-grupos	,040	9	,004		
Total	,053	10			

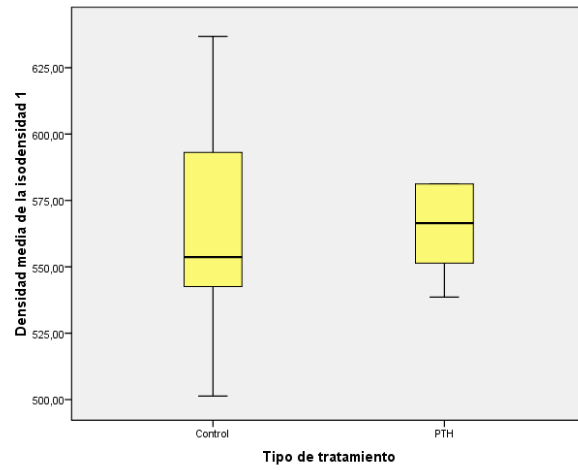
En la figura 42 se representa el diagrama de cajas agrupado para la variable densidad media para cada una de las isodensidades consideradas en el estudio y para cada uno de los grupos. En las figuras 43, 44, 45, 46 y 47 se representan los diagramas de cajas para cada una de las isodensidades comparando los dos grupos considerados.



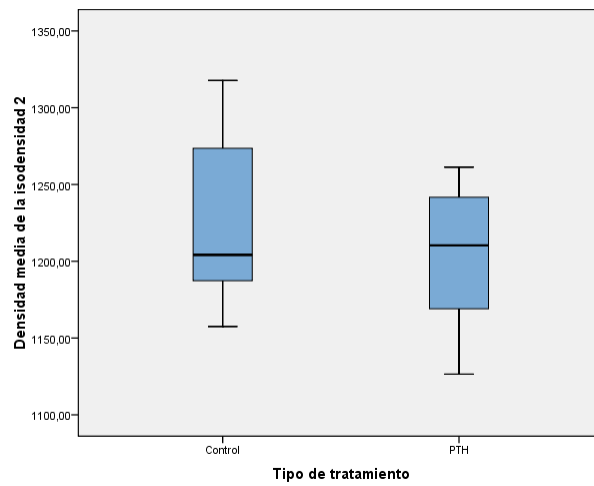
**Figura 42. Diagrama de cajas agrupado para la variable densidad media para cada isodensidad. En amarillo la isodensidad 1, en azul la isodensidad 2, en morado la isodensidad 3 y en naranja la isodensidad 4.**



**Figura 43. Diagrama de cajas para la variable densidad media en la zona de fractura.**

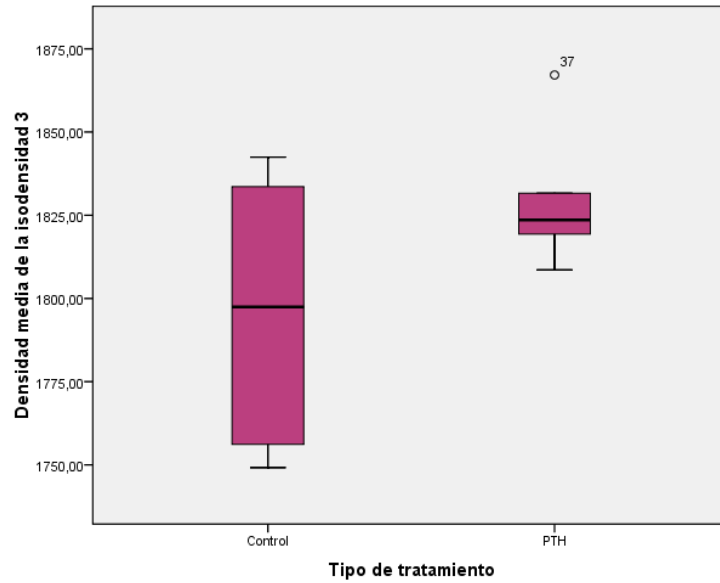


**Figura 44. Diagrama de cajas para la variable densidad media correspondiente a la isodensidad 1.**

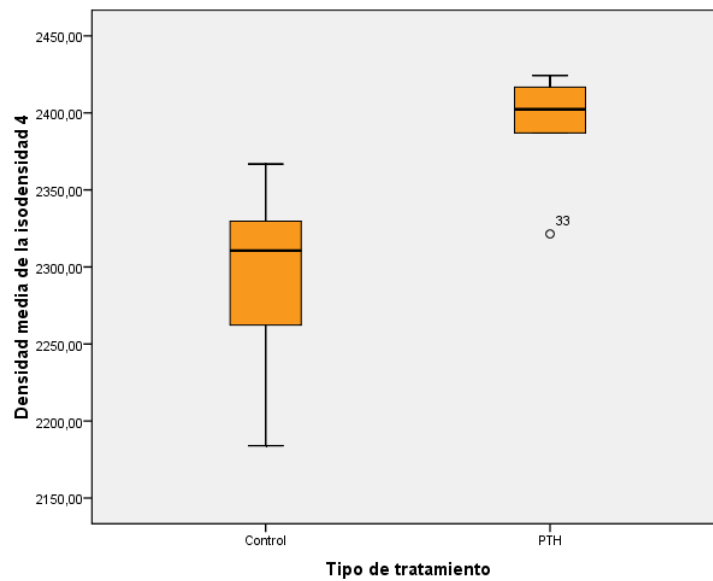


**Figura 45. Diagrama de cajas para la variable densidad media correspondiente a la isodensidad 2.**





**Figura 46. Diagrama de cajas para la variable densidad media correspondiente a la isodensidad 3.**



**Figura 47. Diagrama de cajas para la variable densidad media correspondiente a la isodensidad 4.**

En las tablas 34, 35, 36 y 37 se presentan las tablas resumen de los descriptivos.

**Tabla 34. Resumen de descriptivos para la variable densidad media de la isodensidad 1 para los dos grupos de estudio.**

Descriptivos

Densidad media de la isodensidad 1

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	6	563,5216	46,47607	18,97378	514,7479	612,2952	501,32	636,80
PTH	6	564,2401	17,17302	7,01086	546,2181	582,2621	538,61	581,26
Total	12	563,8808	33,40691	9,64374	542,6551	585,1066	501,32	636,80

**Tabla 35. Resumen de descriptivos para la variable densidad media de la isodensidad 2 para los dos grupos de estudio.**

Descriptivos

Densidad media de la isodensidad 2

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	6	1224,0791	60,02362	24,50454	1161,0882	1287,0701	1157,50	1317,75
PTH	6	1203,2123	49,69418	20,28757	1151,0614	1255,3631	1126,50	1261,25
Total	12	1213,6457	53,65548	15,48900	1179,5546	1247,7368	1126,50	1317,75

**Tabla 36. Resumen de descriptivos para la variable densidad media de la isodensidad 3 para los dos grupos de estudio.**

Descriptivos

Densidad media de la isodensidad 3

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	6	1796,0599	38,49413	15,71516	1755,6628	1836,4570	1749,19	1842,46
PTH	6	1828,9822	20,20721	8,24956	1807,7761	1850,1884	1808,59	1867,15
Total	12	1812,5211	33,98166	9,80966	1790,9301	1834,1120	1749,19	1867,15

**Tabla 37. Resumen de descriptivos para la variable densidad media de la isodensidad 4 para los dos grupos de estudio.**

Descriptivos

Densidad media de la isodensidad 4

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	5	2290,6777	70,54857	31,55028	2203,0801	2378,2753	2184,00	2366,83
PTH	6	2392,3379	37,62854	15,36179	2352,8492	2431,8266	2321,47	2424,27
Total	11	2346,1287	74,27902	22,39597	2296,2274	2396,0300	2184,00	2424,27

A simple vista no puede determinarse si existen diferencias entre las densidades medias para cada uno de los tratamientos y para cada una de las isodensidades consideradas. En los test de ANOVA (tablas 38, 39, 40 y 41), sólo se observan diferencias estadísticamente significativas entre los valores de densidad media en el rango de densidades comprendidas en la isodensidad 4, zona de densidad más elevada.

**Tabla 38. Test de ANOVA para la variable densidad media de la isodensidad 1 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.**

ANOVA

Densidad media de la isodensidad 1

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,549	1	1,549	,001	,972
Intra-grupos	12274,689	10	1227,469		
Total	12276,238	11			

**Tabla 39. Test de ANOVA para la variable densidad media de la isodensidad 2 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.**

ANOVA

Densidad media de la isodensidad 2

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1306,276	1	1306,276	,430	,527
Intra-grupos	30361,735	10	3036,174		
Total	31668,011	11			

**Tabla 40. Test de ANOVA para la variable densidad media de la isodensidad 3 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.**

ANOVA

Densidad media de la isodensidad 3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3251,637	1	3251,637	3,441	,093
Intra-grupos	9450,648	10	945,065		
Total	12702,285	11			

**Tabla 41. Test de ANOVA para la variable densidad media de la isodensidad 4 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.**

ANOVA

Densidad media de la isodensidad 4

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	28185,788	1	28185,788	9,399	,013
Intra-grupos	26987,938	9	2998,660		
Total	55173,725	10			

**• Resumen de los resultados**

Como resumen encontramos que el comportamiento biomecánico de los callos de fractura del grupo control y del tratado con PTH es similar en los

ensayos en flexión aunque con ligeras diferencias en el patrón del perfil polar de rigidez que muestra una mayor rigidez en los planos 2-8 y 3-9 en los callos tratados con PTH. En los ensayos a torsión no hemos podido encontrar diferencias significativas, lo que nos indica que la resistencia global del callo tratado con PTH no ha mostrado diferencias con respecto a la de los callos del grupo control.

En el estudio mediante TAC el área del callo de fractura de los animales tratados con PTH no varió significativamente de el grupo control, ni tampoco lo hizo el área del hueso de las tibias no osteotomizadas a dicho nivel entre el grupo PTH y el grupo Control.

Desde el punto de vista densitométrico, en el estudio del callo completo encontramos callos de tamaño similar y con parecida densidad media.

En el estudio limitado a la zona de fractura, el volumen medio de las distintas isodensidades que componen el callo fue similar entre ambos grupos. Sin embargo la densidad media de la isodensidad 4 (zona de densidad máxima) fue significativamente mayor para el grupo tratado con PTH, sin poder encontrar diferencias en las densidades medias del resto de isodensidades.



## DISCUSIÓN

Existe una preocupación entre los profesionales que utilizan la Hormona Paratiroidea sobre su efecto en la consolidación de las fracturas, pues si bien sus efectos en la mejoría de la densidad mineral ósea y en la prevención de la aparición de fracturas en el hueso osteoporótico han sido extensamente estudiados<sup>35,109,112,113,117,130</sup>, los trabajos sobre su efecto en la reparación de las fracturas son escasos, con gran variabilidad en cuanto al animal de experimentación utilizado, modelo de fractura, tipo de hormona paratiroidea, dosis, vía de administración y métodos de medición de resultados<sup>22</sup>.

Aunque se ha publicado numerosos estudios en animales demostrando la interacción entre los fármacos utilizados para el tratamiento de la osteoporosis y diferentes aspectos de la consolidación ósea<sup>175</sup>, es difícil definir hasta qué punto estos hallazgos pueden ser aplicados a los humanos debido a las limitaciones que sabemos tienen los modelos animales<sup>247-249</sup>.

Desde distintos foros como la Sociedad Internacional de la Reparación Ósea (ISFR) se incentiva la investigación en este campo para poder obtener conclusiones más realistas sobre este tema<sup>248</sup>. Si bien parece demostrado por los trabajos experimentales que la consolidación de la fractura en modelos experimentales animales se acelera bajo la administración de Hormona Paratiroidea, sus consecuencias en la clínica humana son más difíciles de extrapolar.

Los mecanismos exactos mediante los cuales la PTH estimula la consolidación en modelos animales no están todavía claros. Está

suficientemente establecido que la PTH es capaz de estimular la formación del callo duro y de aumentar la resistencia en el sitio de la fractura<sup>189</sup>. Sin embargo, PTH parece estimular la consolidación a más de un nivel, como es en la expresión de los factores de transcripción condrogénica, contribuyendo a incrementar la diferenciación de los condrocitos, su proliferación, así como la formación de cartílago en el callo. Así, en la primera fase, tras la aparición del hematoma en el sitio de la fractura, PTH sería capaz de estimular la proliferación de condrocitos, su diferenciación y la formación de cartílago en el callo blando. Posteriormente, cuando este callo se osifica se forma un puente de tejido óseo inmaduro entre los extremos óseos (callo duro). En esta etapa, PTH parece estimular la proliferación de células osteoprogenitoras, la producción de fosfatasa alcalina, de proteínas de la matriz ósea y la formación de hueso. Finalmente el tejido óseo inmaduro es remodelado a hueso lamelar, restaurando la forma, estructura y propiedades mecánicas del hueso. En esta etapa PTH actuaría estimulando la osteoclastogénesis y por consiguiente el proceso de remodelado.

Nosotros hemos investigado en este campo utilizando animales de experimentación grandes, con un sistema de consolidación ósea parecido al humano, en condiciones osteoporóticas, con un modelo de osteosíntesis de la fractura mediante fijación externa que permite una consolidación secundaria y utilizando ensayos biomecánicos y análisis densitométricos que nos permitirá un mayor acercamiento a la realidad clínica.



**• Animal de experimentación**

La oveja como modelo de experimentación en osteoporosis ha sido ampliamente estudiada<sup>250-253</sup>. Es un modelo adecuado para estudiar la osteoporosis por varias razones:

- la pérdida ósea producida por la deficiencia de estrógenos está bien documentada<sup>254</sup>,
- los perfiles hormonales de las ovejas son temporal y cuantitativamente parecidos a los de la mujer<sup>253,255</sup>.
- la producción de osteocalcina por los osteoblastos ha sido claramente documentada en el modelo experimental de las ovejas<sup>255</sup>,
- el tamaño de las ovejas permite reproducir un modelo de fractura adecuado para estudiar la consolidación ósea<sup>175,255</sup>,
- las ovejas son dóciles y relativamente fáciles de manejar y permiten su estabulación en grupos de 2 ó más animales sin producirles estrés<sup>256-258</sup>.

La osteoporosis primaria en ovejas es poco frecuente. En edades adultas el factor limitante de la supervivencia es la salud dental. La pérdida dental conduce a la inanición y muerte de estos animales. La osteoporosis se puede conseguir mediante la ovariectomía de estos animales. Se ha demostrado que la pérdida ósea en las ovejas tras ovariectomía, medicación esteroidea y dieta pobre en calcio y vitamina D es comparable a la osteoporosis humana con respecto a los cambios en la densitometría, estructura y fuerza ósea<sup>19,250</sup>.

Hay estudios que demuestran la disminución de la densidad ósea en la cresta iliaca en ovejas tras la ovariectomía<sup>253,255</sup>.

Hornby<sup>254</sup> estudia la densidad mineral ósea (DMO) mediante mediciones con un densitómetro óseo del cuerpo entero en ovejas ovariectomizadas y en ovejas operadas sin ovariectomizar como control. Miden la DMO antes de la intervención quirúrgica y en diferentes semanas hasta 113 después de la intervención quirúrgica. La DMO del cuerpo entero de las ovejas ovariectomizadas se redujo significativamente en comparación con las ovejas ovariectomizadas a partir de la semana 15 tras la cirugía y se mantuvo hasta el final del estudio. Además estos autores demuestran que el tratamiento con estradiol previene la pérdida ósea en las ovejas ovariectomizadas<sup>254</sup>.

Turner<sup>253</sup> demuestra un aumento de las fosfatasas alcalinas específicas del hueso en ovejas a los 6 meses de la ovariectomía, indicando un aumento del recambio óseo, similar a lo que ocurre en la menopausia humana. También miden la densidad mineral ósea en las vértebras lumbares observando una disminución de la misma en las ovejas ovariectomizadas.

Newton<sup>251</sup> defiende la validez de la oveja como modelo de estudio de la osteoporosis al demostrar mediante biopsias de cresta iliaca la disminución del volumen y del grosor de las trabéculas óseas al año de la ovariectomía. También demuestran el aumento de la osteocalcina como reflejo del aumento de la reabsorción ósea.

Jiang<sup>125</sup> analiza mediante densitometría ósea, pruebas biomecánicas y Resonancia Magnética la microestructura del hueso trabecular del cuello femoral en ovejas ovariectomizadas. A los 6 meses de la ovariectomía las

ovejas presentaban una disminución de la densidad mineral ósea, una disminución de la resistencia biomecánica y un deterioro de la microestructura del hueso trabecular del cuello femoral con respecto al grupo control. En el grupo de ovejas ovariectomizadas que fueron tratadas con calcitonina no se produjeron estos cambios en el hueso trabecular femoral.

Hemos encontrado muy pocos trabajos que estudien la consolidación de las fracturas en animales con osteoporosis tratados con PTH y todos ellos utilizando la rata como animal de experimentación.

Andreassen en 2001 estudió los efectos de la administración de PTH 1-34 a dosis de 200 µg/kg/día en ratas ancianas para intentar demostrar que la PTH también sería eficaz en sujetos en los que ya de por sí dicha consolidación está disminuida. Tras provocar una fractura tibial y osteosintetizarla con aguja K intramedular, estudió la consolidación a las 3 y 8 semanas de curación. Realizaron estudios morfométricos, biomecánicos mediante flexión a 3 puntos y densitométricos con tomografía computerizada cualitativa periférica. A las 3 semanas, las ratas tratadas con PTH 1-34 mostraron un incremento de la resistencia máxima del 160% y un aumento del volumen del callo del 208%. A las 8 semanas, los callos tratados con PTH 1-34 incrementaron su resistencia en 270% y su rigidez en 130% y el volumen externo de los callos tratados aumentó un 135%, y el contenido mineral óseo aumentó el 388%. Los autores concluyen que el tratamiento con PTH 1-34 mejora la consolidación ósea en animales en los que dicha consolidación está disminuida por la edad.

Nozaka<sup>198</sup> es el primero que evalúa el efecto de la PTH tras una osteotomía en hueso esponjoso de la rata ovariectomizada. El tratamiento con PTH 1-34 incrementó el volumen de hueso esponjoso y la superficie osteoide en el grupo de ratas ovariectomizadas y en el grupo de ratas no ovariectomizadas. PTH disminuyó los parámetros de resorción ósea (superficie erosionada, superficie osteoclástica y número de osteoclastos) en las ratas ovariectomizadas, pero no en las normales. El tratamiento con PTH incrementó la consolidación tras la osteotomía del hueso esponjoso tanto en las ratas ovariectomizadas como en las no ovariectomizadas.

Komatsu<sup>199</sup> utilizó ratas osteoporóticas tras ovariectomía, y les realizó un defecto cortical en la diáfisis femoral, tras el cual formaron 5 grupos de animales y los trataron con PTH 1-38 a dosis de 0, 3, 10 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , durante 5 semanas. En los estudios biomecánicos de flexión a 3 puntos, sólo la dosis más alta de PTH (30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) aumentó significativamente la fuerza del callo con respecto al grupo control. En los estudios histomorfométricos se confirmó que la PTH estimula la formación de hueso inmaduro en los defectos y en los espacios intramedulares, pero no en el periostio. En resumen, se produjo un efecto dosis-dependiente con el tratamiento con PTH en la reparación de un defecto cortical en ratas ovariectomizadas.

Kim<sup>196</sup> estudia el efecto de dos dosis de PTH (1-84) 15 y 150  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  en fracturas tibiales de ratas ovariectomizadas, estabilizadas con una aguja intramedular. Los animales no ovariectomizados presentaron un callo pequeño, formado por una densa red de hueso trabecular. Las ratas ovariectomizadas sin tratar o tratadas con 17 estradiol presentaron un callo con mucho menos

tejido esponjoso y con mucha más cantidad de médula fibrosa y cartílago. Los animales tratados con PTH (1-84) mostraron callos más grandes, con mayor porcentaje de volumen de hueso trabecular y del volumen total de hueso trabecular en el área del callo, comparable a las ratas no ovariectomizadas.

Bostrom<sup>197</sup> estudia el efecto de la administración intermitente del RS-66271 (un análogo de la PTHr P(1-34)) en conejos con capacidad disminuida de consolidación de las fracturas debido a tratamiento corticoideo crónico. Los autores concluyen que el tratamiento con PTHr P puede mejorar la consolidación de las fracturas en conejos con dicha capacidad de curación disminuida debido al tratamiento corticoideo, y señalan una vía de investigación en humanos, en sujetos con una capacidad de consolidación disminuida.

Gabet<sup>207</sup> estudió en ratas ancianas ovariectomizadas el anclaje de implantes de titanio en la metáfisis proximal de la tibia, y cómo el tratamiento durante 8 semanas con PTH 1-34. Todos los parámetros  $\mu$ CT (densidad ósea, grosor trabecular, número de trabéculas y densidad de su conectividad) fueron estimulados por la PTH de manera dosis-dependiente. En los ensayos biomecánicos, los tres parámetros medidos (fuerza máxima, rigidez y tenacidad) aumentaron significativamente de manera dosis-dependiente.

No existe una evidencia clara sobre si las complicaciones que se producen durante la consolidación de una fractura osteoporótica son atribuibles a problemas de fijación del material de osteosíntesis en el hueso osteoporótico o si son debidas al posible retraso de la consolidación en pacientes ancianos. En modelos de fractura en animales, la consolidación ósea requiere mayor tiempo en los animales de mayor edad<sup>250,259</sup>. Existen pruebas contradictorias

respecto a si la pérdida de masa ósea provocada por la ovariectomía supone un impedimento adicional a la consolidación. Algunos estudios en animales demuestran una consolidación deficiente, sobre todo en las fases iniciales<sup>176,260</sup> mientras que otros estudios no detectan esta característica<sup>261</sup>. Las diferencias en cuanto a la fecha de la ovariectomía, edad de los animales y factores dietéticos hacen las comparaciones y conclusiones difíciles de interpretar<sup>249</sup>.

Una característica muy importante de nuestro estudio y que lo diferencia del resto de los trabajos antes citados es el hecho de analizar la consolidación ósea en un animal grande como es la oveja, con un sistema de reparación ósea muy similar al que ocurre en humanos (a diferencia de los roedores), y hacerlo en animales osteoporóticos, que sabemos puede dificultar la reparación de la fractura.

- **Modelo experimental de fractura**

Para el modelo de fractura hemos elegido un sistema no rígido que de lugar a una consolidación secundaria ya que la mayoría de los tratamientos actuales de las fracturas en pacientes osteoporóticos buscan la consolidación ósea por segunda intención formando un callo óseo externo<sup>248</sup>.

El modelo de osteotomía tibial estabilizada mediante un fijador externo es el modelo de fractura experimental más establecido y utilizado en la bibliografía para el estudio de la consolidación ósea en animales grandes<sup>209-218,247,262</sup>.

Goodship en 1985 utilizó este modelo de fractura experimental en la tibia de ovejas para estudiar la influencia de la carga mecánica sobre la consolidación de las fracturas. En un grupo de animales aplicó un fijador externo de elevada rigidez, realizó la osteotomía y dejó un espacio interfragmentario de 3 mm. En el otro grupo de ovejas, el fijador externo era periódicamente desbloqueado y se aplicaba una determinada carga axial a la fractura, demostrando que esto era beneficioso para la consolidación de la fractura<sup>76</sup>. Posteriormente, Goodship ha continuado estudiando este tema publicando otros trabajos sobre el efecto del entorno mecánico en la consolidación de fracturas, utilizando este mismo modelo experimental<sup>77,78,80,105,118</sup>.

Hantes<sup>214</sup> también utiliza este modelo de fractura del tercio medio de la diáfisis de la tibia en ovejas para estudiar el efecto de la aplicación transósea de ultrasonidos de baja intensidad en el sitio de la fractura, mediante un transductor colocado en el extremo de un tornillo colocado 1 cm proximal a la osteotomía, demostrando que estos aceleran el proceso de consolidación ósea en este modelo experimental de fractura.

Estos autores y otros que han utilizado este modelo de fractura han experimentado en ovejas no osteoporóticas. Nosotros hemos utilizado el modelo en ovejas osteoporóticas, desarrollando por tanto, un nuevo modelo de fractura experimental válido para el estudio de la consolidación ósea de fracturas osteoporóticas. Por el momento no tenemos constancia de que se haya utilizado este mismo modelo en otras publicaciones.

En este modelo experimental de fractura, la distancia entre los extremos de la osteotomía debe ser de 3 mm, porque en ausencia de este espacio y con un adecuado contacto y aposición de los fragmentos, la fractura puede consolidar demasiado rápido, evitando de esta manera el poder evaluar la influencia de cualquier fármaco<sup>12,24,76-78,80,105,118,175</sup>.

En humanos se tarda de 1 a 4 años en completar el remplazo del callo de fractura en hueso maduro funcionalmente competente y 32 semanas para completar la remodelación del callo de fractura en la diáfisis de la tibia de perros<sup>67</sup>. En las ratas la unión radiográfica se consigue a las 4 semanas<sup>125</sup>. En las ovejas el tiempo de consolidación en el modelo de fractura en tibia estabilizada con un fijador externo y con un gap de 3 mm ha sido estudiado por varios autores demostrando que la consolidación biomecánica, radiológica e histológica se consigue a las 9 semanas<sup>107,200,201</sup>. En la semana 6 el callo adquiere sus dimensiones máximas y desde la semana 6 a la 9 se produce el proceso de remodelación del callo óseo<sup>201</sup>. Estos plazos han sido estudiados en ovejas normales no osteoporóticas.

Nosotros hemos elegido las 8 semanas como tiempo de sacrificio para poder observar si el tratamiento con Hormona Paratiroidea puede alterar el proceso de formación y remodelación del callo óseo, teniendo en cuenta que el hecho de que las ovejas sean osteoporóticas puede enlentecer el proceso de consolidación de las fracturas.

Al realizar el estudio densitométrico de la zona de fractura tanto de los huesos del grupo Control como del PTH (figura 37), observamos que el tejido más abundante era el correspondiente a la isodensidad 2 (azul) que



comprende un rango de densidades medio-bajas y el menos abundante era el correspondiente a la isodensidad 4 (naranja) que comprende las densidades más elevadas. Es decir, que en el callo de fractura, en el momento que hemos sacrificado a nuestros animales, está formado por una gran cantidad de tejido poco denso y muy poco tejido de elevada densidad lo que equivale a una fase de consolidación de la fractura en la que predomina el hueso inmaduro y sólo una pequeña parte de él se ha transformado ya en hueso maduro denso. Estos hallazgos confirman que el momento que hemos elegido para estudiar los callos de fractura, al sacrificar a las ovejas a las 8 semanas, es un buen momento para analizar la repercusión de LA PTH en la fase de remodelación del callo.

#### • Elección de PTH

Hemos administrado en nuestro modelo la hormona completa de 84 aminoácidos, con una dosis diaria de 100 microgramos en inyección subcutánea, comenzando al día siguiente de producir la fractura y manteniéndola hasta la fecha del sacrificio del animal. Esta dosis es comparable a la utilizada en humanos para el tratamiento de la osteoporosis en la prevención de las fracturas<sup>109</sup>. En nuestro caso la dosis ajustada por peso sería de 2 µg/kg/día. En los estudios experimentales existe una gran variabilidad<sup>18,22</sup>, utilizando tanto la molécula completa de 84 aminoácidos, como la fracción aminoterminal de los primeros 34 llamada también Teriparatide (PTH 1-34) y con dosis que varían desde 0,75 µg/kg/2 días hasta dosis de 200

$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , aunque la mayoría de los estudios utilizan dosis mucho más altas que las utilizadas en la práctica clínica.

#### • **Características mecánicas**

En los trabajos experimentales sobre la consolidación ósea se utilizan distintos métodos de valoración como son las mediciones radiográficas, la histomorfometría, la medición de la densidad mineral, la medición de marcadores analíticos, los ensayos mecánicos y recientemente la microtomografía computerizada. De todos estos métodos, las investigaciones mecánicas son probablemente los mejores medios disponibles para valorar el efecto de una droga en el foco de fractura ya que la resistencia mecánica depende de muchos factores como la masa ósea, la arquitectura tridimensional, la calidad ósea, incluyendo la composición química y tamaño del cristal, su forma y cristalinidad, la composición química y estructura de la matriz no mineralizada, especialmente del colágeno, la viabilidad osteocítica y su recambio. Ninguno de los métodos citados anteriormente mide todos estos parámetros. Por ello la medición de la resistencia mecánica parece que es la medida más fiable del callo de fractura ya que proporciona información sobre el comportamiento global del tejido en reparación<sup>59,60,61,120,123,125,182,218,263,264</sup>.

El empleo de ensayos mecánicos en el estudio de la evolución del proceso de consolidación de fracturas proporciona un método para la obtención de información objetiva de forma cuantitativa. Tanto en la práctica clínica como a nivel experimental se han empleado ensayos mecánicos *in vivo* para realizar seguimientos de la evolución del callo de fractura, obteniendo valiosa

información no sólo para caracterizar el proceso, sino lo que es más interesante, para ayudar en la decisión del momento de retirada del sistema de fijación. Experimentalmente se emplean también ensayos *in vitro* realizados sobre especímenes anatómicos que, aunque no permiten el estudio de la evolución hasta llegar al estadio de reparación en el que se encuentran, proporcionan una información más real eliminando la variabilidad debida a parámetros no controlados en los ensayos in vivo, relacionados principalmente con la interposición de las partes blandas y el tono muscular.

Los trabajos publicados en la literatura sobre el efecto de la PTH en la consolidación de las fracturas son muy variables porque utilizan distintas secuencias hormonales, a distintas dosis, con distintas formas de administración, en modelos experimentales de fracturas variados y también son distintos los métodos de medición. En la tabla 42 se recogen los ensayos biomecánicos realizados por los distintos autores y comprobamos que la mayoría emplea ensayos de flexión a 3 puntos con las desventajas ya comentadas al subestimar el módulo de Young y la falta de uniformidad del momento de flexión<sup>20,226,227</sup>.

**Tabla 42. Pruebas biomecánicas en los diferentes estudios experimentales, tipo de ensayo y resultados**

AUTOR (año)	HORMONA	DOSIS	ANIMAL	FRACTURA SINTESIS	TIPO ENSAYO	RESULTADOS
Kim (1999)	1-84	15 µg/kg/día 150 µg/kg/día	Ratas ovariectomizadas	Diáfisis tibial Aguja IM	Flex. 3 p	Aumento resistencia máx. Aumento de la rigidez Aumento volumen del callo
Andreassen (1999)	1-34	60 µg/kg/día 200 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis tibial Aguja IM	Flex. 3 p	Aumento de la resistencia Aumento volumen y mineral óseo
Bostrom (2000)	PTH(RS-66271)	10 µg/kg/día	Conejos con prednisona	Cúbito defecto 1mm No fijación	Torsión	Aumento de la resistencia Aumento de la rigidez Aceleración de la consolidación
Holzer (1999)	1-34	80 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis femoral Aguja IM	Torsión	Aumento de la resistencia No aumento de la rigidez
Nakajima (2002)	1-34	10 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis femoral Aguja IM	No lo indica	Aumento de la resistencia Aceleración de la consolidación
Seebach (2004)	1-34	60 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis femoral Fijador externo Distracción	Flex. 3 p	Aumento de la resistencia Aumento de la rigidez Aumento volumen y mineral óseo (posterior normalización)
Andreassen (2001)	1-34	200 µg/kg/día	Ratas ancianas	Diáfisis tibial Aguja IM	Flex. 3 p	Aumento de la resistencia Aumento de la rigidez Aumento volumen y mineral óseo
Andreassen (2004)	1-34 1-31 Monocyclic 1-31	60 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis tibial Aguja IM	Flex. 3 p	Aumento de la resistencia Aumento de la rigidez Aumento volumen y mineral óseo Callo mecánicamente igual
Alkhiary (2005)	1-34	5 µg/kg/día 30 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis femoral Aguja IM	Torsión	Aumento de la rigidez Aumento par tursor No aumento volumen
Komatsubara (2005)	1-34	10 µg/kg (3d/sem) 30 µg/kg (3d/sem)	Ratas	Diáfisis femoral Aguja IM	Flex. 3 p	Aumento de la resistencia (30 µg/kg) No aumento volumen Aceleración de la consolidación
Nakazawa (2005)	1-34	10 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis femoral Aguja IM	No	Aumento precoz cartilago en callo
Manabe (2007)	1-34	0,75 µg/kg (2d/sem) 7,5 µg/kg (2d/sem)	Monas adultas	Diáfisis femoral Placa atornillada	Flex. 3 p	No aumento resistencia ni rigidez ni tenacidad Disminución del volumen Acelera maduración del callo
Kakar (2007)	1-34	30 µg/kg/día	Ratas	Diáfisis femoral Aguja IM	No	Aumento volumen Aumento precoz cartilago en callo Maduración precoz del callo
Gardner (2007)	1-34	30 µg/kg/día	Ratones	Diáfisis tibial Aguja IM	Flex. 4 p	No aumento resistencia ni rigidez Aumento vol. y osteoide (PTH+carga)
Tsiridis (2007)	1-34 +OP1loc	10 µg/kg/día 40 µg/kg/día	Conejos	Metáfisis distal tibia Fijador externo	Torsión Compresión axial	Acelera consolidación No diferencias en estudio biomecánico
Nozaka (2008)	1-34	100 µg/kg/día	Ratas ovariectomizadas	Defecto metáfisis tibial Cerclaje alambre	No	Aumento volumen hueso esponjoso Aumento superficie osteoide Acelera consolidación
Komatsu (2009)	1-38	3 µg/kg/día 10 µg/kg/día 30 µg/kg/día	Ratas ovariectomizadas	Defecto diáfisis femoral No osteosíntesis	Flex. 3 p	Aumento de la resistencia (30 µg) Aumento de la rigidez Aumento del tamaño y densidad.
Aleksyniene (2009)	1-34	25 µg/kg/día	Conejos	Diáfisis tibial Fijador externo Distracción	Flex. 3 p	
Abe (2007)	1-34	40 µg/kg (5d/sem)	Ratas	Artrodesis espinal Autoinjerto cresta	Flex. 3 p Manual	Aumento de la resistencia Aumento volumen y mineralización
Hashimoto (2007)	1-34 Zolendronato	10 µg/kg/día 100 µg/kg/día	Ratas	Injerto vascularizado Aguja IM	No lo indica	Aumento de la resistencia y contenido mineral
Skripitz (2000)	1-34	60 µg/kg/día	Ratas	Cámara ósea	No	Aumento hueso trabecular cámara
Skripitz (2001)	1-34	60 µg/kg/día	Ratas	Implante óseo	Fuerza extracción	Aumento del par tursor Aumento fuerza de extracción
Skripitz (2005)	1-34	60 µg/kg/día	Ratas	Implante óseo	Fuerza extracción	Aumento contacto óseo con implante
Gabet (2006)	1-34	5 µg/kg/día 25 µg/kg/día 75 µg/kg/día	Ratas ovariectomizadas	Implante óseo	Fuerza extracción	Aumento fuerza máxima, rigidez y tenacidad

Son numerosos y también muy variados los estudios biomecánicos realizados en animales, desde el estudio por flexión manual de una artrodesis vertebral, a la fuerza de extracción de un implante colocado en tejido óseo.

Así, Abe (2007) estudió el efecto del tratamiento de PTH 1-34 a dosis de 40 µg/kg/día en un modelo de artrodesis espinal en ratas, colocando autoinjerto de cresta ilíaca, trató a un grupo de animales con PTH y a otro con placebo, y sacrificando a los animales en los días 14, 28 y 42 tras la cirugía. Basándose en un test de palpación manual, observó que el grupo tratado con PTH alcanzó la fusión antes que el grupo de control y el estudio radiográfico mostró que se formó una masa de fusión más densa y mayor en los animales tratados con PTH comparado con el grupo control. En el estudio con microtomografía computerizada 3D mostró en los animales tratados con PTH una reabsorción más precoz del injerto y una masa de fusión mayor que en el grupo control. En el estudio microestructural, el volumen trabecular y los parámetros de conectividad de la masa de fusión fueron significativamente mayores en el grupo de PTH que en el grupo control. El examen histológico mostró que el grupo tratado con PTH tenía un mayor porcentaje de aposición mineral, de superficie mineralizada y de superficie de osteoclastos, comparado con el grupo control.

Skripitz (2000) mostró en ratas que el tratamiento con PTH 1-34 a dosis de 60 µg/kg/día incrementa la formación de una red de hueso trabecular y la densidad del hueso regenerado en el interior de una cámara ósea de titanio implantada en tibia proximal de forma tiempo-dependiente.

En 2001 Skripitz en otro estudio observa que el tratamiento en ratas con PTH 1-34 durante 4 semanas mejora la fijación en tibia proximal de implantes roscados de acero triplicando la fuerza del par torsor de extracción y duplicando la fuerza de extracción con respecto al grupo control. El autor concluye remarcando que la fijación de un implante depende de la densidad del hueso adyacente y puede ser considerado como el resultado final de la respuesta de consolidación a una fractura ocasionada por el implante, y por tanto el tratamiento con PTH podría mejorar la fijación de los implantes ortopédicos.

En una publicación posterior<sup>206</sup>, el mismo autor compara la fijación de dos implantes con rugosidades diferentes (acero inoxidable y cemento PMMA) implantados en metáfisis proximal tibial de ratas y tratadas con PTH 1-34 a dosis de 60 µg/kg/día con un grupo control, sacrificando a los animales a las 2 y 4 semanas. El tratamiento con PTH incrementó de forma significativa el porcentaje de contacto óseo con ambos implantes a las 2 y 4 semanas comparado con el grupo control. En los animales tratados con PTH las trabéculas óseas adyacentes al implante disminuyeron en número, haciéndose más gruesas, con un incremento en la masa ósea en el área adyacente al implante, comparado con el grupo control.

- **Ensayos mecánicos**

Nosotros hemos realizado dos tipos de ensayos mecánicos:

- Flexión a 4 puntos (no destructivo)

- Torsión (destrutivo)

Como ya se ha comentado en el epígrafe de Material y Métodos el ensayo de flexión a cuatro puntos se ha utilizado en muchos estudios para evaluar las características mecánicas de huesos largos<sup>221-224,265</sup>. Su principal ventaja respecto al ensayo de flexión a tres puntos es que la carga no se aplica directamente sobre el hueso consiguiéndose un momento de flexión uniforme a lo largo de toda la muestra<sup>237</sup>. Además al realizar las mediciones en 12 planos diferentes podemos evaluar la rigidez en distintos planos ya que al haber realizado la osteosíntesis de la fractura con un sistema de fijación externa pueden aparecer diferencias en los valores de rigidez obtenidos, tal y como se ha confirmado en nuestras observaciones

Posteriormente sobre las mismas muestras también hemos realizado un ensayo de torsión destructivo que nos permite obtener información sobre la resistencia del callo de fractura ya que la fuerza aplicada alcanza el punto de rotura del hueso. Este ensayo es un método estandarizado y también ha sido empleado por otros autores<sup>210,232-241,266</sup>. Este tipo de ensayo también permite calcular los parámetros de rigidez y tenacidad.

• **Ensayos de flexión**

Los resultados de los ensayos de flexión a cuatro puntos realizados en esta Tesis no muestran diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados (índice de rigidez, índice de área e índice de planitud) entre el grupo Control y el tratado con PTH, tal y como se muestran en las figuras 24, 25 y 26.

A raíz de estos datos cabría esperar que los callos tratados con PTH tengan un comportamiento mecánico de flexión similar a los del grupo control.

Al analizar el perfil polar de rigidez en los huesos osteotomizados, el grupo tratado con PTH muestra unos valores mayores de rigidez con una elipse más aplanada que la del hueso control sobre todo en los planos 2-8 y 3-9 en los que el grupo PTH presenta una mayor rigidez (figura 22). Puede que este hecho esté relacionado con la configuración y zona de implantación del sistema de fijación externa utilizado para la osteosíntesis de la fractura (monolateral en cara anteromedial de la tibia) que afecta tanto a los huesos tratados con PTH como a los del grupo control. No hemos encontrado ningún trabajo sobre el efecto de la PTH en la consolidación de las fracturas que haya estudiado este parámetro.

En los huesos no operados al analizar el perfil polar de rigidez, hemos encontrado que la rigidez es muy similar en los dos grupos (figura 23). Los hallazgos del perfil polar de rigidez en los huesos no operados no muestran que el tratamiento con PTH varíe las propiedades mecánicas de flexión en el hueso osteoporótico.

En la bibliografía publicada la mayoría de los autores utilizan modelos de flexión a 3 puntos.

Así, Andreassen<sup>61</sup> compara en ratas el efecto de dos diferentes dosis (60 y 200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) de PTH 1-34 con placebo en una fractura tibial a los 20 y 40 días. Realiza estudio radiográfico morfométrico y biomecánico (destrutivo de flexión a 3 puntos) y densitométrico del callo de fractura, y encuentra que la dosis de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  de PTH 1-34 aumentó de forma significativa los valores



de resistencia y el volumen externo del callo de fractura tras 20 y 40 días de tratamiento, con respecto a placebo. La dosis de 60  $\mu$ /kg/día de PTH 1-34 sólo lo hizo de forma significativa tras 40 días de tratamiento con respecto a placebo. El contenido mineral óseo del callo de fractura aumentó significativamente en ambos períodos y con ambas dosis, siendo además dosis-dependiente. En la tibia contralateral intacta ambas dosis aumentaron el contenido mineral óseo y la densidad mineral ósea de forma dosis y tiempo dependiente.

En un estudio posterior<sup>60</sup> compara el efecto de tres análogos de PTH (PTH1-34; PTH 1-31 y monocyclic PTH 1-31) a dosis de 60  $\mu$ g/kg/día con placebo en la consolidación de una fractura tibial osteosintetizada con aguja intramedular en ratas adultas y sacrificadas a las 8 y 16 semanas. Se realizaron estudios morfométricos, biomecánicos de flexión a tres puntos destructivos, y densitométricos del callo de fractura. A las 8 semanas, se observó en los animales tratados con PTH (sin existir diferencia entre los tres tipos de hormona) un aumento del 66% en la resistencia máxima, del 58% en la rigidez máxima, y del 28% del volumen del callo y del 42% del contenido mineral óseo del callo con respecto a placebo. Al normalizar los resultados con el volumen del callo, no se observan diferencias en la calidad mecánica del callo óseo. A las 16 semanas, no existieron diferencias entre los grupos tratados y el grupo control en rigidez, volumen del callo ni calidad del callo, ni el contenido mineral óseo. Desde las 8 hasta las 16 semanas, en animales tratados con PTH, la fuerza del callo y sus cualidades mecánicas continuaron aumentando, y el volumen disminuyó debido a la maduración y remodelado de éste. Los autores concluyen que el tratamiento con PTH mejora la resistencia

mecánica del callo de fractura debido al aumento en las dimensiones del callo y a su contenido mineral óseo. Además, desde la 8<sup>a</sup> a la 16<sup>a</sup> semana el remodelado de ese callo no se ve influenciado por el tratamiento previo con PTH.

Komatsubara<sup>190</sup> estudia en ratas el efecto en el callo de una fractura femoral tratada con fijación intramedular de dos dosis de PTH 1-34 (10 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) cuando se administraba durante 3 semanas antes y se interrumpía tras la osteotomía, o se pautaba antes y después de la osteotomía manteniéndose el tratamiento hasta el sacrificio, y comparándolos con un grupo control. El sacrificio se realizó a las 3, 6 y 12 semanas tras la fractura. Se realizaron estudios radiográficos, de tomografía computerizada periférica cualitativa, ensayos mecánicos de flexión a 3 puntos y análisis histológico e histomorfométricos. A las 3 semanas la línea de fractura era visible en todos los grupos; a las 6 semanas la línea de fractura todavía se observaba en casi todos los fémures. A las 12 semanas, la fractura no era visible en ningún grupo. No se observaron diferencias entre grupos. La densidad mineral ósea del callo de fractura aumentó significativamente a las 12 semanas tras la fractura en los grupos de tratamiento de 30  $\mu\text{g}$  previa y 10 y 30  $\mu\text{g}$  previa y posterior a la fractura. No existieron diferencias entre grupos con respecto al área transversal del callo. En los ensayos biomecánicos, la resistencia máxima, rigidez, y la energía absorbida (tenacidad) no variaron significativamente entre grupos a las 3 y 6 semanas; sin embargo a las 12 semanas tras la fractura la resistencia máxima en el grupo tratado con 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  antes y después de la fractura fue significativamente mayor que en el grupo control. Las propiedades materiales intrínsecas como la tensión máxima, módulo elástico y dureza no variaron

significativamente entre los distintos grupos. En el estudio histológico se observó que el área total del callo no varió entre grupos, pero el porcentaje de tejido óseo de dicha área aumentó en los grupos tratados con PTH, así como el porcentaje de tejido lamelar de dicho callo, el ratio de formación ósea/área unitaria de callo y el número de osteoclastos.

Los autores concluyen que el tratamiento con PTH incrementa la resistencia mecánica del callo de fractura acelerando el remodelado de hueso inmaduro a hueso lamelar y acelerando la formación de nuevo hueso cortical sin aumentar el tamaño del callo, lo que significa que el tratamiento con PTH acelera el proceso natural de consolidación y que la resistencia mecánica del hueso remodelado fue significativamente mayor a las 12 semanas en los animales tratados con PTH 30 µg/kg/día. También demuestran que el tratamiento previo con PTH no dificulta en el proceso de la consolidación de la fractura.

Manabe<sup>194</sup> es el primero que estudia el efecto de la hormona paratiroidea (PTH 1-34) en la consolidación de fracturas en animales grandes (monos) con un sistema de remodelado Haversiano. Para ello, compara dos dosis de PTH 1-34: 0,75 µg/kg/día y 7,5 µg/kg/día, inyectados subcutáneamente dos veces por semana y un grupo control, tras realizar una osteotomía femoral y fijarla con una placa en monas cynomolgus adultas, y sacrificarlas a las 26 semanas tras la fractura. El estudio radiográfico mostró una unión completa en todos los grupos, independientemente del tratamiento. En los estudios biomecánicos de flexión a 3 puntos, la tensión máxima y el módulo elástico del fémur fracturado fue significativamente mayor en el grupo

tratado con una elevada dosis de PTH que en el grupo control. El área total del callo y el porcentaje óseo de dicha área fue significativamente menor en ambos grupos de tratamiento con PTH que con el grupo control. El número de osteoclastos fue menor con ambas dosis de PTH que en el grupo control. La porosidad del callo disminuye con el tratamiento de PTH de forma dosis-dependiente. La densidad mineral ósea del callo fue significativamente mayor en el grupo de dosis alta de PTH que en el control. Estos resultados sugieren que el tratamiento con PTH disminuye el tamaño del callo y acelera la maduración de éste, aumentando el grado de mineralización del callo de fractura, restaurando así las propiedades intrínsecas tras una osteotomía diafisaria de fémur en monos cynomolgus, aunque no existieron diferencias entre grupos para los parámetros estructurales (resistencia máxima, rigidez y tenacidad).

Aleksyene<sup>200</sup> estudia los efectos de dos regímenes de tratamiento de PTH 1-34 en un callo de fractura de la tibia de conejos, sometidos a distracción mediante un fijador externo. Tras realizar la fractura y comenzar la distracción en el 5º día, realizan un alargamiento de 10 mm durante 10 días (1 mm/día) y posteriormente mantienen el fijador durante 20 días más, para sacrificar a los animales a los 35 días. Durante la fase de alargamiento y consolidación (30 días) tratan al 1º grupo con 25 µg/kg/día de PTH 1-34; al 2º grupo con salino durante los 10 días de alargamiento y PTH 1-34 a dosis de 25 µg/kg/día durante los 20 días del período de consolidación, y al 3º grupo con salino durante los 30 días. En los dos grupos tratados con PTH los callos fueron radiográficamente más densos y mayores que en el grupo control. Los dos grupos tratados con PTH tuvieron un volumen de tejido regenerado y un

volumen en la mitad de la diálisis significativamente mayor que el grupo control. Las dimensiones externas del callo regenerado fueron significativamente mayores en los dos grupos de PTH que en el grupo control. Los callos tratados con PTH tuvieron un mayor contenido mineral óseo y una mayor densidad ósea que el grupo control. En el estudio biomecánico la resistencia máxima de los callos tratados con PTH fueron un 33% y un 30% mayores que el grupo control. La tenacidad fue mayor en los grupos de tratamiento con PTH comparado con el grupo control. La rigidez del callo fue un 13% y un 8% mayor en los grupos de tratamiento con PTH que en el grupo control. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento con PTH en ninguno de los parámetros estudiados.

Seebach<sup>201</sup> estudió el efecto del tratamiento de PTH 1-34 a dosis 60µg/kg/día en el callo de distracción femoral en ratas adultas comparado con placebo mediante flexión a 3 puntos. A los 20 días el tratamiento con PTH 1-34 incrementó significativamente la resistencia máxima y la rigidez del callo más del 50%. El volumen total del callo y su área transversal fueron mayores en el grupo tratado con PTH, y la densidad mineral ósea se incrementó en dicho grupo un 24%. El análisis histológico mostró un aumento de la densidad ósea del 35% sin que se modificase el grosor trabecular. A los 40 días de la fractura, el tratamiento con PTH 1-34 incrementó la resistencia máxima y la rigidez del callo más de 50%, sin modificar el máximo tensional ni el módulo de elasticidad. No existieron diferencias en el volumen del callo ni en su área entre los grupos de tratamiento y control. La densidad mineral ósea del callo fue un

11% mayor en los animales tratados con PTH. El análisis histológico mostró un incremento en la densidad ósea del 23% y un gran incremento del grosor trabecular del 114% en los callos de distracción tratados con PTH. Los autores hipotetizan que el tratamiento con PTH fue más efectivo en el grupo de distracción de 20 días porque se instauró el tratamiento con PTH en el inicio de la de distracción (en el día 7 tras la osteotomía), mientras que en el grupo de distracción de 40 días se comenzó el tratamiento en el día 27 tras la osteotomía (cuando ya había finalizado la distracción hacía 10 días). Sin embargo, también podría deberse a que en el segundo grupo el callo ya fuese más maduro al llevar más tiempo de evolución y sus parámetros se acercasen más a la normalidad, tras un período mayor de remodelación. Los autores también encontraron un aumento de las propiedades biomecánicas y de la densidad mineral ósea del fémur contralateral intacto, aunque en mucha menor medida que en el callo de distracción, y teorizan sobre el efecto de PTH 1-34 es mayor en el hueso cuando se activa la respuesta reparativa.

El único estudio biomecánico mediante flexión a 4 puntos que hemos encontrado es el de Gardner<sup>193</sup>, que estudió el efecto sinérgico de la PTH y la carga en la consolidación de las fracturas en ratones, a los que les realizaba una osteotomía tibial que fijaba con una aguja intramedular, y posteriormente los dividió en 4 grupos, a los que trató con aplicación de cargas mecánicas diarias, PTH 1-34 (30 µg/kg/día), carga mecánica diaria + PTH a la misma dosis, y grupo control; sacrificando a los animales a los 18 días tras la fractura para realizar estudios histológicos, microtomografía computerizada y ensayos biomecánicos de flexión a cuatro puntos. El grupo tratado con carga + PTH incrementó la actividad osteoblástica y osteoclástica y fue el único grupo que

formó callos más grandes, con mayor densidad y mayor porcentaje de volumen óseo. El grupo tratado sólo con PTH formó más osteoide en el callo que el grupo control, indicando un aumento precoz de la actividad osteoblástica. Este grupo mostró un mayor contenido mineral óseo y volumen de hueso comparado con el grupo control. El grupo tratado exclusivamente con carga tuvo una mayor actividad osteoclástica que el grupo control. Estos hechos apoyan la actividad sinérgica de la PTH y la carga en la consolidación de las fracturas. El estudio biomecánico de flexión a cuatro puntos no encontró diferencias significativas en la resistencia ni en la rigidez del callo entre los grupos estudiados.

Así observamos que la mayoría de autores que realizan ensayos de flexión lo hacen a tres puntos y mayoritariamente (aunque no de forma unánime) encuentran un aumento de la resistencia y de la rigidez de los callos de fractura de animales tratados con PTH. Sólo hemos encontrado un autor (Gardner 2007) que realiza ensayos de flexión a cuatro puntos, y al igual que nosotros no encuentra diferencias significativas en ninguno de los parámetros biomecánicos estudiados. En cuanto a los resultados descriptivos del perfil polar de rigidez, como dijimos anteriormente, no hemos encontrado ningún trabajo sobre el efecto de la PTH en la consolidación de las fracturas que haya estudiado este parámetro.

#### • **Ensayos de torsión**

En cuanto a los ensayos a torsión, nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en ninguno de los tres parámetros, par torsor,

tenacidad y rigidez torsional (figuras 27, 28 y 29) entre el grupo control y el grupo tratado con PTH.

Algunos autores también han utilizado ensayos a torsión como Holzer<sup>56</sup> que investigó el efecto en ratas de la administración de PTH 1-34 a dosis de 80 µg/kg/día tras una fractura femoral a los 21 días de evolución. Observó un aumento significativo de la resistencia del callo de fractura pero no un incremento de la rigidez del mismo en los animales tratados con PTH comparados con el grupo control. El estudio densitométrico mediante DEXA y la tomografía computerizada cuantitativa periférica confirmaron el incremento de densidad ósea de los callos tratados con PTH comparados con control, pero sus valores no llegaron a alcanzar significación estadística. En el estudio histológico, los callos tratados con PTH mostraron una mayor osificación central que el grupo control.

Alkhiary<sup>188</sup> estudió el efecto del tratamiento de PTH 1-34 en ratas tras realizarle una osteotomía femoral y sintetizarla con aguja intramedular. Para ello realizó 3 grupos, a los que trató con inyecciones diarias de 5 ó 30 µg/kg/día de PTH 1-34 o placebo (control), durante un máximo de 35 días. Estos grupos fueron subdivididos en 3 subgrupos de animales, que se sacrificaron a los 21, 35 u 84 días. Se realizaron estudios biomecánicos de torsión, análisis histomorfométrico, radiográfico y tomografía computerizada microcuantitativa.

En el análisis radiográfico cualitativo, a los 21 días de tratamiento, sólo los animales tratados a dosis de 30 µg/kg/día mostraron un puente óseo sobre la fractura y la radioopacidad se incrementó con respecto al grupo control. A



los 35 días ambos grupos tratados con PTH habían mejorado la radioopacidad y el callo medular.

En el análisis radiográfico microcuantitativo mediante tomografía computerizada, a los 21 días, el contenido mineral óseo y la densidad de los callos de animales tratados a dosis de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  PTH 1-34 se incrementaron significativamente con respecto al grupo control. A los 35 días de tratamiento, el contenido mineral óseo y la densidad de los callos aumentó significativamente en ambas dosis de tratamiento con PTH (5 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) con respecto al grupo control. A los 84 días de curación sólo se mantuvieron elevados significativamente ambos parámetros en los animales tratados a dosis más alta de PTH (30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ).

En el análisis biomecánico, en el grupo tratado con PTH a dosis de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  con respecto al grupo control, la rigidez fue significativamente mayor a los 21 días, y el par torsor máximo fue significativamente mayor a los 21, 35 y 84 días. No existieron diferencias biomecánicas de ningún tipo a dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ .

En el análisis histológico e histomorfométrico, no existieron diferencias en el volumen de los callos. El porcentaje de cartílago del callo se incrementó significativamente a los 21 días para los animales tratados a dosis de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  con respecto a los controles y en ambos grupos (5 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) a los 35 días de curación, no existiendo diferencias en ningún grupo a los 84 días. Respecto al porcentaje de tejido óseo, fue significativamente mayor con ambas dosis de PTH sólo a los 35 días de evolución. En cuanto a la cantidad de espacio vacío en el callo, se observó una disminución significativa con

respecto al grupo control con ambas dosis de PTH a los 35 días de tratamiento. No existieron diferencias en cuanto a la cantidad de osteoclastos con cualquier dosis y en ningún período de evolución, lo que sugiere según los autores que la administración de esta droga acelera la consolidación ósea aumentando el remodelado del cartílago y la formación ósea, pero sin aumentar la resorción ósea.

Esto indica que la rigidez es una propiedad que se adquiere precozmente, y la resistencia máxima se alcanza posteriormente. La falta de efecto en las pruebas biomecánicas con la dosis más baja (5 µg/kg/día) podría indicar que esta dosis no fuera suficiente para mejorar la consolidación en este animal, sin embargo el aumento en el contenido y densidad mineral ósea a los 35 días con esta dosis demuestra que mejoró el desarrollo del callo. El aumento del volumen de cartílago en el callo a los 21 días a 30 µg/kg/día sugiere un efecto precoz de la PTH de la proliferación de los condrocitos en el período de consolidación. La disminución posterior del volumen de cartílago a los 35 días con ambas dosis sugiere una aceleración de la osificación endocondral, que junto con la disminución de espacios vacíos en el callo a los 35 días con ambas dosis sugiere una aceleración del proceso de consolidación. Otro aspecto importante de este estudio es que no se observó un aumento en el diámetro del callo ni en la densidad de osteoclastos, lo que sugiere que el efecto de la PTH fue mejorar la calidad del callo, ya que aumentaron las propiedades mecánicas y estructurales sin un incremento en el área del callo.

Tsiridis<sup>195</sup> comparó el efecto sistémico de la PTH con el efecto local de la OP-1 en la consolidación de una osteotomía cuneiforme metafisaria en tibia

distal de conejos sintetizada con un fijador externo. Realiza el estudio con cinco grupos: control (sin tratamiento) y en los otros cuatro grupos rellena el defecto con fosfato tricálcico. De los cuatro grupos con fosfato tricálcico, en uno lo mezcla con OP-1, en otros dos recibieron inyecciones diarias subcutáneas de PTH 1-34 a dosis de 10 y 40  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  respectivamente y el cuarto sólo con fosfato tricálcico. Tras sacrificar a los animales a los 28 días, realizó tomografía computerizada cuantitativa periférica, histología y estudios biomecánicos de compresión axial y torsión. Observó que la OP-1 estimuló la formación ósea localmente y ambas dosis de PTH aceleraron la consolidación sistémicamente comparado con el grupo control y con el fosfato tricálcico aislado. Todos los grupos habían consolidado a las 4 semanas, lo que indicó que el defecto no era crítico. Las tibias tratadas con bajas dosis de PTH mostraron mayor cantidad de contenido mineral óseo y área de sección transversal que los otros cuatro grupos. No existieron diferencias entre grupos en la densidad mineral ósea ni en los momentos de inercia. En los ensayos biomecánicos sólo el grupo OP-1+TCP alcanzó significativamente un par máximo mayor que el grupo control. En el estudio histológico, la presencia de hueso nuevo fue evidente en el grupo OP-1+TCP, y en menor medida en el de bajas dosis de PTH, y estos grupos un tejido óseo mucho mejor organizado en el defecto que el resto de los grupos. No existieron diferencias entre ambas dosis de PTH en ningún parámetro observado.

Como podemos comprobar los resultados de los ensayos de torsión en ratas y conejos publicados por los diferentes autores son diferentes y en ocasiones contradictorios, encontrando algunos un aumento de la resistencia y

de la rigidez, otros un aumento sólo de la rigidez y otros no encontrando diferencias en el estudio biomecánico a torsión.

Nosotros no hemos podido demostrar estos hallazgos en nuestro trabajo con un animal de experimentación distinto, no hemos encontrado diferencias significativas en ninguno de los parámetros de torsión estudiados (figuras 27, 28 y 29) mostrando, por lo tanto, los callos tratados con PTH 1-84 una resistencia equivalente a la de los del grupo control.

Al analizar los efectos de la PTH 1-84 en los huesos no operados mediante ensayos de torsión, nosotros no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros de torsión estudiados (figuras 30, 31 y 32).

En las gráficas de perfil polar de rigidez de las tibias no operadas encontramos una rigidez similar (figura 23) y en la medición de áreas en las imágenes de TAC de la zona de osteotomía de las tibias no operadas (figura 21), no hemos podido observar diferencias estadísticamente significativas.

#### • **Análisis densitométricos**

A partir de las imágenes de TAC hemos realizado un estudio morfológico y densitométrico del callo de fractura. Posteriormente estos hallazgos se han estudiado en profundidad analizando el callo en su totalidad, calculando el volumen y la densidad, así como la porción del callo en el plano de la zona de fractura dividiéndola en 4 zonas de densidad progresiva, midiendo el volumen y densidad media de cada una de ellas. Con ello podemos estudiar la distribución de las distintas densidades y evaluar si la composición del callo de fractura se ve alterada por el efecto de la PTH.

En nuestro trabajo, los resultados de los ensayos densitométricos del callo completo demuestran un volumen total del callo similar en ambos grupos (figura 33) con una densidad media del callo de fractura muy parecida entre el grupo control y PTH (figura 34).

En los ensayos densitométricos de la zona de fractura no hay diferencias significativas en el volumen medio de las distintas isodensidades (figuras 38, 39, 40 y 41). En cuanto a las densidades medias de las distintas isodensidades sólo hemos encontrado diferencias significativas para la isodensidad 4 (figura 47) que es la zona de densidad máxima, siendo mayor esta densidad media en los callos del grupo PTH. En el resto de isodensidades no encontramos diferencias significativas en las densidades medias (figuras 43, 44, 45 y 46). No hemos podido dar explicación a esta única diferencia en la isodensidad más alta y tampoco hemos hallado trabajos que lo estudien.

Si analizamos los trabajos publicados sobre el efecto de la PTH en la consolidación ósea vemos que casi todos se realizan en animales pequeños (ratas o conejos) y sólo un autor (Manabe<sup>194</sup>) utiliza animales con un sistema de consolidación similar a los humanos (monas adultas). Los hallazgos de estos autores muestran en general una aceleración de la consolidación, pero con algunas diferencias entre sí.

Andreassen en 2004 encuentra un aumento en el contenido mineral óseo del callo de fractura dosis-dependiente y un aumento de las dimensiones del mismo, con un comportamiento biomecánico similar al control al normalizar los datos con el volumen del callo. Además el remodelado no se ve influenciado por el tratamiento previo con PTH.

Alkhiary<sup>188</sup> encontró un aumento en el contenido mineral óseo y en la densidad en el lugar de la fractura dosis y tiempo-dependientes, sin aumentar el volumen del callo ni la densidad de osteoclastos, lo que sugiere que la PTH puede mejorar la calidad de dicho callo, ya que aumentaron las propiedades mecánicas y estructurales sin un incremento en el área del callo.

Holzer<sup>56</sup> no pudo demostrar diferencias significativas en la densidad ósea de los callos femorales de ratas tratadas con PTH.

Nakajima<sup>189</sup> por el contrario observó una aceleración de la consolidación radiográfica y un aumento significativo del contenido mineral óseo en el callo de fractura femoral de ratas tratadas con dosis bajas de PTH 1-34.

Komatsubara<sup>190</sup> encontró una aceleración del remodelado del hueso inmaduro a hueso lamelar, aumentando la formación de hueso cortical, pero sin aumentar el tamaño del callo.

Kakar<sup>192</sup> por el contrario encuentra callos más grandes así como una maduración precoz de los mismos.

Gardner<sup>193</sup> también encuentra callos más grandes, con más densidad y mayor porcentaje de tejido óseo, sin encontrar sin embargo diferencias en los test biomecánicos.

Manabe<sup>194</sup> como dijimos anteriormente es el único autor que realiza su estudio en monos, encontrando una disminución del área total del callo, del porcentaje óseo y del número de osteoclastos en los individuos tratados con PTH, aumentando la densidad mineral, que el autor atribuye a una aceleración

de la maduración, no encontrando diferencias significativas en los estudios biomecánicos.

Kim (1999) estudia el efecto del tratamiento con PTH 1-84 en fracturas tibiales de ratas ovariectomizadas y concluye que esta hormona aumenta el tejido trabecular en el callo, aumentando su volumen, pero con un aumento de la porosidad.

Bostrom (2000) estudia el efecto de un análogo de la PTH 1-34 en conejos con una capacidad disminuida de la consolidación debido a un tratamiento corticoideo crónico, y encuentra que los animales tratados mostraron una mayor intensidad radiográfica, y una mayor área en el callo de fractura, pero en el análisis densitométrico no se apreciaron diferencias significativas.

Andreassen<sup>60</sup> estudió en ratas ancianas los efectos de la administración de PTH 1-34 en la consolidación de una fractura tibial, encontrando un aumento del volumen externo del callo y de su contenido mineral óseo, y concluyen que PTH mejora la consolidación ósea en estos animales de avanzada edad.

Nozaka<sup>198</sup> estudia el efecto de PTH 1-34 tras una osteotomía en hueso esponjoso en ratas ovariectomizadas y encuentra un aumento del volumen de hueso esponjoso y de superficie osteoide, mejorando la consolidación tras la administración de PTH tanto en animales ovariectomizados como en los que no lo estaban.

Aleksyniene<sup>200</sup> realiza en conejos una osteotomía tibial, sometiéndola a distracción y obtiene un aumento de las dimensiones del callo y de la densidad de éste en los sujetos tratados con PTH comparados con el grupo control.

Abe estudió el efecto de PTH 1-34 en un modelo de artrodesis vertebral en ratas y encontró una masa de fusión mayor y más densa con una mayor mineralización, y con una reabsorción más precoz del injerto en los animales tratados con PTH.

Hay que recordar de nuevo que excepto el estudio de Manabe<sup>194</sup>, realizado en monos, se trata de experimentos en animales pequeños (ratas o conejos) y que estos animales realizan una consolidación distinta a los humanos, por lo que extraer conclusiones en comparación con nuestros resultados es difícil. Además los periodos de tiempo en los que se realiza el estudio del callo varían enormemente, lo cual hace más difícil el realizar comparaciones entre sí.

Nuestros análisis densitométricos revelan callos similares con una densidad equivalente entre ambos grupos. Así mismo, si estudiamos la distribución de las distintas isodensidades no hay diferencias en cuanto al volumen o a la densidad media, excepto en la isodensidad 4. Esto lo podríamos interpretar como que el tratamiento con PTH no altera la consolidación de la fractura ni la remodelación ósea del callo fracturario.

Nuestros resultados contrastan con los obtenidos por la mayor parte de los estudios experimentales, en los que casi uniformemente el tratamiento con Hormona Paratiroidea mejora la consolidación de las fracturas. Pensamos



que esta evidente disparidad de resultados se debe a la dosis de Hormona Paratiroidea utilizada en nuestro estudio.

Nosotros hemos querido utilizar una dosis de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , similar a la utilizada en la clínica diaria para el tratamiento de la osteoporosis y mucho menor de las dosis utilizadas en estudios experimentales en las que se han llegado a utilizar dosis 200 veces superiores. Este hecho debe hacernos reflexionar lo alejados que están en ocasiones dichos estudios experimentales de su aplicación posterior a la práctica clínica en humanos.



## CONCLUSIONES

1.- La osteotomía tibial estabilizada mediante un fijador externo en ovejas ovariectomizadas es un modelo de fractura osteoporótica reproducible y en el que la consolidación se produce en unas condiciones parecidas a las humanas. Por ello consideramos que es un buen modelo experimental para estudiar el efecto de la Hormona Paratiroidea en la consolidación de fracturas osteoporóticas.

2.- El tratamiento con Hormona Paratiroidea tras una fractura tibial en una oveja osteoporótica no modifica de forma significativa el área del callo de fractura ni su volumen total a las dosis utilizadas.

3.- El comportamiento biomecánico de los callos tratados con Hormona Paratiroidea no ha mostrado diferencias significativas con respecto al grupo control, tanto en los ensayos de flexión a cuatro puntos como en los de torsión.

4.- El análisis densitométrico de los callos demuestra que ambos grupos presentaron una densidad media similar y una distribución dentro del callo en el que sólo la isodensidad más alta fue mayor en el grupo tratado con Hormona Paratiroidea.

5.- Atendiendo a las conclusiones 2, 3 y 4 podemos afirmar que en nuestro modelo experimental de fractura osteoporótica, el tratamiento con Hormona Paratiroidea no modifica de forma significativa las características del callo óseo con respecto al grupo control.



## **ESTUDIOS FUTUROS**

Debido a las limitaciones que hemos encontrado en nuestro trabajo, nos planteamos realizar nuevos estudios con mayor número de muestras para evitar la dispersión encontrada, principalmente en los estudios biomecánicos.

Tampoco hemos podido realizar análisis histomorfométrico de la zona del callo de fractura, ya que las pruebas mecánicas de torsión son destructivas y las muestras quedaban muy dañadas, siendo imposible utilizar estas muestras para llevar a cabo un estudio histomorfométrico de calidad. El realizar una serie para estudiar parámetros histomorfométricos sería un excelente complemento a este trabajo y podrían ayudarnos a interpretar mejor nuestros resultados.

También sería interesante realizar un diseño de experiencias similar pero ampliando el período de estudio con el fin de analizar si mejoran las características de resistencia mecánica y densidad mineral ósea (DMO), como se ha observado en otros estudios en los que se que utilizan las ratas como animales de experimentación.

Este mismo modelo experimental se ha utilizado para estudiar el efecto de un fármaco utilizado para tratamiento de la osteoporosis (Zolendronato) con un mecanismo de acción antirresortivo, contrario al mecanismo de acción de la PTH. Nos planteamos en un estudio complementario comparar el efecto entre dichos fármacos en la consolidación de las fracturas.



# BIBLIOGRAFÍA

1. NIH Consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *JAMA* 2001; 285(6): 785-795.
2. Melton LJ III, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW and Riggs BL. Perspective: how many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1005-10.
3. Johnell O, Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos Int*. 2005; 16 Suppl 2: S3-7.
4. Serbno I, Johnell O. Consequences of a hip fracture: a prospective study over 1 year. *Osteoporos Int* 1993; 3: 148-53.
5. Lau E, Ong K, Kurtz S, Schmier J, Edidin A. Mortality following the diagnosis of a vertebral compression fracture in the Medicare population. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90A: 1479-86.
6. Freedman KB, Kaplan FS, Bilker WB, Strom BL, Lowe RA. Treatment of osteoporosis. Are physicians missing an opportunity? *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82-A: 1063-70.
7. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21: 115-37.
8. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, Cosman F, Lakatos P, Leung PC, Man Z, Mautalen C, Mesenbrink P, Hu H, Caminis J, Tong K, Rosario-Jansen T, Krasnow J, Hue TF, Sellmeyer D, Eriksen EF, Cummings SR; HORIZON Pivotal Fracture Trial. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*. 2007; 356(18):1809-22.
9. Harris ST, Watts NB, Genant HK, McKeever CD, Hangartner T, Keller M, Chesnut III CH, Brown J, Eriksen EF, Hoseney MS, Axelrod DW, Miller PD. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis. A randomized controlled trial. *JAMA* 1999; 282: 1344-52.
10. Papapoulos SE. Bisphosphonate actions: physical chemistry revisited. Review. *Bone* 2006; 38: 613-6.
11. Weaver MJ, Miller MA, Vrahas MS. The orthopaedic implications of diphosphonate therapy. *J Am Acad Orthop Surg* 2010; 18: 367-74.
12. Contin M. The U.S. Food and Drug Administration -FDA- warns of possible femoral fractures with bisphosphonates. Disponible en: [http://www.biomedtown.org/biomed\\_town/vphop/reception/news/FDA](http://www.biomedtown.org/biomed_town/vphop/reception/news/FDA).
13. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* 1998; 355S: S7-21.

14. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 2005; 19(10 Suppl): S4-6.
15. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 2005; 36 Suppl 3:S5-7.
16. Egermann M, Schneider E, Evans CH, Baltzer AW. The potential of gene therapy for fracture healing in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2005; 16: S120-8.
17. Giannoudis PV, Schneider E. Principles of fixation of osteoporotic fractures. *J Bone Joint Surg Br* 2006; 88-B: 1272-8.
18. Aspenberg P. Special Review: Accelerating fracture repair in humans: a reading of old experiments and recent clinical trials. *Bonekey Rep.* 2013 Jan 9;2:244. doi: 10.1038/bonekey.2012.244.
19. Lill CA, Fluegel AK, Schneider E. Sheep model for fracture treatment in osteoporotic bone: a pilot study about different induction regimens. *J Orthop Trauma* 2000; 14(8): 559-66.
20. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993; 14: 595-608.
21. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsmann AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2001;344:1434-41.
22. Ellegaard M, Jørgensen NR, Schwarz P. Parathyroid Hormone and Bone Healing. *Calcif Tissue Int.* 2010; 87:1–13.
23. Beaver R, Brinker MR, Barrack RL. An analysis of the actual cost of tibial nonunions. *J La State Med Soc.* 1997;149:200-6.
24. Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg.* 2005;13:77-86.
25. Ignatius AA, Betz O, Augat P, Claes LE. In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly(lactide) used as bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res* 2001;58:701–9.
26. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84:1032-44.
27. Einhorn TA. Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85(Suppl 3):82-8.
28. Dimitriou R, Carr IM, West RM, Markham AF, Giannoudis PV. Genetic predisposition to fracture non-union: a case control study of a preliminary



- single nucleotide polymorphisms analysis of the BMP pathway. *BMC Musculoskelet Disord* 2011;12:44.
29. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 2011;11:471–491.
  30. Carragee EJ, Ghanayem AJ, Weiner BK, Rothman DJ, Bono CM. A challenge to integrity in spine publications: years of living dangerously with the promotion of bone growth factors. *Spine J* 2011;11:463–468.
  31. Laursen M, Hoy K, Hansen ES, Gelineck J, Christensen FB, Bunger CE. Recombinant bone morphogenetic protein-7 as an intracorporeal bone growth stimulator in unstable thoracolumbar burst fractures in humans: preliminary results. *Eur Spine J* 1999;8:485–490.
  32. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:2123–2134.
  33. Aro HT, Govender S, Patel AD, Hernigou P, Perera de Gregorio A, Popescu GI et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: a randomized trial in open tibial fractures treated with reamed nail fixation. *J Bone Joint Surg Am* 2011;93:801–808.
  34. Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, Rizzoli R on behalf of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) (2008) European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 19: 399-428.
  35. Lindsay R, Scheele WH, Neer R, Pohl G, Adami S, Mautalen C, Reginster JY, Stepan JJ, Myers SL, Mitlak BH. Sustained vertebral fracture risk reduction after withdrawal of teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. *Arch Intern Med*. 2004;164:2024-30.
  36. Prince R, Sipos A, Hossain A, Syversen U, Ish-Shalom S, Marciniowska E, Halse J, Lindsay R, Dalsky GP, Mitlak BH. Sustained nonvertebral fragility fracture risk reduction after discontinuation of teriparatide treatment. *J Bone Miner Res*. 2005;20:1507-13.
  37. Kaufman JM, Orwoll E, Goemaere S, San Martin J, Hossain A, Dalsky GP, Lindsay R, Mitlak BH. Teriparatide effects on vertebral fractures and bone mineral density in men with osteoporosis: treatment and discontinuation of therapy. *Osteoporos Int*. 2005;16:510-6.

38. Bringhurst FR, Demay M, Kronenberg HM. Hormones and Disorders of Mineral Metabolism. En Williams Textbook of Endocrinology. Larsen, Kronenberg, Melmed, Polonsky editors, Saunders, Philadelphia, 2002, pags. 1303-59).
39. Morris CD. Orthopaedic pharmacology and therapeutics. In: Einhorn TA, O'Keefe RJ, Buckwalter JA, eds. Orthopaedic Basic Science: Foundations of Clinical Practice, 3rd ed. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2007:315–330.
40. Ejersted C, Andreassen TT, Hange E-M, Melsen F, Oxlund H. Parathyroid hormone (1-34) increases vertebral bone mass, compressive strength and quality in old rats. *Bone* 1995;17(6): 507-11.
41. Ejersted C, Andreassen TT, Oxlund H, Jorgensen PH, Bak B. Human parathyroid hormone (1-34) and (1-84) increase the mechanical strength and thickness of cortical bone in rats (abstract). *J Bone Miner Res* 1993;9(8):1097-101.
42. Kimmel DB, Bozzato RP, Kronis KA, Coble T, Sindrey D, Kwong P, Recker RR. The effect of recombinant human (1-84) or synthetic human (1-34) parathyroid hormone on the skeleton of adult osteopenic ovariectomized rats. *Endocrinology* 1993;4(132):1577-84.
43. Mosekilde L, Sogaard CH, Danielsen CC, Topping O. The anabolic effects of human parathyroid hormone (hPTH) on rat vertebral body mass are also reflected in the quality of bone, assessed by biomechanical testing: a comparison study between hPTH-(1-34) and hPTH-(1-84) (abstr.). *Endocrinology* 1991;1(129):421-8.
44. Mosekilde L, Sogaard CH, McOsker JE, Wronski TJ. PTH has a more pronounced effect on vertebral bone mass and biomechanical competence than antiresorptive agents (estro-gen and bisphosphonate)- assessed in sexually mature, ovariectomized rats. *Bone* 1994;4(15):401-8.
45. Oxlund H, Ejersted C, Andreassen TT, Topping O, Nilsson MH. Parathyroid hormone (1-34) and (1-84) stimulate cortical bone formation both from periosteum and endosteum. *Calcif Tissue Int* 1993;6(53):394-9.
46. Whitfield JF, Morley P, Willick GE, Ross V, MacLean S. Comparison of the ability of recombinant human parathyroid hormone, rhPTH-(1-84), and hPTH-(1-31) NH2 to stimulate femoral trabecular bone growth in ovariectomized rats (abstr.). *Calcif Tissue Int* 1997;1(60):26-9.
47. Murray TM, Rao LG, Divieti P, et al. Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocr Rev*. 2005;26:78–113.

48. Collip JB, Leitch DB. A case of tetany treated with Parathyrin. *Can Med Assoc J.* 1925 Jan;15(1):59-60.
49. Albright F, Ellsworth R. Studies on the physiology of the parathyroid glands: I. Calcium and Phosphorus Studies on a Case of Idiopathic Hypoparathyroidism. *J Clin Invest.* 1929 Jun;7(2):183-201.
50. Bauer W, Aub JC, Albright F. Studies of calcium and phosphorus metabolism: a study of the bone trabeculae as a readily available reserve supply of calcium. *J Exp Med.* 1929 Jan 1;49(1):145-62.
51. Selye H. On the stimulation on bone formation with parathyroid extract and irradiated ergosterol. *Endocrinology* 1932; 16:547-58.
52. Arnauld CD, Tenenhouse AM, Rasmussen H. Parathyroid hormone. *Annu Rev Physiol* 1967; 29:439-72.
53. Reeve J 1996 PTH: a future role in management of osteoporosis? *1996 J Bone Miner Res* 11:440-445.
54. Podbesek R, Edouard C, Meunier PJ, Parsons JA, Reeve J, Stevenson RW, Zanelli JM. Effects of two treatment regimes with synthetic human parathyroid hormone fragment on bone formation and the tissue balance of trabecular bone in greyhounds. *Endocrinology.* 1983 Mar;112(3):1000-6.
55. Potts JT 2005 Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol* 187:311-325.
56. Holzer G, Majesca RJ, Lundy MW, Hartke JR, Einhorn TA. Parathyroid hormone enhances fracture healing. A preliminary report. *Clin Orthop* 1999; 366: 258-63).
57. Silverberg SJ, Shane E, de la Cruz L et al. Skeletal disease in primary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res* 1989; 4:183-291.
58. Skripitz R, Andreassen TT, Aspenberg P. Strong effect of PTH (1-34) on regenerating bone. A time sequence study in rats. *Acta Orthop Scand* 2000;71(6):619-24.
59. Skripitz R. Parathyroid hormone for bone repair and implant fixation. Experiments in rats. Thesis. Lund, Sweden; 2001.
60. Andreassen TT, Fledelius C, Ejersted C and Oxlund H. Increases in callus formation and mechanical strength of healing fractures in old rats treated with parathyroid hormone. *Acta Orthop Scand* 2001;72(3):304-7.

61. Andreassen TT, Ejersted C, Oxlund H. Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. *J Bone Miner Res* 1999;14(6):960-8.
62. Ejersted C, Oxlund H, Andreassen TT. Bisphosphonate maintains parathyroid hormone (1-34)-induced cortical bone mass and mechanical strength in old rats. *Calcif. Tissue Int* 1997;4(62):316-22.
63. Hirano T, Burr DB, Turner CH, Sato M, Clain RL, et al. Anabolic effects of human biosynthetic parathyroid hormone fragment (1-34), LY 33334, on remodelling and mechanical properties of cortical bone in rabbits. *J Bone Miner Res* 1999;14(4):536-45.
64. Oxlund H, Dalastra M, Ejersted C, Andreassen TT. Parathyroid hormone induces formation of new cancellous bone with substantial mechanical strength at a site where it had disappeared in old rats. *Europ J Endocr* 2002;146:431-8.
65. Iida-Klein A, Zhou H, Lu SS, Levine LR, Ducayen-Knowles M, Dempster DW, et al. Anabolic action of parathyroid hormone is skeletal site specific at the tissue and cellular levels in mice. *J Bone Miner Res* 2002;17(5):808-16.
66. Okazaki K, Jingushi S, Ikenoue T, Urabe K, Hiroaki S, Iwamoto Y. Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing. *J Orthop Res* 2003;21(3):511-20.
67. Watson PH, Fraher LJ, Kisiel M, DeSousa D, Hendy G, Hodsman AB. Enhanced osteoblast development after continuous infusion of hPTH (1-84) in the rat. *Bone* 1999; 24(2):89-94.
68. Watson P, Lazowski D, Han V, Fraher L, Steer B, Hodsman A. Parathyroid hormone restores bone mass and enhances osteoblast insulin-like growth factor I gene expression in ovariectomized rats. *Bone* 1995;16(3):357-65.
69. Rubin RM, Cosman F, Lindsay R, Bilezikian JP. The anabolic effects of parathyroid hormone (review article). *Osteoporos Int* 2002;13:267-77.
70. Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Shen V. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone* 1995;16(1):157-61.
71. Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, Zhou H, Nieves J, et al. Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis in paired biopsy study (abstr.). *J Bone Miner Res* 2001;16(10): 1846-53.
72. Dempster DW, Cosman E, Parisien M, Shen V, Lindsay R. Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocrine Rev* 1993;14(6):690-709.

73. Hock JM, Gera I. Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res* 1992;7(1):65-72.
74. Watson PH, Fraher LJ, Natale BV, Kisiel M, Hendy GN, Hodsmann AB. Nuclear localization of the type I parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in MC3T3-E1 cells: association with serum-induced cell proliferation. *Bone* 2000;26(3):221-5
75. Qin L, Qiu P, Wang L, Li X, Swarthout JT, Soteropoulos P, Tolias P, Partridge NC. Gene expression profiles and transcription factors involved in parathyroid hormone signaling in osteoblasts revealed by microarray and bioinformatics. *J Biol Chem* 2003;278(22):19723-31.
76. Hock JM. Basic Aspects of PTH in skeletal Health. En: *Contemporary Endocrinology. Osteoporosis Pathophysiology and Clinical Management*, Orwoll ES, Bliziotes M, Editors, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2003 pags. 475-492.
77. Rubin MR, Bilezikian JP. The anabolic effects of parathyroid hormone therapy. *Clinics in Geriatric Medicine*, Volumen 2003; 19/2, pag 415-433.
78. Hock JM, Onyia JE, Miller B, Hulman J, Herring J, Chandrasekhar S, Harvey AK, Guinness M. Anabolic PTH targets proliferating cells of the primary spongiosa in young rats, and increases the number differentiating into osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1994; 9: S412.
79. Langub MC; Monier-Faugere MC, Qi Q et al. Parathyroid hormone /parathyroid hormone related peptide type 1 receptor in human bone. *J Bone Miner Res* 2001; 16:448-456.
80. Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 1995; 136:36342-3638.
81. Komori T, Yagi H, Nomura S et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblast. *Cell* 1997;89:755-760.
82. Lee MS; Lowe G, Flanagan S et al. Human Dermo 1 has attributes similar to twist in early bone development. *Bone* 2000; 27:591-602.
83. Chung U, Schipani E, McMahon AP et al. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest* 2001; 107:295-304.
84. Goltzman D. Interaction of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules. *J Bone Miner Res* 1999:14173-177.

85. McCauley LK, Koh AJ, Beecher CA, Rosol RJ. Proto oncogene c fos is transcriptionally regulated by PTH and PTH rp in a cyclic adenosine monophosphate dependent manner in osteoblastic cells. *Endocrinology* 1997;138:5427-5433.
86. Schinke T, Karsenty G. Transcriptional control of osteoblast differentiation and function. En: *Principles of bone biology*, 2nd edition, Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA editors, Academic Press, San Diego, 2002 pags.83-91.
87. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Robertson P, Parfitt AM; Manolagas SC . Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with PTH. *J Clin Invest* 1999;104:439-446.
88. Qin L, Raggatt LJ, Partridge NC. Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2004 Mar;15(2):60-5.
89. Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TM. Insulin like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest* 1989;83:60-65.
90. Takai H, Kanematsu M, Yano K et al. Transforming growth factor beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stroma cells. *J Biol Chem* 1998; 273:27091-27096.
91. Wu Y, Kumar R. Parathyroid hormone regulates TGFB1 and B2 synthesis in osteoblasts via divergent signaling pathways. *J Bone Miner Res* 2000;15:879-884.
92. Kanzawa M., Sugimoto T, kanatani M, Chihara K. Involvement of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor in the stimulation of osteoclast formation by parathyroid hormone in mouse bone cells. *Eur J Endocrinol* 2000; 142:661-4.
93. Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ Derynck R Osteoblastic responses to TGF beta during bone remodeling. *Mol Biol Cell* 1998;9:1903-1918.
94. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 1999; 140:3552-3561..
95. Dobnig H, Turner RT. The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology* 1997;138:4607-12.
96. Calvi LM, Sims NA, Hunzelman JL et al. Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone. *J Clin Invest* 2001;107:277-286.

97. Bettoun JD, Minagawa M, Hendy GN, Alpert LC, Goodyer C, Goltzman G, White JH. Cloning and characterization of the promoter regions of the human parathyroid hormone (PTH/PTH related peptide) receptor gene: Analysis of deoxyribonucleic acid from normal subjects and patients with pseudohypoparathyroidism type IB. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1031-1040.
98. Hoare SR, Gardella TJ, Usdin TB. Evaluating the signal transduction mechanism of the parathyroid hormone 1 receptor: Effect of receptor G protein interaction on the ligand binding mechanism and receptor conformation. *J Biol Chem* 2001; 276:7741-7753
99. Hoare SR, Usdin TB. Molecular mechanism of ligand recognition by parathyroid hormone 1 (PTH1) and PTH2 receptors. *Curr Pharm Design* 2001;7:689-713.
100. Li X, Qing L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack DV, Partridge NC. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J Biol Chem* 2007; 282: 33098-33106.
101. Locklin RM, Khosla S, Turner RT, Riggs BL 2003 Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem* 2003; 89:180–190.
102. Onyia JE, Miles RR, Yang X, Halladay DL, Hale J, Glasebrook A, McClure D, Seno G, Churgay L, Chandrasekhar S, Martin TJ In vivo demonstration that human parathyroid hormone 1–38 inhibits the expression of osteoprotegerin in bone with the kinetics of an immediate early gene. *J Bone Miner Res* 2000; 15:863–871.
103. Li X, Liu H, Qin L, Tamasi J, Bergenstock M, Shapses S, et al. Determination of dual effects of parathyroid hormone on skeletal gene expression in vivo by microarray and network analysis. *J Biol Chem* 2007; 282: 33086-33097.
104. Buxton EC, Yao W, Lane NE. Changes in serum receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, osteoprotegerin, and interleukin-6 levels in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with human parathyroid hormone (1-34). *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3332-6.
105. Hesp R, Hulme P, Williams D, Reeve J. The relationship between changes in femoral bone density and calcium balance in patients with involutional osteoporosis greater with human parathyroid hormone fragment (hPTH1-34) *Metab Bone Dis Rel Res* 1981;2:331-334.
106. Mosekilde L, Danielsen C, Soogaard C, McOsker J, Wroński T. The anabolic effects of parathyroid hormone on cortical bone mass, dimensions and strength—assessed in a sexually mature, ovariectomized rat model. *Bone* 1995;16:223-230.

107. Frolik CA, Black EC, Cain RL, Satterwhite JH, Brown PL, Sato M, Hock JM. Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure. *Bone* 2003; 33:372-379.
108. Bergenstock MK, Partridge NC. Parathyroid hormone stimulation of noncanonical Wnt signaling in bone. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1116; 354-9.
109. Greenspan SL, Bone HG, Ettinger MP, Hanley DA, Lindsay R, Zanchetta JR, Blosch CM, Mathisen AL, Morris SA, Marriott TB (2007) Effect of recombinant human parathyroid hormone (1–84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 146:326–339.
110. Han Y, Cowin SC, Schaffler MB, Weinbaum S. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:16689-94.
111. Seeman E, Delmas PD. Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 2006;354:2250-61.
112. Lindsay R, Cosman F, Zhou H, Bostrom MP, Shen VW, Cruz JD, et al. A novel tetracycline labeling schedule for longitudinal evaluation of the short-term effects of anabolic therapy with a single iliac crest biopsy: early actions of teriparatide. *J Bone Miner Res* 2006;21:366–73.
113. Hodsmann AB, Steer B. Early histomorphometric changes in response to parathyroid hormone in osteoporosis: evidence for de novo bone formation on quiescent surfaces. *Bone* 1993;14:523–7.
114. Vedi S, Webb A, Tighe JR, Compston JE. Measurement of total resorption surface in human iliac crest biopsies. *Metab Bone Dis Relat Res* 1984;5: 275–80.
115. Takahashi H, Hattner R, Epker BN, Frost HM. Evidence that bone resorption precedes formation at the cellular level. *Henry Ford Hosp Med Bull* 1964;12:359–64.
116. Erben RG. Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling? *Anat Rec* 1996;246:39–46.
117. Ma YL, Zeng Q, Donley DW, Ste-Marie L-G, Gallagher JC, Dalsky G, et al. Teriparatide increases bone formation in modeling and remodeling osteons and enhances IGF-II immunoreactivity in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2006;21:855–64.
118. Hodsmann AB, Kisiel M, Adachi JD, Fraher LJ, Watson PH. Histomorphometric evidence for increased bone turnover without change in cortical thickness or porosity after 2 years of cyclical hPTH(1-34) therapy in women with severe osteoporosis. *Bone* 2000;27:311–8.
119. Dempster DW, Zhou H, Cosman F, Nieves J, Adachi JD, Fraher LJ, et al. PTH treatment directly stimulates bone formation in cancellous and cortical bone in humans. *J Bone Miner Res* 2001;16:S179.



120. Gasser JA, Ingold P, Rebmann A, Susa M. The blunting of the bone anabolic response to PTH observed after frequently dosed bisphosphonates in rats may be explained by inhibition of farnesyl diphosphate synthase in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2005;20(Suppl 1):S78–9.
121. Arlot M, Meunier PJ, Boivin G, Haddock L, Tamayo J, Correa-Rotter R, et al. Differential effects of teriparatide and alendronate on bone remodelling in postmenopausal women assessed by histomorphometric parameters. *J Bone Miner Res* 2005;20:1244–53.
122. Dobnig H, Sipos A, Jiang Y, Fahrleitner-Pammer A, Ste-Marie L-G, Gallagher JC, et al. Early changes in biochemical markers of bone formation correlate with improvements in bone structure during teriparatide therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3970–7.
123. Chavassieux PM, Arlot ME, Reda C, Wei L, Yates AJ, Meunier PJ. Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodelling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest* 1997;100:1475–80.
124. Borah B, Dufresne TE, Chmielewski PA, Johnson TD, Chines A, Manhart MD. Risedronate preserves bone architecture in postmenopausal women with osteoporosis as measured by three-dimensional microcomputed tomography. *Bone* 2004;34:736–46.
125. Jiang Y, Zhao JJ, Mitlak BH, Wang O, Genant HK, Eriksen EF. Recombinant human parathyroid hormone (1-34) [teriparatide] improves both cortical and cancellous bone structure. *J Bone Miner Res* 2003;18: 1932–41.
126. Reeve J, Meunier PJ, Parsons JA, Bernat M, Bijvoet OLM, Courpron P, et al. Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. *Brit Med J* 1980; 280:1340–4.
127. Bradbeer JN, Arlot ME, Meunier PJ, Reeve J. Treatment of osteoporosis with parathyroid peptide (h-PTH 1-34) and oestrogen: increase in volumetric density of iliac cancellous bone may depend on trabecular spacing as well as increased thickness of packets of newly formed bone. *Clin Endocrinol* 1992;37:282–9.
128. Wright CDP, Vedi S, Garrahan NJ, Stanton M, Duffy SW, Compston JE. Combined inter-observer and inter-method variation in bone histomorphometry. *Bone* 1992;13:205–8.
129. Orwoll ES, Scheele WH, Paul S, Adami S, Syversen U, Diez-Perez A, et al. The effect of teriparatide [human parathyroid hormone (1-34)] therapy on bone density in men with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2003;18:9–17.
130. Zanchetta JR, Bogado CE, Ferretti JL, Wang O, Wilson MG, Sato M, et al. Effects of teriparatide [recombinant human parathyroid hormone (1-34)] on cortical bone in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2003;18:539–43.
131. Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, Lang TF, et al. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in

- combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2003;349: 1207–15.
132. Mashiba T, Burr DB, Turner CH, Sato M, Cain RL, Hock JM. Effects of human parathyroid hormone (1-34), LY333334, on bone mass, remodeling, and mechanical properties of cortical bone during the first remodeling cycle in rabbits. *Bone* 2001;28:538–47.
  133. Burr DB, Hirano T, Turner CH, Hotchkiss C, Brommage R, Hock JM. Intermittently administered human parathyroid hormone (1-34) treatment increases intracortical bone turnover and porosity without reducing bone strength in the humerus of ovariectomised cynomolgus monkeys. *J Bone Miner Res* 2001;16:157–65.
  134. Finkelstein JS, Hayes A, Hunzelman JL, Wyland JJ, Lee H, Neer RM. The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. *N Engl J Med* 2003;349:1216–26.
  135. Uusi-Rasi K, Sievanen H, Vuori I, Pasanen M, Heinonen A, Oja P. Associations of physical activity and calcium intake with bone mass and size in healthy women at different ages. *J Bone Miner Res* 1998;13: 133–42.
  136. Beck TJ, Looker AC, Ruff CB, Sievanen H, Wahner HW. Structural trends in the aging femoral neck and proximal shaft: analysis of the third national health and nutrition examination survey dual energy X-ray absorptiometry data. *J Bone Miner Res* 2000;15:2297–304.
  137. Kim CH, Takai E, Zhou H, von Stechow D, Muller R, Dempster DW, et al. Trabecular bone response to mechanical and parathyroid hormone stimulation: the role of mechanical microenvironment. *J Bone Miner Res* 2003;18:2116–25.
  138. Roschger P, Rinnerthaler SJY, Rodan GA, Fratzi P, Klaushofer K. Alendronate increases degree and uniformity of mineralisation in cancellous bone and decreases the porosity in cortical bone of osteoporotic women. *Bone* 2001;29:185–91.
  139. Finkelstein JS, Leder BZ, Burnett SM, Wyland JJ, Lee H, de la Paz AV, Gibson K, Neer RM. 2006 Effects of teriparatide, alendronate, or both on bone turnover in osteoporotic men. *J Clin Endocrinol Metab*; 91:2882-2887.
  140. Lindsay R, Zhou H, Cosman F, Nieves J, Dempster DW, Hodsmann AB. 2007 Effects of a once-month treatment with PTH(1-34) on bone formation on cancellous, endocortical, and periosteal surfaces of the human ilium. *J Bone Miner Res*; 22:495–502.
  141. Misof BM, Roschger P, Cosman F, Kurland ES, Tesch W, Messmer P, Dempster DW, Nieves J, Shane E, Fratzi P, Klaushofer K, Bilezikian J, Lindsay R. 2003 Effects of intermittent parathyroid hormone administration on bone mineralization density in iliac crest biopsies from patients with osteoporosis: a paired study before and after treatment. *J Clin Endocrinol Metab*; 88:1150–1156.

142. Paschalis EP, Glass EV, Donley DW, Eriksen EF. Bone mineral and collagen quality in iliac crest biopsies of patients given teriparatide: new results from the fracture prevention trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:4644–9.
143. Dempster DW. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1989;4:137–47.
144. Salusky IB, Goodman WG. Adynamic renal osteodystrophy: is there a problem? *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1978–85.
145. Delmas PD, Licata AA, Reginster JY, Crans GG, Chen P, Misurski DA, et al. Fracture risk reduction during treatment with teriparatide is independent of pretreatment bone turnover. *Bone* 2006;39:237–43.
146. Uihlein A V, Leder B Z. Anabolic Therapies for Osteoporosis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of NA.* (2012)., 41(3), 507–525.
147. Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley DA, Harris ST, Kendler DL, McClung MR, Miller PD, Olszynski WP, Orwoll E, Yuen CK 2005 Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: A review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev* 26:688–703.
148. National Institute for Health and Clinical Excellence 2005 Bisphosphonates (alendronate, etidronate, risedronate), selective oestrogen receptor modulators (raloxifene) and parathyroid hormone (teriparatide) for the secondary prevention of osteoporotic fragility fractures in postmenopausal women. NICE Technology Appraisal 87, January 2005. Available online at <http://www.nice.org.uk/TA087guidance>.
149. Lems WF, Hamdy NAT, Netelenbos JC 2006 Teriparatide: An anabolic drug for the treatment of patients with osteoporosis. *Ned Tijdschr Geneeskd* 150:132–137.
150. Cranney A, Papaioannou A, Zytaruk N, Hanley D, Adachi J, Goltzman D, Murray T, Hodsman A, for the Clinical Guidelines Committee of Osteoporosis Canada. 2006 Parathyroid hormone for the treatment of osteoporosis: a systematic review. *CMAJ* 175:52-59.
151. González Macías J, Guañabens Gay N, Gómez Alonso C, del Río Barquero L, Muñoz Torres M, Delgado M, et al. Guías de práctica clínica en la osteoporosis posmenopáusica, glucocorticoidea y del varón. Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral. *Rev Clin Esp.* 2008; 208 Supl 1: 1-24.
152. Díez-Pérez A., González-Macías J, Marín F, Abizanda M, Alvarez R, Gimeno A, Pegenaute E, Vila J for the ECOSAP study investigators 2007 Prediction of absolute risk of non-spinal fractures using clinical risk factors and heel quantitative ultrasound. *Osteoporos Int* 18:629-639.

153. Díez-Pérez A, González-Macías J. 2008 Inadequate responders to osteoporosis treatment: proposal for an operational definition. *Osteoporos Int*; [Epub ahead of print]. doi: 10.1007/s00198-008-0659-2.
154. Deal C. 2004 The use of intermittent human parathyroid hormone as a treatment for osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep* 6:49-58.
155. Saag KG, Shane E, Boonen S, Marin F, Donley DW, Taylor KA, Dalsky GP, Marcus R. 2007 Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* 357:2028-2039.
156. Sambrook PN. 2007 Anabolic therapy in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* 357:2084-2086.
157. FORSTEO [teriparatide (rDNA origin) injection]. Eli Lilly and Company. Product Label. 2006. <http://www.emea.eu.int/humandocs/Humans/EPAR/forsteo/forsteo.htm>
158. Miller PD, Bilezikian JP, Diaz-Curiel M, Chen P, Marin F, Krege JH, Wong M, Marcus R. 2007 Occurrence of hypercalciuria in patients with osteoporosis treated with teriparatide. *J Clin Endocrinol Metab*; 92:3535-3541.
159. Dawson-Hughes B, Chen P, Krege J. 2007 Response to teriparatide in patients with baseline 25-hydroxyvitamin D insufficiency or sufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*; 92: 4630–4636.
160. Silverberg SJ, Bilezikian JP. 2003 “Incipient” primary hyperparathyroidism: a “forme fruste” of an old disease. *J Clin Endocrinol Metab*; 88:5348-5352.
161. Eastell R, Krege JH, Chen P, Glass EV, Reginster J-Y. 2006 Development of an algorithm for using PINP to monitor treatment of patients with teriparatide. *Curr Med Res Opin*; 22:61-6.
162. Chen P, Satterwhite JH, Licata AA, Lewiecki EM, Sipos AA, Misurski DM, Wagman RB. 2005 Early changes in biochemical markers of bone formation predict BMD response to teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 20:962-970.
163. Boonen S, Marin F, Obermayer-Pietsch B, Simões ME, Barker C, Glass EV, Lyritis G, Oertel H, Nickelsen T, McCloskey EV for the Eurofors Investigators. 2008 Effects of prior antiresorptive therapy on the bone mineral density response to two years of teriparatide treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*; 93:852-860.
164. Preotact [rhPTH (1-84) (rDNA origin) injection]. Nycomed. Product Label. 2007. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/preotact/H-659-PI-en.pdf>.
165. Rajzbaum G, Jakob F, Karras D, Ljunggren Ö, Lems WF, Langdahl BL, Fahrleitner A, Walsh JB, Gibson A, Tynan AJ, Marin F 2008. Characterization of patients in the European Forsteo Observational Study (EFOS). *Curr Med Res Opin*; 24:377-384.

166. Briot K, Ravaud P, Dargent-Molina P, Zylberman M, Liu-Leage S, C. Roux C. 2008. Persistence with teriparatide in postmenopausal osteoporosis; impact of a patient education and follow-up program: the French experience. *Osteoporos Int*; [Epub ahead of print]. doi: 10.1007/s00198-008-0698-8.
167. Larrainzar R, Aragón A, Oteo A, Rentero M, López A, Casillas M. 2008 Persistence with teriparatide during a patient educational program in postmenopausal women treated with teriparatide. *Osteoporos Int* 19(Suppl 1):S43.
168. Obermayer-Pietsch BM, Marin F, McCloskey EV, Hadji P, Farrerons J, Boonen S, Audran M, Barker C, Anastasilakis AD, Fraser WD, Nickelsen T for the EUROFORs Investigators. 2008 Effects of two years of daily teriparatide treatment on bone mineral density in postmenopausal women with severe osteoporosis with and without prior antiresorptive treatment. *J Bone Miner Res*; 23:1591–1600.
169. Cosman F, Nieves JW, Zion M, Barbuto N, Lindsay R 2008. Effect of prior and ongoing raloxifene therapy on response to PTH and maintenance of BMD after PTH therapy. *Osteoporos Int*; 19:529-535.
170. Ettinger B, San Martin JA, Crans G, Pavo I. 2004 Differential effects of teriparatide on BMD after treatment with raloxifene or alendronate. *J Bone Miner Res* 19:745-751.
171. Parfitt AM. 2002 Parathyroid hormone and periosteal bone expansion. *J Bone Miner Res*; 17:1741–1743.
172. Sato M, Westmore M, Ma YL, Schmidt A, Zeng QQ, Glass EV, Vahle J, Brommage R, Jerome CP, Turner CH. 2004 Teriparatide [PTH(1-34)] strengthens the proximal femur of ovariectomized nonhuman primates despite increasing porosity. *J Bone Miner Res*; 19:623–629.
173. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15: 175-91.
174. Kubo T, Shiga T, Hashimoto J et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 68: 197-202.
175. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fractures treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2005; 16(2 Suppl.): S129- 38.
176. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao LJ, Maastricht S, Swain M, Mason RS, Murrell GA, Diwan AD, Diamond T. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 2001; 28:80-6.
177. Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop* 1997; 342: 218-27.

178. Makhni EC, Ewald TJ, Kelly S, Day CS. Effect of patient age on the radiographic outcomes of distal radius fractures subject to nonoperative treatment. *J Hand Surg* 2008; 33A: 1301-8.
179. Nikolaou VS, Efstathopoulos N, Kontakis G, Kanakaris NK, Giannoudis PV. The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time. *Injury* 2009; 40: 663-8.
180. Stromsoe K. Fracture fixation problems in osteoporosis. *Injury* 2004; 35: 107-13.
181. Barrios C, Brostrom LA, Strak A, Walheim G. Healing complications after internal fixation of trochanteric hip fractures: the prognostic value of osteoporosis. *J Orthop Trauma* 1993; 7: 438-42.
182. Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L. Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int* 2005; 16:S36-43.
183. Rodriguez JPGS, Gajardo H, Pino AM, Seitz G. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cell dynamics. *J Cell Biochem* 1999; 414-23.
184. Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, Nino AJ, See K, Krohn K, García-Hernández PA, Recknor CP, Einhorn TA, Dalsky GP, Mitlak BH, Fierlinger A, Lakshmanan MC. Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. *J Bone Miner Res.* 2010 Feb;25(2):404-14.
185. Peichl P, Holzer LA, Maier R, Holzer G. Parathyroid hormone 1-84 accelerates fracture-healing in pubic bones of elderly osteoporotic women. *J Bone Joint Surg Am.* 2011 Sep 7;93(17):1583-7.
186. Chesser T, Fox R, Harding K, et al. The administration of intermittent parathyroid hormone affects functional recovery from pertrochanteric fractured neck of femur: a protocol for a prospective mixed method pilot study with randomisation of treatment allocation and blinded assessment (FRACTT). *BMJ Open* 2014;4:e004389. doi:10.1136/bmjopen-2013-004389
187. Andreassen TT, Willick GE, Morley P, Whitfield JF. Treatment with parathyroid hormone hPTH(1-34), hPTH(1-31), and monocyclic hPTH(1-31) enhances fracture strength and callus amount after withdrawal fracture strength and callus mechanical quality continue to increase. *Calcif Tissue Int.* 2004 Apr;74(4):351-6.
188. Alkhiary YM, Gerstenfeld LC, Krall E, Westmore M, Sato M, Mitlak BH, Einhorn TA. Enhancement of experimental fracture-healing by systemic administration of recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34). *J Bone Joint Surg Am.* 2005 Apr;87(4):731-41.
189. Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, et al. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res.* 2002;17:2038–2047.

190. Komatsubara S, Mori S, Mashiba T, Nonaka K, Seki A, Akiyama T, Miyamoto K, Cao Y, Manabe T, Norimatsu H. Human parathyroid hormone (1-34) accelerates the fracture healing process of woven to lamellar bone replacement and new cortical shell formation in rat femora. *Bone*. 2005 Apr;36(4):678-87.
191. Nakazawa T, Nakajima A, Shiomi K, Moriya H, Einhorn TA, Yamazaki M. Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone(1-34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing. *Bone*. 2005;37:711–719.
192. Kakar S, Einhorn TA, Vora S, Miara LJ, Hon G, Wigner NA, Toben D, Jacobsen KA, Al-Sebaei MO, Song M, Trackman PC, Morgan EF, Gerstenfeld LC, Barnes GL. Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures. *J Bone Miner Res*. 2007 Dec;22(12):1903-12.
193. Gardner MJ, van der Meulen MC, Carson J, et al. Role of parathyroid hormone in the mechanosensitivity of fracture healing. *J Orthop Res*. 2007;25:1474–1480.
194. Manabe T, Mori S, Mashiba T, Kaji Y, Iwata K, Komatsubara S, Seki A, Sun YX, Yamamoto T. Human parathyroid hormone (1-34) accelerates natural fracture healing process in the femoral osteotomy model of cynomolgus monkeys. *Bone*. 2007 Jun;40(6):1475-82.
195. Tsiridis E, Morgan EF, Bancroft JM, Song M, Kain M, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Boussein ML, Tornetta P 3rd. Effects of OP-1 and PTH in a new experimental model for the study of metaphyseal bone healing. *J Orthop Res*. 2007 Sep;25(9):1193-203.
196. Kim HF. Effects of intermittent administration of parathyroid hormone on fracture healing in ovariectomized rats. *Iowa Orthop J* 1999; 19:71-7
197. Bostrom MPG, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Hill E, Avnur Z, Waters RV. Parathyroid Hormone-related Protein Analog RS-66271 is an effective therapy for impaired bone healing in rabbits on corticosteroid therapy. *Bone* 2000; 26: 437-42.
198. Nozaka K, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Maekawa S, Noguchi H, Shimada Y. Intermittent administration of human parathyroid hormone enhances bone formation and union at the site of cancellous bone osteotomy in normal and ovariectomized rats. *Bone*. 2008 Jan;42(1):90-7.
199. Komatsu DE, Brune KA, Liu H, Schmidt AL, Han B, Zeng QQ, Yang X, Nunes JS, Lu Y, Geiser AG, Ma YL, Wolos JA, Westmore MS, Sato M. Longitudinal in vivo analysis of the region-specific efficacy of parathyroid hormone in a rat cortical defect model. *Endocrinology*. 2009 Apr;150(4):1570-9.
200. Aleksyniene R, Thomsen JS, Eckardt H, Bundgaard KG, Lind M, Hvid I. Parathyroid hormone PTH(1-34) increases the volume, mineral content, and mechanical properties of regenerated mineralizing tissue after distraction osteogenesis in rabbits. *Acta Orthop*. 2009 Dec;80(6):716-23.

201. Seebach C, Skzipitz R, Andreassen TT, Aspenberg P. Intermittent parathyroid hormone (1-34) entrances mechanical strength and density of new bone after distraction osteogenesis in rats. *Journal of Orthopaedic Research* 2004; 22: 472-8.
202. Abe Y, Takahata M, Ito M, Irie K, Abumi K, Minami A. Enhancement of graft bone healing by intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) in a rat spinal arthrodesis model. *Bone*. 2007 Nov;41(5):775-85.
203. Hashimoto T, Shigetomi M, Ohno T, Matsunaga T, Muramatsu K, Tanaka H, Sugiyama T, Taguchi T. Sequential treatment with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34) and bisphosphonate enhances large-size skeletal reconstruction by vascularized bone transplantation. *Calcif Tissue Int*. 2007 Sep;81(3):232-9.
204. Skripitz R, Andreassen TT, Aspenberg P. Strong effect of PTH (1-34) on regenerating bone. A time sequence study in rats. *Acta Orthop Scand* 2000;71(6):619-24.
205. Skripitz R, Aspenberg P. Implant fixation enhanced by intermittent treatment with parathyroid hormone. *J Bone Joint Surg Br*. 2001 Apr;83(3):437-40.
206. Skripitz R, Böhling S, Rüter W, Aspenberg P. Stimulation of implant fixation by parathyroid hormone (1-34)-A histomorphometric comparison of PMMA cement and stainless steel. *J Orthop Res*. 2005 Nov;23(6):1266-70. Epub 2005 Jun 16.
207. Gabet Y, Müller R, Levy J, Dimarchi R, Chorev M, Bab I, Kohavi D. Parathyroid hormone 1-34 enhances titanium implant anchorage in low-density trabecular bone: a correlative micro-computed tomographic and biomechanical analysis. *Bone*. 2006 Aug;39(2):276-82.
208. Herrera A, Martínez AA, Ferrandez L, Gil E, Moreno A. Epidemiology of osteoporotic hip Fractures in Spain. *Int Orthop* 2006; 30: 11-4.
209. Chehade MJ, Pohl AP, Percy MJ, Nawana N. Clinical implication of stiffness and strenght changes in fracture healing. *J Bone Joint Sug* 1997: 79-B: 9-12.
210. Goodship AE, Kenwright J. The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 1985; 67-B(4): 650-5.
211. Goodship AE, Watkins PE, Rigby HS, Kenwright J. The role of fixator frame stiffness in the control of fracture healing. An experimental study. *J Biomech* 1993; 26(9): 1027-35.
212. Goodship AE, Walker PC, McNally D, Chambers T, Green JR. Use of a bisphosphonate (pamidronate) to modulate fracture in ovine bone. *Ann Oncol* 1994; 5(Suppl 7): S53-5.
213. Goodship AE, Lawes TJ, Rubin CT. Low-magnitude high-frequency mechanical signals accelerate and augment endochondral bone repair: preliminary evidence of efficacy. *J Orthop Res* 2009; 27(7): 922-30.



214. Hantes ME, Mavrodontidis AN, Zalavras CG, Karantanas AH, Karachalios T, Malizos KN. Low-intensity transosseous ultrasound accelerates osteotomy healing in a sheep fracture model. *J Bone Joint Surg Am* 2004 ; 86-A : 2275-82.
215. Kenwright J, Goodship AE. Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. *Clin Orthop Relat Res* 1989; 241: 36-47.
216. Lawes TJ, Scott JC, Goodship AE. Increased insertion torque delays pin-bone interface loosening in external fixation with tapered bone screws. *J Orthop Trauma* 2004; 18(9): 617-22.
217. Schell H, Lienau J, Epari DR, Seebeck P, Exner C, Muchow S, Bragulla H, Haas NP, Duda GN. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone* 2006; 38: 547-54.
218. Wallace AL, Draper ERC, Strachan RK, MaCarthy ID, Hughes SPF. The effect of devascularisation upon early bone healing in dynamic external fixation. *J Bone Joint Surg Br* 1991; 73-B(5): 819-25.
219. Currey JD. The effects of drying and re-wetting on some mechanical properties of cortical bone. *J Biomech* 1988; 21(5): 439-41.
220. Linde F, Sorenesen HC. The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *J Biomech* 1993; 26(10): 1249-52.
221. Adili A, Bhandari M, Schemitsch EH. The biomechanical effect of high pressure irrigation on diaphyseal fracture healing in vivo. *J Orthop Trauma* 2002; 16(6): 413-7.
222. Blokhuis TJ, den Boer FC, Bramer JAM, Jenner JMG, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ. Biomechanical and histological aspects of fracture healing, stimulated with osteogenic protein-1. *Biomaterials* 2001; 22(7): 725-30.
223. Den Boer FC, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Van Lingen A, Vink GQ, Boshuizen K, Haarman HJ. New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy X-ray absorptiometry. *J Orthop Res*; 1999; 17(5): 654-60.
224. Jazrawi LM, Bai B, Simon JA, Kummer FJ, Birdzell LT, Koval KJ. A biomechanical comparison of Schuhl nuts or cement augmented screws for plating of humeral fractures. *Clin Orthop* 2000; 377: 235-40.
225. Miclau T, Remiger A, Tepic S, Lindsey R, McIlff T. A mechanical comparison of the dynamic compression plate, limited contact dynamic compression plate, and point contact fixator. *J Orthop Trauma* 1995; 9(1): 17-22.
226. Keller TS, Mao Z, Spengler DM. Young's modulus, bending strength and tissue physical properties of human compact bone. *J Orthop Res* 1990; 8(4): 592-603.
227. Timoshenko SP y Goudier JN. *Theory of Elasticity*. McGraw-Hill 1970; London.

228. Foux A, Black RC, Uthoff HK. Quantitative measures for fracture healing: an in vitro biomechanical study. *J Biomech Eng* 1990; 112(4): 401-6.
229. Lovejoy CO, Burstein AH, Heiple KG. The biomechanical analysis of bone strength: A method and its application to platycnemia. *Am J Phys Anthropol* 1976; 44: 489-505.
230. Ruff CB, Hayes WC. Cross sectional geometry of Pecos Pueblo femora and tibiae a biomechanical investigation: II. Sex, age, side differences. *Am J Phys Anthropol* 1983; 60(3): 462-3.
231. Foux A, Uthoff HK, Black RC. Healing of plated femoral osteotomies in dogs. A mechanical study using a new test method. *Acta Othop Scand* 1993; 64(3): 345-53.
232. Comín M. Caracterización biomecánica del proceso de reparación de fracturas: Desarrollo y validación de un modelo evolutivo del callo de fractura. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia 2000.
233. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, Wozney JM. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg* 2003; 85-A(8): 1425-35.
234. Fyda HM, Callahan JJ, Fulghum CS, Seaber AV, Myers BS. A model of cortical window healing in the rabbit. *Orthopaedics* 1995; 18(2): 177-84.
235. Hsu RW, Tai CL, Chen CY, Hsu WH, Hsueh S. Enhancing mechanical strength during early fracture healing via shockwave treatment: an animal study. *Clin Biomech* 2003; 18(6): S33-9.
236. Khan SA, Geus C, Holroyd B, Russell AS. Osteoporosis follow-up after wrist fractures following minor trauma. *Arch Inter Med* 2001; 161: 1309-12.
237. Luppen CA, Blake CA, Ammirati KM, Stevens ML, Seeherman HJ, Wozney JM, Bouxsein ML. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances osteotomy healing in glucocorticoid-treated rabbits. *J Bone Miner Res* 2002; 17(2): 301-10.
238. Markel MD, Wikenheiser MA, Chao EYS. A study of fractures callus material properties: Relationship to the torsional strength of bone. *J Orthop Res* 1990; 8(6): 843-50.
239. Park SH, O'Connor K, McKellop H, Sarmiento A. The influence of active shear or compressive motion of fracture healing. *J Bone Joint Surg* 1998; 80-A: 868-78.
240. Park SH, Silva M. Effect of intermittent pneumatic soft-tissue compression on fracture-healing in animal model. *J Bone Joint Surg* 2003; 85-A(8): 1446-53.
241. White AA, Panjabi MM, Southwick WO. The four biomechanical stages of fracture repair. *J Bone Joint Surg* 1977; 59A(2): 188-92.

242. Meffert RH, Inoue N, Tis JE, Brug E, Chao EY. Distraction osteogenesis after acute limb-shortening for segmental tibial defects. Comparison of a monofocal and a bifocal technique in rabbits. *J Orthop Res* 2000; 89-A(6): 799-808.
243. Bramer J, Barentsen R, Elst M, De Lange E, Patka P, Haarman. Representative assessment of long shaft biomechanical properties: an optimized testing method. *J Biomech* 1998; 31(8): 741-5.
244. Lewandrowski K, Schollmeier G, Ekkemkamp A, Uhthoff HK, Tomford WW. Incorporation of perforated and demineralized cortical bone allografts. Part II: A mechanical and histological evaluation. *Bio-Med Mater And Engineering* 2001; 11: 209- 19.
245. Burstein AH, Currey JD, Frankel VH, Reilly DT. The ultimate properties of bone tissue: the effects of yielding. *J Biomech* 1972; 5(1): 35-44.
246. Schreiber JJ, Anderson PA, Rosas HG, Buchholz AL, Au AG. Hounsfield Units for Assessing Bone Mineral Density and Strength: A Tool for Osteoporosis Management. *J Bone Joint Surg* 2011; 93-A(11):1057-63.
247. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, Rechenberg B, Hofmann-Antenbrinck, Schneider E, Müller-Terpitz R, Thiele F, Rippe KP, Grainger DW. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord* 2007; 8: 72-84.
248. Goldhahn J, Little D, Mitchell P, Fazzalari N, Reid IR, Aspenberg P, Marsh D. Evidence for anti-osteoporosis therapy in acute fracture situations. Recommendations of a multidisciplinary workshop of the International Society for Fracture Repair. *Bone* 2010; 46: 267-71.
249. O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90-A(Suppl 1): 79-84.
250. Lill CA, Hessel J, Schlegel U, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res* 2003; 21(5): 836-42.
251. Newton SI, Cooper RC, Gilbert JA, Johnson RB, Zardiackas LD. The ovariectomized sheep as a model for human bone loss. *J Comp Pathol*, 2004; 130(4): 323-6.
252. Rodgers JB, Monier-Faugere MC, Malluche H. Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone* 1993; 14(3): 369-77.
253. Turner AS, Alvis M, Myers W, Stevens ML, Lundy MW. Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes. *Bone* 1995; 17(4 Suppl): 395S-402S.
254. Hornby SB, Ford SL, Mase CA, Evans GP. Skeletal changes in the ovariectomised ewe and subsequent response to treatment with 17 beta oestradiol. *Bone* 1995; 17(4 Suppl): 389S-94S.

255. Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995; 16 (4 Suppl.): 277S-84S.
256. Thorndike EA and Turner AS. In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Front Biosci* 1998; 16(3): 17-26.
257. Turner AS. Animal models of osteoporosis. Necessity and limitations. *Eur cells mat* 2001; 1: 66-81.
258. Schell H, Epari DR, Kassi JP, Bragulla H, Bail HJ, Duda GN. The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability. *J Orthop Res* 2005; 23: 1022-8.
259. Meyer RA, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res* 2001; 19: 428-35.
260. Meyer RA, Desai BR, Heiner DE, Fiechtl, Porter S, Meyer MH. Young, adult and old rats have similar changes in mRNA expression of many skeletal genes after fracture despite delayed healing with age. *J Orthop Res* 2006; 24: 1933-44.
261. Melhus G, Solberg LB, Dimmen S, Madesen JE, Norddsetten, Reinholt FP. Experimental osteoporosis induced by ovariectomy and vitamin D deficiency does not markedly affect fracture healing in rats. *Acta Orthop* 2007; 3: 393-403.
262. Bottlang M, Lesser M, Koerber J, Doornink J, Rechenberg B, Augat P, Fitzpatrick DC, Madey SM, Marsh JL. Far cortical locking can improve healing of fractures stabilized with locking plates. *J Bone Joint Surg* 2010; 92-A: 1652-60.
263. Amanat N, McDonald M, Godfrey C, Bilston L, Little D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *J Bone Miner Res* 2007; 22(6): 867-76.
264. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanism of action. *Endocr Rev* 1998; 19: 80-100.
265. Den Boer FC, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Van Lingen A, Vink GQ, Boshuizen K, Haarman HJ. New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy X-ray absorptiometry. *J Orthop Res*; 1999; 17(5): 654-60.
266. Klein P, Schell H, Streitparth F, Heller M, Kassi JP, Kandziora F, Bragulla H, Haas NP, Duda GN. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res* 2003; 21(4): 662-9.

# ANEXOS

## 1.- INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales estudios sobre el efecto de la PTH en la consolidación de las fracturas .....	página 66
Tabla 2: Número de cortes considerados para cada una de las muestras del estudio.....	página 128
Tabla 3: Rangos de densidades consideradas en cada una de las isodensidades o “máscaras” utilizadas para el estudio densitométrico.....	página 129
Tabla 4: Recopilación de observaciones para cada una de las muestras tras la preparación y realización de los ensayos mecánicos y estudios densitométricos.....	página 134
Tabla 5: Valores de las superficies de corte de la tibias no operadas y del callo de fractura de las operadas tanto del grupo control como del grupo PTH expresado en mm <sup>2</sup> y medidos en los cortes axiales de TAC. También se expresa el aumento proporcional de la superficie del callo respecto a la de la tibia.....	página 143
Tabla 6: Descriptivos correspondientes a la variable área de hueso obtenida a partir de imágenes de TAC para los callos de los grupos control y PTH.....	página 144
Tabla 7: Test de ANOVA para la variable área de hueso obtenida a partir de imágenes de TAC para los callos de los grupos control y PTH.....	página 145
Tabla 8: Descriptivos correspondientes a la variable relación de áreas para los callos de los grupos control y PTH.....	página 146

Tabla 9: Descriptivos correspondientes a la variable área de hueso obtenida a partir de imágenes de TAC para los huesos no operados de los grupos control y PTH.....	página 147
Tabla 10: Tabla de valores del ensayo de flexión a cuatro puntos.....	página 151
Tabla 11: Tabla de descriptivos para las variables obtenidas mediante el ensayo de flexión a cuatro puntos.....	página 151
Tabla 12: ANOVA de un factor de los parámetros de flexión para la comparación entre los grupos control y PTH.....	página 153
Tabla 13: Valor de los parámetros del ensayo a torsión.....	página 154
Tabla 14: Tabla de descriptivos para las variables obtenidas mediante el ensayo de torsión para los huesos osteotomizados.....	página 155
Tabla 15: ANOVA de un factor de las variables de % de par torsor, tenacidad y rigidez para los huesos osteotomizados.....	página 157
Tabla 16: Tabla de descriptivos para las variables obtenidas mediante el ensayo de torsión para los huesos no operados.....	página 158
Tabla 17: ANOVA de un factor de las variables de % de par torsor, tenacidad y rigidez torsional para los huesos no operados.....	página 160
Tabla 18: Resultados obtenidos para las variables Volumen total del callo (Vtot31) y densidad media del callo (Dtot31).....	página 162
Tabla 19: Tabla de descriptivos para variables del estudio densitométrico del callo completo para los huesos osteotomizados.....	página 162
Tabla 20: Tabla resumen de los test ANOVA para la variable volumen del callo obtenida para los dos grupos de estudio.....	página 164
Tabla 21: Tabla resumen de los test ANOVA para la variable densidad media del callo obtenida para los dos grupos de estudio.....	página 165
Tabla 22: Tabla de descriptivos para la variable Volumen de hueso en la zona de osteotomía calculada para dos cortes. Comparación entre los huesos no operados del grupo control y de PTH.....	página 166

Tabla 23: Test de ANOVA correspondiente a la comparación entre los valores obtenidos para la variable Volumen de hueso calculada para dos cortes de los huesos no operados del grupo control y del grupo PTH.....	página 167
Tabla 24: Tabla de descriptivos para la variable Densidad media del hueso en la zona de osteotomía calculada para dos cortes. Comparación entre los huesos no operados del grupo control y de PTH.....	página 167
Tabla 25: Test de ANOVA correspondiente a la comparación entre los valores obtenidos para la variable Volumen de hueso calculada para dos cortes de los huesos sanos del grupo control y del grupo PTH.....	página 168
Tabla 26: Resumen de descriptivos para la variable % de volumen regenerado de la isodensidad 1 para los dos grupos de estudio.....	página 173
Tabla 27: Resumen de descriptivos para la variable % de volumen regenerado de la isodensidad 2 para los dos grupos de estudio.....	página 173
Tabla 28: Resumen de descriptivos para la variable % de volumen regenerado de la isodensidad 3 para los dos grupos de estudio.....	página 173
Tabla 29: Resumen de descriptivos para la variable % de volumen regenerado de la isodensidad 4 para los dos grupos de estudio.....	página 174
Tabla 30: Test de ANOVA para la variable % de volumen regenerado en la isodensidad 1 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.....	página 175
Tabla 31: Test de ANOVA para la variable % de volumen regenerado en la isodensidad 2 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.....	página 175
Tabla 32: Test de ANOVA para la variable % de volumen regenerado en la isodensidad 3 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.....	página 175

Tabla 33: Test de ANOVA para la variable % de volumen regenerado en la isodensidad 4 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.....	página 176
Tabla 34: Resumen de descriptivos para la variable densidad media de la isodensidad 1 para los dos grupos de estudio.....	página 180
Tabla 35: Resumen de descriptivos para la variable densidad media de la isodensidad 2 para los dos grupos de estudio.....	página 180
Tabla 36: Resumen de descriptivos para la variable densidad media de la isodensidad 3 para los dos grupos de estudio.....	página 180
Tabla 37: Resumen de descriptivos para la variable densidad media de la isodensidad 4 para los dos grupos de estudio.....	página 181
Tabla 38: Test de ANOVA para la variable densidad media de la isodensidad 1 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.....	página 181
Tabla 39: Test de ANOVA para la variable densidad media de la isodensidad 2 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.....	página 182
Tabla 40: Test de ANOVA para la variable densidad media de la isodensidad 3 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.....	página 182
Tabla 41: Test de ANOVA para la variable densidad media de la isodensidad 4 obtenido para la comparación de los grupos control y PTH.....	página 182
Tabla 42: Tabla en la que se recogen los estudios que han utilizado pruebas biomecánicas para la evaluación de resultados, especificando el tipo de ensayo y los resultados.....	página 198



## 2.- INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la Hormona Paratiroidea de cadena completa (PTH 1-84).....	página 17
Figura 2. Esquema de la tibia de la oveja (naranja) y la colocación del fijador externo (azul) con las referencias utilizadas.....	página 105
Figura 3. Fotografía del sistema de fijación externa utilizado para la estabilización de la osteotomía en la tibia de la pata de la oveja.....	página 109
Figura 4. Esquemas de los ensayos de flexión, a cuatro y tres puntos.....	página 111
Figura 5. Representación de los momentos flectores en los ensayos de flexión a tres y cuatro puntos.....	página 112
Figura 6. Esquema de la configuración del ensayo de flexión a cuatro puntos.....	página 116
Figura 7. Perfil polar de rigidez de un hueso osteotomizado y su contralateral sano.....	página 117
Figura 8. Figura esquemática de los puntos de apoyo en el ensayo de flexión a cuatro puntos y fotografía del ensayo.....	página 118
Figura 9. Gráfica típica de un ensayo de flexión en uno de los planos.....	página 119
Figura 10. Ensayo de torsión y fin del ensayo con rotura tibial.....	página 123
Figura 11. Grafica obtenida del ensayo a torsión.....	página 124
Figura 12. Gráfica de la curva par torsor-desplazamiento angular.....	página 125
Figura 13. Selección de la región de interés para la el estudio densitométrico de la totalidad del callo.....	página 127
Figura 14. Representación 3D de las isodensidades generadas para el estudio del callo en la zona de fractura.....	página 129

- Figura 15: Imágenes de las tibias del grupo control en cortes coronales. La línea horizontal corresponde al corte a partir del cual se ha reconstruido la proyección axial.....página 136-137
- Figura 16. Cortes axiales a nivel de la osteotomía de las tibias intervenidas y al mismo nivel en las tibias contralaterales del grupo control. Se ha medido la superficie de cada corte.....página 137-138
- Figura 17: Imágenes de las tibias del grupo tratado con PTH en cortes coronales. La línea horizontal corresponde al corte a partir del cual se ha reconstruido la proyección axial.....página 139-140
- Figura 18. Cortes axiales a nivel de la osteotomía de las tibias intervenidas y al mismo nivel en las tibias contralaterales del grupo tratado con PTH. Se ha medido la superficie de cada corte.....página 141-142
- Figura 19. Diagrama de cajas para la variable área de hueso obtenida a partir de imágenes de TAC para los callos de los grupos control y PTH.....página 144
- Figura 20. Diagrama de cajas correspondiente a la variable relación de áreas para los callos de los grupos control y PTH.....página 145
- Figura 21. Diagrama de cajas para la variable área de hueso obtenida a partir de imágenes de TAC para los huesos no operados de los grupos control y PTH.....página 147
- Figura 22. Elipses de perfil polar de rigidez de los huesos osteotomizados.....página 149
- Figura 23. Elipses de perfil polar de rigidez para los huesos contralaterales no operados.....página 150
- Figura 24. Gráfica de cajas y arbotantes de la variable índice de rigidez.....página 152
- Figura 25. Gráfica de cajas y arbotantes de la variable índice de áreas.....página 152

Figura 26. Gráfica de cajas y arbotantes de la variable índice de planitud.....	página 153
Figura 27. Diagrama de cajas de la variable % par torsor para los huesos osteotomizados.....	página 155
Figura 28. Diagrama de cajas de la variable % de tenacidad para los huesos osteotomizados.....	página 156
Figura 29. Diagrama de cajas de la variable % rigidez torsional para los huesos osteotomizados.....	página 156
Figura 30. Diagrama de cajas de la variable % par torsor para los huesos no operados.....	página 159
Figura 31. Diagrama de cajas de la variable % de tenacidad para los huesos no operados.....	página 159
Figura 32. Diagrama de cajas de la variable % rigidez torsional para los huesos no operados.....	página 159
Figura 33. Diagramas de cajas para la variable volumen total del callo entre el grupo control y grupo PTH de los huesos osteotomizados.....	página 163
Figura 34. Diagramas de cajas para la variable densidad media del callo entre el grupo control y el grupo PTH de los huesos osteotomizados.....	página 164
Figura 35. Diagramas de cajas para la variable volumen total del callo entre grupo control y grupo PTH de los huesos no operados.....	página 166
Figura 36. Diagramas de cajas para la variable densidad media del callo entre el grupo control y el grupo PTH de los huesos no operados.....	página 168
Figura 37. Diagrama de cajas agrupado para la variable % del volumen de la isodensidad frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura. En amarillo la isodensidad 1, en azul la isodensidad 2, en morado la isodensidad 3 y en naranja la isodensidad 4.....	página 170
Figura 38. Diagrama de cajas para la variable % del volumen de la Isodensidad 1 frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura.....	página 171

- Figura 39. Diagrama de cajas para la variable % del volumen de la Isodensidad 2 frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura.....página 171
- Figura 40. Diagrama de cajas para la variable % del volumen de la Isodensidad 3 frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura.....página 172
- Figura 41. Diagrama de cajas para la variable % del volumen de la Isodensidad 4 frente al total del hueso en la zona del espacio de fractura.....página 172
- Figura 42. Diagrama de cajas agrupado para la variable densidad media para cada isodensidad. En amarillo la isodensidad 1, en azul la isodensidad 2, en morado la isodensidad 3 y en naranja la isodensidad 4.....página 177
- Figura 43. Diagrama de cajas para la variable densidad media en la zona de fractura.....página 177
- Figura 44. Diagrama de cajas para la variable densidad media correspondiente a la isodensidad 1.....página 178
- Figura 45. Diagrama de cajas para la variable densidad media correspondiente a la isodensidad 2.....página 178
- Figura 46. Diagrama de cajas para la variable densidad media correspondiente a la isodensidad 3.....página 179
- Figura 47. Diagrama de cajas para la variable densidad media correspondiente a la isodensidad 4.....página 179

### **3.- INDICE DE ECUACIONES**

Ecuación 1. Rigidez a flexión.....	página 116
Ecuación 2: Ecuación de la elipse obtenida del PPRF.....	página 119
Ecuación 3. Parámetros que definen la ecuación de la elipse.....	página 120
Ecuación 4. Ecuación que define el índice de rigidez.....	página 121
Ecuación 5: Ecuación que define la relación de áreas.....	página 121
Ecuación 6: Ecuación que define el índice de planitud.....	página 122
Ecuación 7: Recta de calibrado para el cálculo de densidades óseas a partir del número de Hounsfield obtenido por TAC.....	página 130

