

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA * AÑO XVI * 1939-1940

CUADERNO 123

FOSFATASA Y FRACTURAS

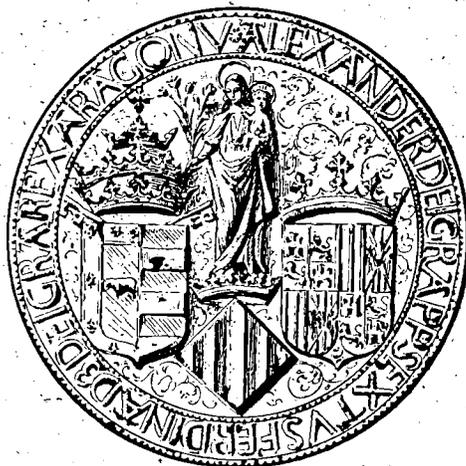
Contribución al estudio de la Bio- química de la calcificación del callo

POR

JOSÉ GASCÓ PASCUAL

PROFESOR AUXILIAR DE PATOLOGÍA QUIRÚRGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
(JEFE PROF. MARTÍN LAGOS)

EX MÉDICO-INTERNO DEL SERVICIO DE HUESOS Y ARTICULACIONES
DE LA CASA DE SALUD VALDECILLA DE SANTANDER



VALENCIA - 1940

IMPRENTA HIJO DE F. VIVES MORA

HERNÁN CORTÉS, 8



Advertencia previa

ESTE trabajo fué terminado en Abril de mil novecientos treinta y seis, en la Casa de Salud Valdecilla, de Santander (Servicio de Huesos y Articulaciones), no habiendo podido publicarse hasta el momento presente por causas de todos conocidas, ajenas a la voluntad de su autor. Aparece ahora, tal como se terminó. Únicamente se añaden algunas brevisimas notas en el preámbulo, para dar cuenta con fines bibliográficos de publicaciones posteriores.

Nos complace testimoniar nuestro agradecimiento al Jefe del Servicio de Química de la Casa de Salud Valdecilla, Dr. Puyal, por las facilidades que gracias a él encontramos para llevar a cabo nuestra labor.

INDICE

PRIMERA PARTE

	Págs.
I.—Introducción.	1
II.—Resumen histórico de las investigaciones biológicas y fisico- químicas realizadas sobre la consolidación de las fracturas.	5
III.—Mecanismos de calcificación.	27
IV.—Bioquímica de las fosfatasas.	37

SEGUNDA PARTE

(Labor personal)

V.—Metódica.	43
VI.—Fosfatasa en suero de fracturados: sus relaciones con los elementos minerales.	53
VII.—Fosfatasa en callos de fractura humanos y calcificación.	69
VIII.—Efectos de la inyección <i>in situ</i> de un éster fosfórico y de fos- fatasa sobre la consolidación de las fracturas en el conejo.	75
IX.—Comentario final.	89
X.—Protocolo.	93
XI.—Conclusiones.	113
XII.—Bibliografía.	117

PRIMERA PARTE

I

INTRODUCCIÓN

***E**L problema de la consolidación de las fracturas es siempre un asunto interesante. A pesar del inmenso número de investigaciones realizadas bajo los más diversos puntos de vista, y de los progresos alcanzados estos últimos años en el tratamiento de las fracturas, es un hecho incontestable el que seguimos sin encontrar explicación satisfactoria la falta de consolidación en sujetos con el mejor estado general y en los que se consiguieron reducciones anatómicas.*

Indudablemente son múltiples los factores de los más diversos órdenes que intervienen en la consolidación, y entre ellos participan preponderantemente condiciones mecánicas y fisico-químicas. Se ha dicho que la consolidación de las fracturas, más que un problema celular, es un problema fisico-químico. Nosotros no diremos tanto, pero sí afirmaremos que la actividad celular necesita medios

adecuados para desenvolverse y éstos a fin de cuentas son factores bioquímicos.

Casi todas las investigaciones modernas sobre la consolidación de las fracturas tienen una orientación bien mecánica, bien fisico-química. Sin embargo la mayor parte de ellas se han dirigido al estudio de la composición química del callo o a la del medio en que se desarrolla la consolidación, y muchas otras al de las modificaciones de los elementos minerales en suero o plasma. Son investigaciones que pudiéramos llamar estáticas, que no nos pueden dar más que los resultados finales del mecanismo bioquímico de la consolidación.

La lectura del libro de ROBERT ROBINSON «The significance of the esters phosphorics in metabolism», con sus ideas tan sugestivas acerca de la osificación que considera como un fenómeno fermentativo, nos impresionó grandemente. Pensamos en la significación que pudiesen tener estos fermentos: las fosfatasa en el proceso de la consolidación de las fracturas, para explicarnos la dinámica de la calcificación del callo.

Revisamos la literatura a este respecto y sólo encontramos escasísimos trabajos que se ocupasen exclusivamente de las relaciones entre actividad de fosfatasa y consolidación. Y aun éstos, casi todos ellos, referidos exclusivamente a experimentación animal.

Hemos tenido ocasión, dado el material abundante de fracturados que son tratados en el Servicio de Huesos de la Casa de Salud Valdecilla, de estudiar los valores de actividad de fosfatasa no sólo en suero de fracturados, sino también en callos de fractura humanos en distintos períodos de consolidación, procedentes de sujetos que tuvieron que ser tratados cruentamente por diferentes motivos. En experimentación animal hemos ensayado los efectos de la inyección «in situ» de un éster fosfórico y de

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

fosfatasa y estudiado la actividad de los callos y sus relaciones con algunos de los elementos minerales.

Huelga decir, para terminar, que en un problema tan complejo no pretendemos dar soluciones; nuestros propósitos son mucho más modestos, se limitan a tratar de dilucidar el papel que pudiese corresponder a la fosfatasa en el proceso de la consolidación de las fracturas.

II

RESUMEN HISTÓRICO DE LAS INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS Y FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS SOBRE LA CONSOLIDACIÓN DE LAS FRACTURAS

ES imposible ocuparse de las investigaciones físico-químicas realizadas para explicar la consolidación del callo de fractura, sin exponer siquiera sea brevemente, las ideas anatomofisiológicas que han dominado en las distintas épocas y la visión actual del problema.

Es tal la cantidad de bibliografía casi inabarcable que existe sobre esta cuestión, que resulta agobiador, pasar revista a todas las investigaciones, muchas de ellas francamente contradictorias; de manera que nos limitaremos a señalar las tendencias que han dominado en cada época.

Desde VIRCHOW (1855) sabemos que la regeneración ósea fracturaria, se realiza en condiciones normales, pasando el callo conjuntivo de fractura a tejido óseo, sin pasar como tiene lugar en la osificación, por una fase cartilaginosa. Esto solamente ocurre en algunos casos en los que ha habido, una inmovilización defectuosa de los fragmentos, hecho señalado por KAPSA-MER (1898). A OLLIER (1867), se le debe el mérito de haber demostrado, la capacidad específica del periostio en los procesos de regeneración ósea, así como del hecho de que todo trasplante óseo sin periostio, está condenado a la muerte y reabsorción. Esta capacidad específica para la regeneración del

*Periostio y con-
solidación*

Ideas de Ollier hueso, la atribuía OLLIER a las propiedades de membrana vascular, indispensable en los procesos de nutrición ósea. Algunos años después comienza a discutirse esta capacidad regenerativa específica del periostio, cuando se le transplanta a lugares en los que normalmente no tiene lugar la osificación (BONOME 1885).

Ideas de Lexer En épocas más modernas se pretendió haber conseguido osteogénesis en huesos a los que se les había liberado cuidadosamente del periostio, suponiendo que los fibroblastos del tejido conjuntivo circundante, participarían en la osteogénesis (TSUNODA 1910, PETROW 1914). Este punto de vista, ha sido siempre rechazado por LEXER y su escuela, principalmente por RHODE (1924) que siempre han defendido con el mayor tesón, la capacidad específica del periostio para la regeneración ósea, fundándose en la fuente de error que suponen las experiencias en huesos desperiostados, dada la dificultad de separar el periostio totalmente, sin dejar adherida la «capa germinal» del mismo. No faltó mientras tanto quien afirmase que únicamente los osteoblastos eran los que poseían esta capacidad osteogénica, llegando a admitir, que en aquellos casos en los que tiene lugar la osificación a distancia de todo sitio de osificación normal, ésta se debería al transporte sanguíneo de osteoblastos (MACEVEN 1908).

Papel de la médula Estas ideas de la capacidad específica perióstica para la regeneración ósea, encontraron una seria oposición en las ideas de BIER y su escuela, que defendían otro punto de vista propugnando por la capacidad regenerativa de la médula ósea. Sin embargo, se llegó a exagerar de tal manera, que uno de sus discípulos MARTIN (1920) afirmó que el periostio sólo era capaz de formar una cicatriz, es decir, un callo sin estructura. La médula ósea en cambio, daba lugar a un verdadero regenerado sin superar en exceso el material de formación. «Si se destruye la médula, no se produce la regeneración», ésta era la afirmación rotunda (1).

En el aspecto histológico se había visto, que en la formación del callo perióstico, tomaban parte las células del *cambium* y de los endotelios vasculares, que daban lugar a la formación de

(1) En esta fecunda discusión que duró 20 años, tanto LEXER como BIER, defendían la *preponderancia* del factor perióstico o medular, pero no de una manera tan exclusivista.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

un tejido germinal que luego se calcificaba y se constituía en callo de fractura.

La especificidad osteoblástica sufrió un rudo golpe, cuando vino a comprobarse por las investigaciones modernas (RIESS, WJERESZINSKI, HEITZBOYER, LERICHE y POLICARD, etc.), que en la llamada capa osteoblástica del periostio o *cambium*, muy raras veces podía comprobarse la existencia de osteoblastos; y en cambio como pudo mostrar WEIDENREICH existían solamente células de carácter poliblastico o fibroblástico que no se distinguían en nada de los elementos conjuntivos de otros lugares. «La capa osteoblástica del periostio, sobre todo en sujetos adultos, está constituida sencillamente por tejido fibroso» (WEIDENREICH).

Especificidad osteoblástica

Modernamente se da ya por resuelta esta cuestión, afirmando que tanto el periostio, como la médula, como el contenido de los canales haversianos e incluso el tejido conjuntivo de los alrededores del foco de fractura pueden formar callo (1). Si bien experimentalmente parece comprobado, que tanto la médula como el periostio por sí solos son capaces de producir un callo normal, en realidad no se puede admitir un origen tan unilateral del callo de fractura. Mas bien hay que pensar que todo el mesénquima participa en la formación del callo conjuntivo, que no se forma por determinados osteoblastos, sino que se debería a una diferenciación de las células mesenquimatosas a consecuencia de ciertas influencias. Hay pues, que admitir, un amplio concepto de los osteoblastos, considerándolos, no como ciertas células de características especiales, sino como un determinado estado del «sincitio» mesenquimatoso.

Ideas modernas

La regeneración ósea en las fracturas, es por tanto, bajo este punto de vista histológico, un problema de diferenciación. Cuales sean las condiciones ideales del medio osteotrófico, para que puedan diferenciarse estas células y cuales los factores que regulen esta diferenciación, es lo que constituye el objeto de una gran parte de las investigaciones biológicas y fisicoquímicas de estos últimos años.

Se trata pues, de dos problemas íntimamente unidos:

(1) VIRCHOW, en su Patología celular (1859) ya decía: «Muéstrase en la historia de las teorías para explicar la formación del callo, la tendencia a encontrar una fórmula simple y todos tienen razón, puesto que el hueso nuevo se regenera del material más diverso.»

1.º Cuales sean los factores que estimulen la formación del callo conjuntivo. 2.º Por qué mecanismo se calcifica el callo conjuntivo o provisional y se transforma ulteriormente en tejido óseo.

Estímulos regenerativos

El primer problema fué abordado al principio bajo un punto de vista local, desde que MARCHAND (1901) situó el problema de la regeneración de las fracturas dentro del terreno de las inflamaciones asépticas, siendo éstas las que darían el impulso necesario para la regeneración.

Hiperemia de Lexer

LEXER (1903 y 1904) estudió las condiciones vasculares durante el proceso de la consolidación y demostró la relación de dependencia, entre la regeneración y la existencia de una hiperemia en el territorio de fractura. Esta alcanza, según este autor, su mayor intensidad en el hombre en la quinta a sexta semana, coincidiendo con la época de máximo desarrollo del callo, siendo imprescindible para que tenga lugar la regeneración. Vino LEXER por tanto a confirmar las ideas de MARCHAND, demostrando la necesidad de que se produjese uno de los síntomas cardinales de la inflamación: la hiperemia, para que la reparación fracturaria tuviese lugar.

Ideas de Bier

Por su parte BIER (1905, 1917 y 18) sentó el principio de la importancia del estímulo producido por los productos de destrucción celular, como factor fundamental en la regeneración, y entre ellos el hematoma de fractura. Observó aceleración en los retrasos de consolidación mediante la inyección de sangre del mismo sujeto en el foco de fractura. Señala la importancia de otros factores como la inmovilización, ausencia de bacterias, un cierto equilibrio entre los factores hormonales y vitamínicos y la integridad del sistema nervioso. Cuando ya se ha producido la regeneración, es necesaria la «función», que es la que transforma y conserva el regenerado. La hiperemia la considera simplemente como una consecuencia del estímulo que acompaña siempre a la regeneración. Lo fundamental para BIER es la «excitación formadora» (formbildende Reiz) producida por los mismos productos de destrucción celular, consecutivos a la producción de la fractura. Estos estímulos los clasificó teóricamente en dos grupos: unos generales, no específicos, y otros específicos u «hormonas conservadoras», que serían las que estimularían la sustitución de las destrucciones groseras, por regenerados más o menos verdaderos y por tanto, por formacio-

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

nes «específicas» (1). Al hablar de estas «hormonas conservadoras» no pretendió BIER definirlas en un sentido estricto, empleando esta palabra para darse a entender, en un sentido muy amplio, e incluyendo en ella a todas las sustancias estimulantes incluso los mismos fermentos. Como vemos, BIER dió una gran importancia al factor «función» en la producción de la regeneración y en las modificaciones que sufre el regenerado. Este influjo mecánico en la regeneración fracturaria había tenido su origen en las ideas de Roux que fué quien primeramente señaló la importancia de los factores mecánicos (presión, tracción, flexión, esfuerzo cortante, etc.), sobre la estructura ósea y sobre la regeneración, considerando que éstos actuaban produciendo conmociones celulares de los elementos osteogénéticos que constituirían el estímulo adecuado para la regeneración (2).

*Factores
mecánicos*

(1) Estas ideas han sido desarrolladas modernamente también bajo un punto de vista teórico por FRANKEL (1929).

(2) Investigaciones posteriores de W. MUELLER, WILICH y MARTÍN en experimentación animal, demostraron la influencia favorable de la presión sobre la consolidación de las fracturas. Cuando ésta es suficiente, estimula la regeneración medular y en cambio, cuando es excesiva, produce osteolisis y reabsorción del callo, llegándose a la pseudartrosis. Incluso en huesos sanos sometidos a presión constante excesiva se producen experimentalmente zonas de reabsorción análogas a las zonas de Looser. PAUWELS ha analizado con exactitud matemática la influencia de los diversos factores mecánicos (presión, tracción, flexión y esfuerzo cortante) sobre la consolidación de las fracturas de cuello anatómico de fémur, llegando a una explicación mecánica de las causas por las que no tiene lugar la consolidación de algunas de ellas, y fundamentado en estas causas ha conseguido soluciones terapéuticas eficaces. Precisamente la influencia favorable de la presión y la desfavorable de la flexión y esfuerzo cortante, se perciben bien en la cadera porque la regeneración en estas fracturas es esencialmente medular, no estando apenas modificada la constelación de fuerzas que actúan por la producción de callo perióstico. Recientemente KROMPECHER ha estudiado experimentalmente la influencia de los diversos factores mecánicos sobre el tipo histológico de regeneración, llegando a la conclusión de que la presión da lugar a la producción de un callo condrógeno, la tracción a un callo desmógeno, y el esfuerzo cortante a un callo angiógeno; este último prácticamente nulo, que conduce a la pseudartrosis. Recuérdese sin embargo que normalmente la consolidación de las fracturas es desmógena. En resumen, se llega a la conclusión de que la presión y la tracción son fuerzas que pueden ser favorables en determinadas condiciones para la consolidación, y en cambio, la flexión y el esfuerzo cortante son totalmente desfavorables y determinan en las fracturas sometidas a estos esfuerzos mecánicos, pseudartrosis.

Vitaminas El desarrollo de la Vitaminología y de la Endocrinología en años ulteriores y sobre todo la frecuencia con que se observaban retrasos de consolidación después de la guerra, sin que pudiesen ser explicados por causas locales, fueron el motivo de un gran número de trabajos sobre las relaciones entre los factores vitamínicos y hormonales y la regeneración de las fracturas. Del balance de los trabajos sobre las diferentes vitaminas, en experiencias de avitaminosis (vitamina A ROEGHOLT, vitamina B ROEGHOLT, vitamina C ISRAEL y FRANKEL, SCHILOWZEW, HALASZ y MARX..... y vitamina D WATANABE, SCHOTTE, BORST, COLLAZO y colaboradores HACHENBURG, CASTAGNI.....), y en experiencias en animales no avitaminósicos las de HELLNER y VARA-LÓPEZ, sobre la influencia de la vitamina D; se deduce que en animales en avitaminosis (excepto en la avitaminosis A), se producen graves retrasos de consolidación que sólo se curan por la administración de la correspondiente vitamina. Los más modernos trabajos sobre la influencia de la hipervitaminosis en la consolidación de las fracturas (hipermitaminosis D, TAMMAN, KNOPFLACH.....) muestran que ésta ejerce una influencia desfavorable sobre la consolidación.

Hormonas Otro tanto ha venido a ocurrir con los factores hormonales que indudablemente estimulan la regeneración, pero en los que probablemente se trata de fenómenos de correlación funcional, entre las distintas glándulas de secreción interna, que dificultan la delimitación de la acción de cada una de ellas aisladamente sobre la consolidación fracturaria. Se atribuye como es conocido una influencia aceleradora al tiroides (BAUMANN, KOLODONY...) a las paratiroides (THOMPSON, OGAWA, GHIRON, ENGEL, SPEED y RIDDER... y en contra (LEHMANN y COLE, FINE y BROWN, CHANDLER, ROSS... que encuentran retardos de consolidación en conejos por la administración de hormona de COLLIP), timo (MATTI...), páncreas (KOLODONY) suprarrenales (LUCHESE), bazo (SCHÖNBAUER), glándulas genitales (BANKOFF, HEYDEMANN...), etc.... Sin embargo, análogamente a lo que ocurre con las vitaminas, parece que estos extractos sólo actúan favorablemente sobre los retrasos de consolidación producidos por la extirpación de una o varias de estas glándulas, cuando se administra su correspondiente hormona.

Alimentación La influencia del factor alimenticio con respecto a las modificaciones que pudiese producir de la reacción del medio y su

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

repercusión sobre la consolidación fracturaria, ha sido estudiado recientemente por MONDRY y BOEMINGHAUS. Estos autores, en experiencias en conejos fracturados administrando dietas ácidas y alcalinas, encuentran diferencias muy escasas en la consolidación, a favor de los animales alimentados con régimen ácido.

KUBANY, ha tratado de modificar la reacción general del medio, tratando a cobayas y conejos con soluciones de bicarbonato sódico y ácido clorhídrico. Ha controlado las modificaciones de la reacción del medio, mediante medidas del pH en sangre. Al estudiar los callos en diferentes épocas del período de consolidación, encuentra resultados más favorables en un período precoz (dos a tres semanas), en los animales tratados por álcalis, que en los de control; limitándose esta diferencia al primer período, es decir, aquél en el que el callo está formado exclusivamente por tejido de granulación. En un período más avanzado, encuentra modificaciones en favor de los animales tratados con régimen ácido. Es dudoso que estas investigaciones tengan valor para la especie humana.

Reacción del medio

La influencia del sistema nervioso vegetativo, con su íntima relación con el quimismo celular, aparece también bastante oscura. La influencia de la simpatectomía fué estudiada por primera vez por KAPPIS, que hizo una simpatectomía periarterial en un retraso de consolidación, y obtuvo buenos resultados. La experimentación animal a este respecto haciendo gangliectomías, ha dado resultados bastante contradictorios. Parece que la simpatectomía con la producción de una hiperemia, debiera dar lugar por el aumento de vascularización, a una reabsorción ósea y movilización de elementos minerales del lado gangliectomizado. En investigaciones recientes y numerosas de KEY y MOORE, no ha podido ser confirmado este extremo.

Sistema nervioso vegetativo

En cuanto a los factores constitucionales, los hechos clínicos han mostrado que existen evidentemente sujetos con fracturas análogas y en las mismas condiciones, en los que la consolidación tiene lugar rápidamente y dan lugar a callos exuberantes y en cambio, otros en los que la regeneración ósea después de la fractura transcurre perezosamente, dando lugar a callos poco desarrollados. Los estudios de PAYR sobre Constitución en Cirugía, han mostrado la existencia de dos tipos constitucionales que reaccionan en este sentido de manera opuesta: unos son sujetos en los que predomina en todas sus manifestaciones la

Constitución

producción de tejido conjuntivo, son aquellos sujetos en los que las heridas cicatrizan rápidamente y producen cicatrices gruesas con tendencia al queloide; los procesos inflamatorios crónicos tienden a ser rápidamente encapsulados por tejido fibroso, la inmovilización de articulaciones conduce rápidamente a la anquilosis fibrosa... y en las fracturas dan lugar a la producción de callos exuberantes que rápidamente se calcifican; son sujetos que presentan por tanto una preponderancia de las reacciones del mesénquima y constituyen el tipo mesenquimatoso (fibroplásticos de PAYR). En contraposición con éstos, nos encontramos con otros sujetos en los que siempre es muy escasa o falta casi completamente la reacción del mesénquima, con todas las gradaciones intermedias. Esta clasificación, si no tiene un sentido fisiopatológico, obedece indudablemente a hechos clínicos evidentes.

En resumen, vemos que el estímulo que origina la formación del callo, obedece a varios órdenes de factores: unos de ellos de naturaleza local, debidos a los estímulos que representan las sustancias liberadas por la destrucción celular, los debidos a las relaciones de vascularización—otros de naturaleza mecánica, otros exógenos alimenticios (vitaminas)—otros generales (hormonas, sistema nervioso vegetativo) y finalmente otros momentos constitucionales.

El segundo problema planteado, es el de la procedencia de los elementos minerales del callo y el por qué se calcifica éste. También ha dado lugar a gran número de investigaciones.

La existencia de hiperemia en el lugar de la fractura, hizo pensar en la posibilidad de que suponiendo que la sangre sirviese para el aporte de las sustancias minerales necesarias para la calcificación, los valores de estas en la misma se modificarían. La sencillez de los micrométodos, para la determinación en suero y plasma de los elementos minerales, contribuyó a que se multiplicasen las investigaciones en el hombre y en animales de experimentación, en condiciones normales, y bajo las más diversas influencias minerales, vitamínicas y hormonales. Las extensas investigaciones de TISDALL y HARRIS (1922), sobre los valores de calcio y fósforo en suero de fracturados y las ulteriores de RUDD, dieron como resultado que los valores de la calcemia permanecen constantes durante todo

*Calcemia y
fosfemia*

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

el tiempo que dura la consolidación y en cambio los de fósforo inorgánico, ascienden a doble del valor normal, a las ocho o nueve semanas, para descender cuando la consolidación ha tenido lugar.

PETERSEN (1924) estudió los valores de calcio y fósforo en suero de diez y siete casos de pseudoartrosis y encontró en once de estos enfermos, valores bajos del producto Ca P, afirmando que existía una relación entre la concentración de calcio y fósforo en la sangre y la consolidación de las fracturas. Cuando el producto Ca P, fuese inferior a treinta, la fractura no consolidaría.

BAJ (1927) investigó las relaciones de la calcemia con la calcificación del callo, encontrando un aumento de la misma que alcanzaba su máximo de los diez y ocho a veintidós días de producida la fractura, descendiendo gradualmente a valores normales cuando ha tenido lugar la consolidación. (Sin embargo, hay que tener en cuenta que este autor halló valores muy bajos de calcemia en condiciones normales: media normal en adulto, 7'85 mgs. por 100).

RAVDIN y DEON JONAS, en cinco casos de retraso de consolidación, sólo en uno hallaron valores bajos del producto Ca P.

Ulteriores investigaciones de SPEED (1929), en diez casos de pseudoartrosis, dieron como resultado que el producto Ca P, así como sus valores, aisladamente eran completamente normales y análogos a los valores encontrados en doscientos casos de consolidación normal. HABLER (1930) investigó también los valores de calcemia y fosfemia en fracturados, encontrando valores normales de los primeros y elevaciones de los segundos.

PINCUSSEN y NEUMANN, encuentran en ocho fracturados humanos hipermagnesemia y cifras normales de calcemia, fosfemia y kaliemia. En cambio, en conejos encuentran hiperkaliemia.

Más recientemente, PERVES (1932 y 33), investigó los valores de calcemia en cuarenta casos, durante la consolidación, encontrando siempre hipercalcemia (con excepción de un caso), ésta descende a su valor normal, sólo cuatro semanas después de haber tenido lugar «la consolidación clínica».

O. TIMPE investigó en catorce fracturados los valores de calcemia P inorgánico y P orgánico, encontrando resultados muy irregulares; en tres casos existía hipocalcemia, en cuatro

casos la calcemia era normal y en seis existía hipercalcemia. En cuanto a los valores de P inorgánico, en la mitad los encuentra elevados; en dos, no encuentra modificaciones y en cuatro casos disminuídos; el P orgánico también se comportó muy irregularmente. De modo que llega a la conclusión de que la calcemia y fosfemia, durante la consolidación, no muestran una tendencia definida que permita afirmar la existencia de modificaciones en determinado sentido.

HOFFMEISTER y JANTKE (1933) en treinta fracturados encuentran un descenso de los valores de calcemia y fosfemia en la primera semana de producida la fractura que luego ascienden progresivamente hasta la quinta semana. Encuentran valores más elevados en primavera y en verano, que en otoño e invierno (¿efecto de la radiación solar?).

Hipercalcemias
experimentales

Los estudios sobre la influencia de los elementos minerales en suero tratando de producir hipercalcemias e hiperfosfemias por la administración de calcio y fósforo en sus diversas formas (combinaciones orgánicas, etc.), han fracasado puesto que en el fracturado como en el sujeto normal no se consigue así, elevar los valores de calcemia y fosfemia más que muy transitoriamente. El calcio y fósforo son eliminados rápidamente, manteniéndose constantes los valores en sangre (JANSSEN, HESSE y BERNDT...). Parece en cambio que en los casos en los que con motivo de retrasos de consolidación o pseudoartrosis se había colocado un trasplante óseo, se produce una hipercalcemia al mismo tiempo que tiene lugar la consolidación (LERICHE, SCHMIDT y OBRATZOW). En el mismo sentido han ido dirigidas las experiencias de PANKRATIEW que encuentra una hipercalcemia además de aceleración en la consolidación, en experiencias en animales mediante la inyección *in situ* de cenizas óseas.

Los resultados de las investigaciones realizadas a este respecto en experimentación animal en que siempre encuentran hipercalcemia (GUSSAROW, PASQUÁLINO, OHNO), no pueden valorarse para la especie humana por los distintos hábitos alimenticios, de los animales sujetos a experimentación.

La investigación de los valores de actividad de fosfatasa en suero y plasma de fracturados han sido realizadas estos últimos años por KAY, HUNSBERGER y FERGUSON, BODANSKY y JAFFE, AUSTONI y COGGI, BOTTERRELL y KING.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

KAY, en un fracturado encontró hiperfosfatemia. HUNSBERGER y FERGUSSON encuentran valores normales que ascienden en el momento de la precipitación cálcica para descender después.

BODANSKY y JAFFE investigan los valores de fosfatemia en trece fracturados haciendo solamente una determinación y encuentran un ligero aumento en los trece casos investigados. En cuatro casos en que hicieron varias determinaciones, encontraron un aumento más considerable, coincidiendo con determinaciones hechas de los diez y ocho a veinticinco días de producida la fractura y que descendieron tres semanas después.

AUSTONI y COGGI (1935) investigaron seis casos de fracturados, encontrando valores normales durante todo el tiempo que duró la consolidación en los casos en los que se trataba de fracturas «ligeras» y pequeños aumentos en aquellos casos en los que se trataba de fracturas «graves o múltiples».

BOTERELL y KING (1935) encontraron valores normales en tres fracturas de cuello de fémur que no consolidaron, mientras que encontraron hiperfosfatemia en un fracturado joven (diez y ocho años).

Del balance de todos estos resultados tan contradictorios, solamente se deduce que de la investigación de los elementos minerales y de fosfatasa en suero, no se pueden sacar conclusiones respecto a la procedencia del calcio y fósforo en el callo de fractura y mucho menos nos explican el mecanismo por el que se calcifica el callo. Es necesario, por tanto, dirigir la atención sobre las modificaciones fisico-químicas y minerales que tienen lugar en el mismo callo y en sus alrededores.

El primer trabajo serio sobre la composición mineral del callo de fractura lo hizo EDEN en colaboración con HERMANN y SCHWARZ en 1924. Estos autores estudiaron los valores de calcio y fósforo en callos de fractura en distintos periodos de consolidación y se encontraron con que el contenido en calcio del callo era en momentos precoces muy superior (siendo sin embargo algo inferior al contenido en calcio normal del hueso) al de fósforo, de manera que siendo la relación Ca P como 1 : 0'6 en el hueso, en el callo era ésta como 1 : 0'2 a 1 : 0'4 a lo sumo. Sólo al cabo de mucho tiempo se iba enriqueciendo el callo en fósforo hasta llegar a su proporción normal en el hueso. Repitiendo las experiencias que había llevado a cabo veinte años antes PFAUNDLER con cartilago de calcificación *in vitro*

Composición mineral del callo

de callos de fracturas, se encontraron con que esta calcificación sólo tenía lugar cuando se introducía primeramente el callo en soluciones cálcicas y luego en soluciones de fosfato, pero la calcificación no se producía si se introducía el callo en estas mismas soluciones a la inversa. Vinieron, pues, a concluir que lo mismo que ocurre en la osificación en el sentido de FREUDENBERG (véase capítulo siguiente), en un primer tiempo se produce un aumento de calcio en los tejidos que van a osificarse y sólo más tarde se fija el fósforo. Consideran fundamental la actividad celular en la osificación, pero condicionada por «factores ambientales» favorables. Así mediante la inyección de soluciones ácidas y alcalinas de un mismo anfolito, en experiencias en conejos, encontraron que la consolidación tenía lugar más rápidamente en medio ácido. Dedujeron de esto que para la movilización de calcio, era necesario que la reacción del medio se desplazase en un sentido acidósico. Estudiaron las relaciones entre la concentración de calcio en la linfa y su fijación, haciendo depender esta última de la primera. En los productos de destrucción albuminoidea, vieron una de las principales causas de inhibición de la calcificación dando una gran importancia las condiciones de vascularización que al ser abundantes en el foco de fractura, contribuirían no sólo a nutrir el tejido de granulación joven del callo, sino también a metabolizar los restos albuminoideos que serían para ellos los inhibidores de la calcificación. Finalmente, bajo un punto de vista más «práctico» ensayaron algunos preparados de fósforo que inyectados *in situ* acelerasen la consolidación en los retrasos de consolidación, encontrando como la más favorable, la combinación fosfato sódico-glicocola que fué lanzada al mercado con el nombre de «Ossofit». Atribuyeron su efecto a la activación de las oxidaciones que produciría, junto con el depósito local de fósforo.

Ideas de Eden

Factores locales

Estas experiencias hicieron que se polarizase de nuevo la atención, sobre los fenómenos locales en la producción del callo de fractura y su calcificación.

Ideas de Rehn

REHN (1924) sentó el principio de la unidad hueso-peristio-músculo en el proceso de la regeneración fracturaria. Se fundó en el hecho clínico indudable de que las fracturas que se producen en territorios en los que existen abundantes masas musculares, consolidan más rápidamente y con callo más abundante, que aquéllas, situadas en sitios donde éstas son escasas o no



BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

existen (tercio inferior de tibia, etc....). REHN lo interpreta en el sentido, de que el estado de contractura tetánica de los músculos en las fracturas, sería muy favorable para la cesión por parte de los mismos de fosfatos, que serían fijados por el callo.

SKOSSOGORENKO (1931) investigó el papel osteogenético del músculo, estudiando el contenido de calcio y agua del músculo perifractuario y normal en el conejo, encontrando valores altos de ambos cuerpos. Supone por lo tanto que el músculo tiene una función de reserva de calcio para el callo durante la consolidación.

Investigaciones posteriores de TIMPE (1932), también en conejos, llegan a resultados totalmente opuestos, ya que encuentra no sólo valores inferiores de calcio en músculo perifractuario y en general en todo el sistema muscular del animal fracturado, sino que en virtud de sus experiencias admite la incapacidad de los músculos del animal fracturado para fijar calcio, mientras que el contenido de fósforo en el conejo, tanto en el músculo de los fracturados como en el de los normales, es análogo. Sin embargo en dos casos que estudió en la especie humana en dos fracturas de cuello de fémur (en cadáveres), encontró una clara disminución de fósforo no sólo en el músculo perifractuario, sino también en los músculos lejanos a la fractura, es decir, una disminución uniforme de fósforo en toda la musculatura. Los valores de calcio en músculo perifractuario, fueron análogos a los de músculo lejano a la fractura.

*Ca y P
en músculo peri-
fractuario*

LERICHE (1926) ante los resultados obtenidos en las investigaciones en suero, consideró la calcificación del callo de fractura como un proceso de «mutación local» de elementos minerales, bajo la influencia de factores endocrinos (paratiroideos), físico-químicos (cambio de reacción del medio) y vasculares; siendo estos últimos los que servirían para la movilización de calcio. Señaló por otra parte la relación existente entre hiperemia y reabsorción ósea.

*Concepto de
Leriche*

KÖNIG (1927) se ocupó de las relaciones entre la atrofia ósea de los extremos de fractura y la regeneración, y consideró como fisiológica la primera y necesaria para la consolidación. Esta osteoporosis de los extremos fracturarios existe siempre aun cuando en algunos casos no es suficientemente intensa

*Atrofia ósea y
regeneración*

para que aparezca en la radiografía (15 por 100 de los casos según GRASHEY) (1).

El malogrado Prof. SEGOVIA comprobó químicamente en experimentación animal las ideas de KÖNIG, investigando el contenido total de calcio en hueso fracturado y en el homólogo normal, y encontró valores sensiblemente análogos, por lo que vino a concluir que el calcio necesario para la consolidación de las fracturas procedería de los extremos fracturarios.

Otro grupo de investigadores han dirigido la atención sobre las modificaciones de la reacción local del medio en las fracturas.

Desde que SCHADE en 1923, demostró la existencia de un proceso de «acidez local», no de acidosis (es decir, un desplazamiento del pH hacia el lado ácido) en toda inflamación, se supuso que desarrollándose en el foco de fractura un proceso inflamatorio, tendrían que producirse modificaciones en la reacción del medio en este sentido.

*Modificaciones
de la reacción
local del medio*

GÖTZE (1933) investigó la reacción del tejido del callo (por medio de indicadores) en fracturas subcutáneas y operatorias en conejos, y encontró que el tejido del callo fresco era más ácido que el del callo ya calcificado y la reacción de este último más ácido que la del hueso normal. En las fracturas operadas, esta reacción ácida del callo era más persistente que en la del callo procedente de conejos fracturados subcutáneamente.

GREUNE, algún tiempo antes había investigado (también por medio de indicadores), la reacción del medio, por medio de hilos de algodón recubiertos de colodion introducidos en el sitio de fractura. Encontró con gran regularidad que el pH se desplaza hacia el lado ácido, siendo estos desplazamientos de 0'2 a 0'4; teniendo lugar desde cinco días de producida la fractura, hasta tres semanas después.

Es de suponer, por tanto, que efectivamente, durante los primeros días de producida una fractura, existe un estado de acidez en el foco fracturario.

(1) Recientemente se atribuye esta atrofia al deslizamiento cristalino de la zona perifracturaria con el aplastamiento de capilares y reabsorción subsiguiente a la desvitalización. Sería de origen mecánico (véase HENSCHEN).

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

Las investigaciones más recientes han ido dirigidas al estudio de la influencia que pudiesen tener en la regeneración fracturaria, la inyección en el foco de fractura de extractos óseos, u obtenidos del mismo callo.

A partir de las investigaciones de ROBINSON (1923, 24, 28), que demostraron la existencia de fosfatasas en los sitios en que normalmente tiene lugar la osificación, cuando ésta se está realizando, se ha estudiado la acción de diferentes preparados de autólisis orgánica sobre la consolidación de las fracturas. Así, BURKHARDT inyectó diferentes mezclas de sangre y papilla ósea, papilla medular y extracto embrionario a conejos fracturados (haciendo una resección del radio) y se encontró con que la mayor capacidad regenerativa la tenía el extracto medular, luego la sangre, y finalmente el extracto embrionario.

Inyección de extractos óseos en el foco

HENSCHEN describe una acción específica calcificante de los autolisados orgánicos de riñón y cartilago (ambos muy ricos en fosfatasas) y v. SEEMEN y SEELIGER encuentran un factor acelerador de la calcificación en autolisados de callos de fractura y en extractos de dientes de ternera, atribuyendo sus efectos al contenido de estos cuerpos en fosfatasa.

Más recientemente, HOFFMEISTER (1933) dice haber obtenido aceleración en retrasos de consolidación, mediante la administración de un extracto desalbuminizado de médula ósea.

La influencia del hematoma sobre la consolidación de las fracturas, que ha sido discutida clásicamente, siendo considerada como efecto de «substrato nutritivo» o como estímulo debido a la fibrina, etc. (BIER, VOGEL, POCHHAMMER...) y negada su influencia por otros autores (LEXER...), ha entrado de nuevo en la investigación, bajo un punto de vista bioquímico, al considerársele ya concretamente, como un depósito de esteres fosfóricos (muy abundantes en los glóbulos rojos), que podrían en determinadas condiciones ser desarticuladas por las fosfatasas, liberando fósforo inorgánico.

Hematoma

En este sentido han ido orientadas las interesantes investigaciones de POTTS (1933), que ha tratado de demostrar en sus experiencias, hasta qué punto sigue el callo óseo al hematoma, extendiéndose más allá del sitio en que tuvo lugar la lesión ósea. En un grupo de animales, osteotomiza el radio y conserva el cúbito como férula, sin lesionar lo más mínimo el

Trabajos de Potts

periostio, de manera que las fracturas sean lo más parecidas posible. En un grupo consigue mantener el campo seco y en otros deja un gran hematoma. En un segundo grupo inyecta sangre de una vena, procurando que este hematoma artificial se extienda más allá del foco de fractura. A un tercer grupo les inyecta solamente fibrina. Encuentra callo más precoz y acentuado en los casos en los que ha existido hematoma y presenta radiografías, en las que se ve que el callo se extiende hacia aquellos sitios en que el hematoma se había desplazado por abajo o por arriba del foco de fractura. En los casos en los que inyectó simplemente fibrina, no observó aceleración, comportándose análogamente a los casos sin hematoma. Atribuye la acción calcificante del hematoma, a la retención, por parte del mismo, de fosfatasa (que segregaría el hueso).

Fosfatasa en callo y músculo

TIMPE (1933) ha estudiado la existencia y naturaleza de las fosfatasas existentes en el callo de fractura y músculo perifracturario (en cadáveres), con objeto de estudiar el origen del fósforo inorgánico necesario para que se produzca la calcificación del callo. Sus investigaciones han sido solamente cualitativas. Ha colocado autolisados de callo y músculo en presencia de diferentes esteres fosfóricos y combinaciones orgánicas fosforadas (lecitina, caseína, exosadifosfato sódico, glicerofosfato sódico y ácido nucleínico) y ha encontrado que normalmente existen en el hueso y músculo, fermentos capaces de desdoblar el exosadifosfato y el glicerofosfato sódicos, pero en el callo de fractura ha encontrado también un fermento capaz de desdoblar el ácido nucleínico, que no aparece en el hueso y músculo de sujetos normales y fracturados, pero en cambio, sí se encuentra en los músculos procedentes de cadáveres. El músculo perifracturario extraído inmediatamente después de la muerte, hidroliza también el ácido nucleínico en aquellos casos en los que este músculo se encuentra impregnado por un hematoma no reciente.

ULLRICH ha encontrado aumento de la actividad de fosfatasa en huesos fracturados y KUWABARA halla una relación entre el contenido cálcico del callo y la actividad. Esta se acentúa según el autor, por la presencia de sales cálcicas.

MAC KEOWN y OSTERGREN encuentran un aumento de actividad de fosfatasa en el hueso fracturado. Creen que este

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

aumento de actividad no se limita al callo o a la totalidad del hueso fracturado, sino que se extiende a todo el sistema óseo.

KAMADA, WILKINS y REGEN, encuentran aumento de la actividad de fosfatasa en el callo de fractura durante el proceso de consolidación.

BOTTERELL y KING (1935) han estudiado muy recientemente el contenido de fosfatasa del callo y los extremos perifracturarios en el conejo en diferentes épocas del período de consolidación, y comparándolos con el contenido en el hueso homólogo no fracturado, encontraron constantemente, mayor actividad de fosfatasa en el lado fracturado, que alcanzó su máximo a los cuarenta días de producida la fractura. Fracturando ambos lados encontraron valores sensiblemente iguales. Sin embargo, por la inyección de fosfata (obtenida según el método de MARTLAND y ROBINSON; véase más adelante) no observaron aceleración en la calcificación de los callos.

Muy recientemente REGEN y WILKINS se han valido de un procedimiento indirecto para mostrar el papel de la fosfatasa durante el proceso de la consolidación. Estudian el efecto de la irradiación Röntgen sobre la consolidación, en conejos fracturados. Como es sabido, la actividad de fosfatasa del hueso y plasma disminuye por la acción de los rayos Röntgen. La disminución de actividad de fosfatasa alcanza su máximo aproximadamente a las tres semanas de verificada la irradiación y se mantiene durante unas cinco semanas. Aprovechan el momento de máxima depresión de la actividad de fosfatasa para fracturar los conejos y se observa que se producen constantemente retardos de consolidación en las fracturas producidas en las patas irradiadas. Los valores de fosfatasa en callo de las patas irradiadas son muy inferiores a los de los animales no irradiados (1 a 5 U, en los primeros y de 8 1/2 a 10 U, en los segundos). De estas experiencias deducen los autores, que las ideas de ROBINSON sobre la osificación pueden trasladarse íntegramente al proceso de la consolidación de las fracturas.

Fosfatasa e irradiación

Otra de las cuestiones que ha vuelto a ser resucitada en estos últimos años bajo el punto de vista físico-químico, es la de las fracturas intra-articulares. Hoy sabemos que con un tratamiento de inmovilización adecuado, las fracturas intra-articulares generalmente consolidan, pero no cabe duda que tardan más

en consolidar que las extra-articulares. Se ha invocado clásicamente como causa, las especiales relaciones vasculares de las articulaciones (LEXER) y la influencia del líquido sinovial (BIER).

PODKAMINSKY (1931) ha estudiado los fermentos que se encuentran en el líquido sinovial y ha hallado diastasas, proteasas y lipasas, pero no catalasas. Las fosfatasa pertenecen a este último grupo, pero no dice concretamente el autor si han sido especialmente investigadas. Atribuye este autor los retrasos de consolidación en las fracturas intra-articulares a la existencia de proteasas que actúan desarticulando a las albúminas de grandes moléculas.

En resumen, respecto al origen del calcio necesario para la consolidación de las fracturas, suponemos que procede en su mayor parte de los extremos fracturarios; el papel del músculo a este respecto no aparece nada claro. En cuanto a los valores de calcemia, no nos dicen nada respecto al origen del calcio en el callo de fractura, ya que por ellos no podemos saber si éste se deposita o no en los tejidos.

Menos sabemos con respecto al origen del fósforo; se sospecha que pueda proceder fundamentalmente del fósforo orgánico contenido en los tejidos traumatizados, del contenido en los extremos fracturarios y del músculo. En lo que hace referencia a su posible origen sanguíneo, nos encontramos en las mismas condiciones que con el calcio, es decir, que por los valores de fosfemia no podemos sacar conclusiones respecto al balance metabólico del fósforo en los tejidos.

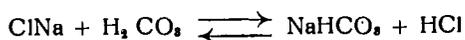
Mecanismo fisi-co-químico de la consolidación

Con una visión crítica de los trabajos realizados, podemos imaginar en el momento actual el proceso de la consolidación de las fracturas de la manera siguiente: Al producirse una fractura tiene lugar, como en cualquier otro proceso inflamatorio, un estado de acidez local. Este aumento de acidez local tiende a ser neutralizado por el organismo, y todos los amortiguadores y entre ellos los bicarbonatos alcalinos reaccionan con el ácido, liberando anhídrido carbónico, es decir, un ácido más débil y volátil, y por tanto de más fácil eliminación. Se produce por ello en el foco de fractura un aumento de la tensión de anhídrido carbónico.

El ácido que impregna las albúminas es posible que sea el ácido clorhídrico. Ahora bien ¿cómo puede producirse este áci-

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

do en el organismo existiendo tan abundantemente amortiguadores que tienden a sostener constante la reacción en la sangre y en los tejidos? Esta no puede tener lugar por la absorción o liberación del mismo directamente, ya que entonces se neutralizaría al reaccionar con los amortiguadores. Se ha tratado de explicar por el aumento de la concentración en el foco fracturario de cloruro sódico (BLUM, CHABANIER). Sin embargo ¿cómo se explica que una sal neutra como el cloruro sódico produzca un aumento del ácido clorhídrico que impregna las albúminas? La siguiente reacción reversible puede aclararnos este punto:



Efectivamente, si *in vitro* hacemos pasar una corriente de CO_2 sobre suero fisiológico (es decir, sobre una solución de ClNa) no se formará prácticamente HCl, porque siendo la reacción reversible, el ácido clorhídrico reacciona con el bicarbonato sódico y regenera el cloruro sódico y anhídrido carbónico. Pero si nosotros conseguimos quitar el HCl de la reacción a medida que se va formando, entonces ésta se desplaza de izquierda a derecha. Esto es lo que probablemente ocurre en el organismo: las albúminas con sus grupos amínicos se encargan de fijar el ácido clorhídrico, como ha demostrado experimentalmente I. LOEB, e inversamente una disminución suficiente de sales neutras, provoca la descarga ácida por parte de las mismas. Es decir, que el acúmulo de sales neutras a base de ion cloro, constituye una reserva acidótica.

Ahora bien, este estado de acidez local produce un aumento de la ionización del calcio, es decir, que aumenta la concentración en calcio activo. El origen de este calcio activo no parece muy claro, sobre todo si éste procede de la disolución en medio ácido de las sales óseas por mecanismo químico, puesto que se necesitan concentraciones grandes de ácidos fuertes para que tenga lugar la disolución. Sin embargo, con arreglo a las ideas de fijación de ácido clorhídrico sobre las albúminas, podría explicarse la atrofia de los extremos de fractura como un proceso de disolución.

Conforme se va produciendo la regeneración y se forma bajo el influjo ácido tejido de granulación conjuntivo que ha de

constituir el futuro callo óseo, esta reacción ácida del medio, desaparece. La neutralización no parece que corra a cargo (como se creyó en un principio), de las sales cálcicas óseas que son alcalinas, sino más bien a cargo del ion sodio. Se produce pues un intercambio de cationes de modo que las albúminas toman calcio y ceden sodio. Tampoco está claro la forma en que se encuentra el calcio que toman las albúminas, aunque es más probable que esté en este período precoz más en forma física (¿adsorbido?), que en combinación química.

Cuando la reacción del medio se desplaza en un sentido alcalino, entran en actividad las fosfatasas existentes en el callo, tejidos circundantes al foco de fractura y hematoma y comienzan a liberar fósforo inorgánico de sus esteres que existen abundantemente tanto en la sangre como en estos tejidos. (Probablemente por la lisis celular serían liberadas fosfatasas muy activas). Cuando las concentraciones de calcio y fósforo locales sobrepasen el producto de solubilidad del fosfato y carbonato cálcicos, se producirá la precipitación. Esta ocurriría precisamente en aquellos sitios en que merced a la liberación de fósforo inorgánico por las fosfatasas, se produce un estado de sobresaturación local.

Si persiste el estado de acidez local (persistencia de restos tisulares alterados, infección, proceso inflamatorio crónico) (1) o general (embarazo, osteomalacia, raquitismo, etc...), la consolidación sólo tiene lugar muy lentamente o no llega a producirse. En cambio, si en un principio no se produce el desplazamiento del pH local hacia el lado ácido, tampoco tiene lugar la consolidación y en estos casos resultan favorables los procedimientos cruentos e incruentos, pero principalmente los primeros que produzcan un proceso inflamatorio aséptico (perforaciones de BECK, astillamiento de KIRSCHNER, etc.) y que den lugar a un cambio de reacción.

Parece, pues, lo fundamental en el proceso físico-químico de la consolidación, la existencia de una modificación de la

(1) Es curioso que en las fracturas con osteomielitis en que existe un estado de acidez local permanente, transcurre la consolidación en ocasiones normalmente. FISCHER, para explicar este hecho, ha tratado de demostrar experimentalmente la capacidad específica de las toxinas estafilocócicas de estimulación de los factores osteogénicos.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

reacción del medio que va a calcificarse, primero en un sentido ácido (de acidez verdadera) y después en un sentido alcalino. De la persistencia del primero o de la presentación precoz del segundo, depende el que tenga lugar o no la calcificación del callo. De las ideas sobre el mecanismo por el que se calcifica el callo, nos ocupamos en el capítulo siguiente.

III

MECANISMOS DE CALCIFICACIÓN

LAS diferentes teorías ideadas para explicar los mecanismos de calcificación de los tejidos, pueden reducirse a tres grupos fundamentales: Una serie de autores, que consideran la calcificación como un proceso de secreción celular específica (RÖHMANN, WATT, etc.). Otro grupo que ve en la calcificación un proceso de afinidad por parte de los tejidos que van a calcificarse, para con los iones Ca y P (PFAUNDLER, FREUDENBERG y GYÖRGY), y finalmente otros consideran la calcificación como un proceso de precipitación, con arreglo a las condiciones de solubilidad de los elementos minerales en la sangre y en los tejidos (PAULI y SAMEC, HOFMEISTER, KLEINMANN). Dentro de este grupo, hay que incluir aquellos que defienden, como mecanismo de calcificación, el de precipitación, a consecuencia del aumento local de iones PO_4 liberados de combinaciones orgánicas, por una actividad celular fermentativa (tanto de las células vivas, como de los productos de lisis celular) (ROBINSON). *Teoría de Watt*

Los que consideran el proceso de la calcificación como el resultado de una actividad celular específica, separan el mecanismo de la calcificación normal del de las calcificaciones provisionales y de las heterotópicas, que consideran como un simple depósito de sales cálcicas, que nada tienen que ver con la osificación. Tal es la opinión clásica de RÖHMANN, recogida modernamente por J. WATT. Esta teoría «de la secreción

específica», de las células de los endotelios vasculares, fué ideada para explicar la osificación normal, pero como excluye completamente de este mecanismo, la calcificación «provisional» del callo de fractura no nos interesa bajo nuestro punto de vista, por lo que no nos ocuparemos de ella. No hace falta insistir mucho, por lo demás, para darse cuenta de que bajo el refugio de la actividad «vital», escamotea, en absoluto, el mecanismo bioquímico de la calcificación. No se puede negar la actividad celular en el mecanismo de la calcificación y osificación, pero lo que interesa es desentrañar el mecanismo bioquímico, por el que se realiza.

*Ideas de
Pfaundler*

Las ideas de PFAUNDLER, sobre la calcificación, se basaron en una experiencia elemental: introdujo la epifisis de un hueso largo de ternera finamente pulverizado en una solución neutra de cloruro cálcico, añadiendo otras sales para que el medio fuese isosmótico con el suero sanguíneo de la especie animal, y observó que del líquido desaparecía al poco tiempo el ion calcio, y en cambio, permanecía constante el ion cloro. Al mismo tiempo observó que este calcio no se precipitaba, por lo que supuso que quedaba adherido a la parte albuminoidea. Explicó estos hechos, suponiendo que existiría una afinidad especial de ciertas albúminas de los cartílagos y de las epifisis para «aprisionar» iones calcio por un mecanismo de «adsorción electiva», análogo al que había sido observado antes por algunos físicos, en experiencias con diversas sustancias orgánicas (colas, etc.). Surge así la teoría del aprisionamiento o captación de sales cálcicas (Kalksalzfänger) por determinadas albúminas que después se destruirían, dando lugar a la calcificación. Por tanto, PFAUNDLER sienta el hecho de la afinidad de ciertas albúminas para fijar calcio.

*Teoría de
Freudenberg*

Estas ideas fueron recogidas veinte años después por FREUDENBERG y GYÖRGY y desarrolladas bajo un punto de vista físico-químico. Como resultado de sus múltiples experiencias, llegan a las siguientes conclusiones: La calcificación tiene lugar en tres fases: la primera, en que el calcio, por un mecanismo de adsorción, se une a la albúmina, para después combinarse con ella, dando lugar a un albuminato cálcico; en un segundo periodo, en presencia de iones PO_4 se formaría un complejo fosfato cálcico-albúmina. Fijaríase en un tercer tiempo el CO_2 y se separaría la albúmina, dando lugar a la combi-

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

nación de fosfato y carbonato cálcico, que es la «sal ósea». La afinidad de las albúminas del cartilago para el calcio, no sería ya para estos autores una capacidad específica, sino que se debería a la naturaleza ácida del mismo, y ésta estaría ligada al pH de tal manera, que con un pH bajo (menor que 4) la fijación de iones Ca por la albúmina no tiene lugar. Las sustancias «frenadoras» de la calcificación, serían fundamentalmente los productos de desintegración albuminoidea (urea, sales amoniacaes, guanidina, etc.), es decir, una serie de sustancias químicas de diversa composición, pero en las que prevalecerían los productos metabólicos con grupos terminales amínicos. Lo fundamental, por tanto, en las ideas de FREUDENBERG y GYÖRGY, es el orden cronológico de fijación de iones que sería Ca, PO_4 y CO_2 y el haber demostrado fisico-químicamente la causa de la afinidad de las albúminas del cartilago, para fijar Ca. Por lo demás, esta teoría no constituye sino una sistematización de las ideas de PFAUNDLER.

Tiene en contra el hecho clínico de que precisamente en aquellos sitios en los que las condiciones de vascularización son precarias o en los que existen procesos de autólisis orgánica (foco de fractura, procesos inflamatorios crónicos, lesiones traumáticas de los tejidos, etc.), es donde con mayor facilidad ocurre la calcificación, a pesar de liberarse gran cantidad de restos proteínicos que inhiben la calcificación *in vitro*.

RABL, por su parte, discutió la combinación del calcio con la albúmina, ya que consigue por medios microquímicos, tratando tejidos en período de calcificación (que no mostraban microscópicamente signo alguno de la misma) por oxalato amónico, la obtención de cristales de oxalato cálcico, lo que indica que el calcio se encontraba en forma iónica.

La teoría de la precipitación tuvo su primer defensor en HOFMEISTER, quien estudió las modificaciones en el contenido en CO_2 de la linfa, observando que la precipitación estaba en razón inversa de la tensión de CO_2 en esta última. KLEINMANN estudió las diversas formas como se encuentra el Ca en el suero y en los tejidos. Explicó la capacidad del cartilago para fijar Ca, como una propiedad completamente análoga cualitativamente a la conocida conducta de los cuerpos albuminoideos desplazados de su punto isoelectrico en sentido ácido, de fijar

caciones, y que se presenta en menor grado también en el tejido conjuntivo. Comprobó así mismo la constitución de la «sal ósea» que sería un compuesto del tipo del apatito..

*Estado de Ca y P
en suero*

Nos interesa reproducir brevemente sus investigaciones sobre el estado en que se encuentran el Ca y P en el suero. Según las clásicas experiencias de los investigadores americanos HOLT, LA MER y CHOWN, se suponía que el suero contenía en solución sobresaturada los fosfatos y carbonatos cálcicos. Estos autores agitando suero estéril con fosfato tricálcico, observaron que disminuía el contenido de P y Ca del suero. Supusieron por tanto que estos se hallaban en solución sobresaturada. Ulteriores experiencias de HASTINGS, SENDROY y MURRAY demostraron que efectivamente el calcio del suero disminuía al agitar éste con fosfato tricálcico, pero analizando el precipitado se encontraron con que el calcio se precipitaba en forma de carbonato y no de fosfato, por lo que no se podía admitir la sobresaturación del suero con los iones PO_4 y Ca. En análogas experiencias KLEINMANN ha demostrado que esta pérdida de Ca del suero sólo ocurre al ponerlo en contacto con fosfato tricálcico, pero no se produce cuando se realizan estas experiencias con otras sales cálcicas, como el carbonato cálcico u otros cuerpos insolubles, como debería ocurrir si el Ca y P estuviesen en el suero en solución sobresaturada. En cambio observa la disminución de la tensión de CO_2 y el aumento de la acidez del medio consiguiente. Por otra parte, la pérdida de Ca del suero, era directamente proporcional a la cantidad de fosfato tricálcico añadido, y lo mismo, la pérdida de CO_2 y el aumento de P. Repitiendo las experiencias en suero Ringer (para excluir la influencia de las albúminas) llega a análogos resultados, de modo que no cabe pensar con KLINKE en la adsorción del fosfato tricálcico por un compuesto coloidal de naturaleza desconocida. KLEINMANN interpreta estos hechos en el sentido de que el fosfato tricálcico por un mecanismo de adsorción por intercambio toma iones CO_3 de la solución y cede iones PO_4 . Se produce secundariamente un aumento de la concentración de hidrogeniones y el Ca se combina con los iones PO_4 cedidos a la solución. Cuando la concentración de éstos es mayor que el producto de solubilidad del fosfato tricálcico (que como es sabido es muy pequeño), tiene lugar la precipitación.

*Ideas de
Kleinmann*

Existen, por lo demás, otras pruebas de que el Ca y P no

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

están en solución sobresaturada en el suero, como el hecho demostrado por KLINKE de que tras la congelación y fusión del suero, el contenido de Ca permanece invariable, siendo así que sabemos que cuando se congela una solución sobresaturada se precipitan todas las sales, que luego al fundirse sólo se disuelven con arreglo a sus productos de solubilidad. Se ha objetado que la presencia de albúminas desvirtuaría esta experiencia tan concluyente, por formarse sistemas complejos, sobre lo que no vamos a insistir aquí.

En los tejidos, según KLEINMANN, puede encontrarse el Ca en las más diversas formas, tanto en soluciones saturadas, como sobresaturadas, en forma coloide y como combinación albuminoidea.

KLEINMANN parte de la base de la sobresaturación del plasma con los elementos minerales y admite un origen común tanto para la calcificación normal, como para las calcificaciones distróficas. La formación del primer cristal coincidiendo con la destrucción autolítica de los tejidos, la explica KLEINMANN por la circunstancia de que estos tejidos por su naturaleza más ácida son capaces de fijar más calcio. En toda autólisis tiene también lugar la liberación de fósforo. Un aumento de la concentración de ambos iones por encima del producto de solubilidad, dará lugar al primer cristal sobre el que se precipitarán continuamente Ca y P del suero por el mecanismo de presencia de fosfato tricálcico expuesto más arriba.

No cabe duda que es sugestiva y bien fundada la teoría de la precipitación; sin embargo, según ella, ésta debería ocurrir continuamente sin más límite que el de las modificaciones de las concentraciones de Ca y P en suero, o de la reacción del medio. Por otra parte resulta difícil imaginar que esta precipitación química ocurra precisamente en aquellos tejidos que normalmente se calcifican (en la osificación normal) y no indiferentemente sobre todos aquellos puntos en que tuviese lugar la sobresaturación. Por lo demás, KLINKE ha objetado en contra, que la relación química $Ca : P : CO_2$ en experiencias de precipitación, no coincide con la relación de estos productos en las cenizas óseas. Además, para que esta precipitación tenga lugar con arreglo a las relaciones en que se encuentran en las cenizas óseas, es necesario un desplazamiento considerable del pH (6'5 a 6'7) que exigiría una tensión de CO_2 muy intensa

no comprobada hasta el presente (1927). Y finalmente está por comprobar que el plasma sea una solución sobresaturada.

*Ideas de
Robinson*

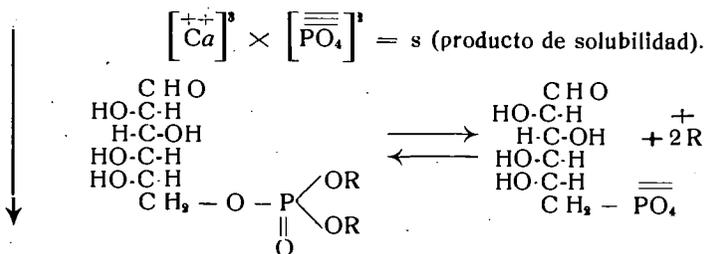
Las experiencias de ROBINSON en 1923, sobre el comportamiento del éster exosamonofosfórico en presencia de varias encimas, utilizando las sales cálcica y bária de este éster (ambas muy solubles en el agua) y estudiando la hidrolisis de las mismas por la precipitación del correspondiente fosfato cálcico y bário, le sugirió la idea de que el mecanismo de la calcificación fuese un proceso fermentativo análogo. Investigó los huesos en período de crecimiento de animales jóvenes, y se encontró con que los extractos obtenidos de estos huesos eran capaces de hidrolizar el exosamonofosfato, el glicerofosfato sódico y otros esteres de tipo similar. Halló por otra parte esta encima en las diáfisis de huesos largos de diversos animales y humanos en período de osificación. Para estudiar la relación de este fermento con el comienzo de la osificación de cartílagos y huesos, estudió el contenido del mismo en las distintas partes del esqueleto de un feto humano de cinco meses y medio. Fueron disecados separadamente y fragmentados en diversas porciones, la diáfisis osificada, el cartílago epifisario en el que no existían centros de osificación y la zona de transición entre ambos territorios. Los resultados del estudio separados de cada una de estas porciones, mostraron que la mayor capacidad hidrolítica la poseían la diáfisis osificada y la unión de la diáfisis con la epífisis, mientras que el resto del cartílago epifisario era inactivo (este cartílago, sólo se osifica del tercero al cuarto año de la vida extrauterina); el centro de osificación de la rótula de un niño de seis años era muy activo, mientras que el resto de la rótula no hidrolizaba el glicerofosfato, etc..., en una palabra: que existía una relación clara, entre el contenido del fermento y la osificación; de manera que vino a concluir que la aparición del fermento iba ligada a las actividades que conducen a la formación de hueso».

Como hemos visto más arriba, del balance de las experiencias sobre las formas en que se encuentra el Ca y P en el suero, no se puede afirmar que éstos se encuentren en solución sobresaturada, pero aunque así fuese como dice ROBINSON, no basta la condición de sobresaturación del plasma para explicar el depósito *selectivo* de sales cálcicas, sobre todo en los luga-

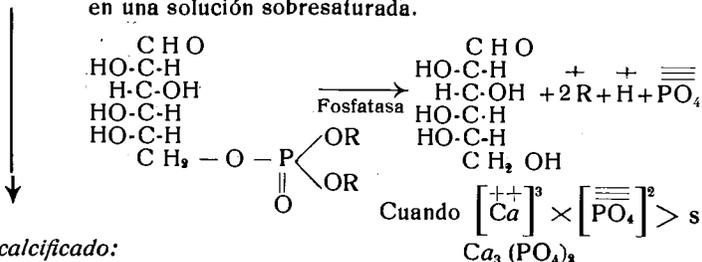
BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

res en que tiene lugar normalmente la calcificación (cartilago hipertrófico, tejido conjuntivo del callo de fractura, etc.). Hay que tener en cuenta, que en los huesos se trata de procesos de precipitación y reabsorción de sales cálcicas que se realizan continuamente, dominando el segundo cuando el organismo por condiciones locales (fractura) o generales (embarazo, etc.), necesita utilizar estos depósitos; hecho que parece indicarnos la existencia de un equilibrio móvil entre el hueso calcificado y el plasma, análogo al que existe entre un sólido y su solución saturada. Existen en el plasma esteres fosfóricos (según los datos recientes de RAPPAPORT, de dos a cinco miligramos por ciento), si estos esteres se difunden por el cartilago y tejido osteoide y allí son hidrolizados por la fosfatasa ósea contenida en las células que van a calcificarse, se producirá un estado de sobresaturación local y sobrevendrá la precipitación. Tal era la teoría primitiva de ROBINSON de la calcificación, que tendría lugar con arreglo al siguiente esquema: (suponiendo para mayor claridad, que el éster fuese el exosamonofosfato y la sal ósea el fosfato tricálcico).

Plasma sanguíneo: Solución saturada de sal ósea



Tejido fluido (tejido conjuntivo del callo, tejido osteoide). Por la acción de la fosfatasa sobre los esteres fosfóricos se transforma en una solución sobresaturada.



Tejido calcificado:

Fase sólida que se deposita.

En el proceso de la consolidación de las fracturas en el que a consecuencia del trauma, por las destrucciones de los tejidos y por la organización del hematoma son liberadas grandes cantidades de esteres fosfóricos, en cuanto la reacción del medio es favorable, podrían ser desarticulados por la fosfatasa y nos explicarían el origen del fósforo necesario para la consolidación. Sólo los esteres fosfóricos contenidos en el hematoma de fractura, que han sido estudiados recientemente por E. FREUDENBERG, constituyen una reserva considerable de fósforo y la «llave que abre este depósito de P, es la fosfatasa» (FREUDENBERG).

Calcificación
in vitro

En sus experiencias de calcificación *in vitro* de epífisis de ratas raquíticas (1), demostró ROBINSON la acción de la fosfa-



FIG. 1

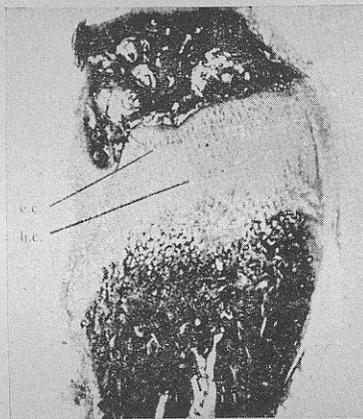


FIG. 2

tasa. Introdujo las dos mitades de la misma epífisis en soluciones de exosamonofosfato cálcico y fosfato monocálcico respectivamente, durante diez y seis horas a 37°. Los resultados pueden verse en las Figs. 1 y 2 tomadas de ROBINSON (en negro aparece la zona calcificada). En la primera, la calcificación del cartilago hipertrófico es completa y queda respetada la porción del cartilago de células pequeñas que no se cal-

(1) Estas tienen una gran actividad de fosfatasa (ROBINSON, DEMUTH).

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

cifican normalmente, no así en la segunda en que es menos intensa la calcificación y tiene lugar indiferentemente sobre todo el cartilago. Las objeciones hechas por SHIPLEY a estas experiencias, negando la participación de la fosfatasa en la osificación, no han resistido una crítica ulterior (ROBINSON).

Sin embargo, no deja de llamar la atención, que existan fosfatasas en otros órganos (riñón, hígado, etc.), en los que normalmente no se producen calcificaciones. Existen pues, otros factores, que impulsan a la precipitación en aquellas zonas en que merced a la hidrólisis fosfatásica, se ha producido un estado de sobresaturación local. Entre ellos, considera BUCHER como uno de los más importantes (aparte de la reacción del medio), la «naturaleza cristalina» de las fibrillas del tejido osteoide, constitución que ha sido demostrada recientemente en estudios por el método de interferencias con rayos X; cuestión de la que no podemos ocuparnos aquí (1). Existe un espectrograma normal y patológico del callo óseo que nos indica la orientación de los cristales (HENSCHEN).

En resumen, la teoría de ROBINSON nos ofrece una posibilidad muy sugestiva para explicar la selectividad del mecanismo de calcificación. Esta cuestión de la actividad de fosfatasa en el callo de fractura humano y su calcificación ha sido quizá la menos investigada, y a ello hemos dirigido nuestros modestos estudios.

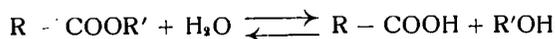
(1) Gracias a los trabajos de HENSCHEN y colaboradores ha quedado demostrada la estructura cristalina no sólo de la «sal ósea», sino también de los fascículos colágenos, que normalmente se ordenan en cadenas micelares de forma helicoidal, alrededor de un eje longitudinal de rotación. Amorfo, no quiere decir caótico o sin ordenación. Precisamente estos fascículos colágenos se orientan en forma parecida a la de los metales más resistentes a la tracción. A este tipo de patología de la ordenación cristalina, le ha dado el nombre HENSCHEN de Leptopatología, y adquiere cada vez más extensión y nuevas perspectivas. Por otra parte, los coloides constituyen sus formaciones micelares fasciculares en el sentido de la mayor tracción, y el fosfato cálcico, se precipita en los puntos sometidos a mayor presión. Salta a la vista el interés que estos fenómenos físicos pueden tener, respecto a su influencia sobre la bioquímica celular y la regeneración de las fracturas.

IV

BIOQUÍMICA DE LAS FOSFATASAS

DADA la confusión que reina en la literatura acerca de la naturaleza y acción de las fosfatasa en el organismo, hemos creído imprescindible resumir brevemente algunos datos generales, sobre la naturaleza, clases de fosfatasa, factores que regulan su actividad, etc., refiriéndonos naturalmente, a los puntos de vista que nos interesan para nuestro trabajo.

Las fosfatasa son fermentos del grupo de las esterasa y éstas son aquellos fermentos que catalizan la reacción



Despliegan las fosfatasa una acción que bien puede ser según las circunstancias de descomposición de los esterfosfóricos, como de síntesis de los mismos. Se trata de fermentos extraordinariamente repartidos en la economía animal y humana, a los que se les atribuye diferentes funciones. Desde los trabajos de ROBINSON a que nos hemos referido en el capítulo anterior, sabemos que participan predominantemente en el proceso de la osificación, y ya hoy, se atisba su papel junto con otros fermentos en diversos procesos vitales (respiración, glucolisis sanguínea, contracción muscular, etc.).

Una de las características fundamentales es la de su ubicuidad. Desde trabajos clásicos se conocía el poder hidrolizante

de ciertos extractos de tejidos sobre los esteres monofosfóricos del azúcar y se estableció un orden de actividad: riñón, hígado, bazo, páncreas. ROBINSON mostró que el contenido de fosfatasa en hueso y diente, era muy superior al de los otros órganos, sobre todo, en los animales en crecimiento.

Clases de fosfatasas

Según nuestros conocimientos actuales, debemos distinguir en el organismo, por lo menos, tres fosfatasas de la misma especificidad (1). (Esta especificidad viene condicionada fundamentalmente por la reacción del medio en que tienen su óptimo de actividad las diversas fosfatasas). La más abundante en el organismo tiene su óptimo de actividad con un pH alrededor de 9, y a ella pertenecen las fosfatasas ósea, renal y la del suero, que son las que nos interesan bajo nuestro punto de vista. Existen además las fosfatasas hepática, pancreática y del bazo, que tienen su óptimo de actividad en medio más ácido. ROBINSON y SOAMES encontraron otra fosfatasa en los eritrocitos que actúa en medio ácido (pH 6) y que ha sido bien estudiada por ROCHE en los eritrocitos del caballo. Han sido descritas además otras fosfatasas que actúan en medios todavía más ácidos, las llamadas por BAMANN y RIEDEL «liofosfatasas» grupo que no parece estar todavía bien caracterizado (ALBERS). Existe fosfatasa en la orina (KUTSCHER), en la piel (WOHLGEMUTH), en las glándulas salivares, músculo (BRUGSCH).

Factores que modifican su actividad

Aparte la reacción del medio que regula la actividad de las diversas fosfatasas, existen factores que inhiben esta actividad y otros que la favorecen. La influencia de los elementos minerales del suero es diversa, el K es indiferente, el Fl actúa *in vitro* inhibiendo (AUHAGEN, LIPMANN); en cuanto al Mg parece que inhibe la calcificación *in vitro* (ROBINSON) y en cambio aumenta la hidrolisis de los esteres (ERDTMANN). Como ocurre con otras encimas, la actividad de fosfatasa se influye por la presencia de sus productos de hidrolisis; el ácido fosfórico liberado actúa inhibiendo la actividad y no los otros productos de hidrolisis que son indiferentes (glucosa, fructosa, glicerol, etcétera). Al llegar a cierta concentración de iones PO_4 la acción de la fosfatasa queda completamente inhibida. Si estos iones PO_4 se combinan (con sales cálcicas, etc.), vuelve otra vez a

(1) La especificidad de las fosfatasas es cuestión actualmente muy en litigio (véanse los trabajos de JAKOBSON, BAMANN y RIEDEL).

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

actuar la fosfatasa, hasta alcanzar la concentración iónica que limita la actividad y así sucesivamente. He aquí un mecanismo por el que se podrá producir o no la calcificación según que la concentración iónica del P, necesaria para inhibir la actividad de fosfatasa sea o no inferior en presencia de iones Ca al producto de solubilidad del fosfato o carbonato cálcicos. Esta inactivación de la fosfatasa por los iones PO_4 se debería a la formación de un compuesto fosfatasa-fosfato muy estable, inactivo (ROBINSON); esta explicación sin embargo, parece poco probable a BAKWIN y BODANSKY, ya que aumentando la concentración de PO_4 consiguen que continúe la hidrólisis a mayor concentración de encima.

Es notable el efecto que ejercen los esteres fosfóricos modificando las condiciones de inhibición de ciertas sustancias para la calcificación; p. ej., ésta tiene lugar en presencia de cianuro potásico, cloroformo, etc., con esteres fosfóricos, y no, con concentraciones análogas de fósforo inorgánico.

La hormona paratiroidea, actúa inhibiendo la actividad de fosfatasa *in vitro* (PAGE) y en contraposición con esto, en el hiperparatiroidismo existe hiperfosfatemia (BODANSKY y otros). Los rayos Röntgen, disminuyen la actividad de la fosfatasa ósea (REGEN y WILKINS).

Enfermedades en las que se modifican los valores de fosfatemia. — Existe hiperfosfatemia en el raquitismo (KAY, BODANSKY, SMITH-MAIZELS, STERN y WARWEG, etc.), en la osteomalacia, en la osteítis fibroso-quística (BODANSKY), en la tuberculosis osteoarticular (KOLDAYEW), en las artrosis (JIMÉNEZ-DÍAZ), en las metástasis óseas cancerosas (FRANSEEN), de las enfermedades no óseas, en las ictericias mecánicas, hipertiroidismo, etcétera (BODANSKY). Existe hipofosfatemia en los estados caquéticos, anemias, etc. Por tanto, han de excluirse estas enfermedades para estudiar las modificaciones de fosfatemia en fracturados.

Métodos de determinación de fosfatasa en suero y tejidos. — Todos ellos se fundan en el mismo principio, es decir, mantener el suero o el extracto de tejido durante un cierto tiempo en incubación a 37° con un éster fosfórico, bajo una reacción de medio constante y óptima. Se han empleado diferentes substratos y amortiguadores; de los primeros, el más corriente es el β glicerofosfato (BODANSKY), el difenilfosfato

disódico (KING y ARMSTRONG); de los segundos, la glicocola (JENNER y KAY) y el veronal sódico (BODANSKY). KAY ha estudiado las variaciones que se producen en la hidrólisis del α y β glicero-fosfato y glicerofosfato desconocido, encontrando diferencias notables. En la segunda parte damos nuestra opinión a este respecto. El método de KAY que ha sido el utilizado más generalmente hasta ahora, ha sido severamente criticado por BODANSKY. Según este autor, la incubación de cuarenta y ocho horas daría lugar a un retardo de hidrólisis. En cuanto al uso de la glicocola, ésta inhibe la actividad de fosfatasa como otros aminoácidos (BODANSKY); sin embargo, en contra de esta inhibición de la fosfatasa se expresa recientemente ALBERS. Nosotros carecemos de experiencia del método de KAY, ya que hemos utilizado el de BODANSKY, con algunas modificaciones. Para determinaciones en tejidos, emplean BAKWIN y BODANSKY, glicero-fosfato sódico al 3 por 100, al que añaden veronal suficiente para que el pH sea 8'6. Parece sin embargo, que la concentración del sustrato, es hasta cierto punto independiente de la velocidad inicial de hidrólisis del fermento (ALBERS).

El sustrato de BODANSKY para fosfatasa en suero, es una solución de glicerofosfato sódico al 0'5 por 100, con veronal sódico al 0'424 por 100, que tiene un pH 8'6.

Métodos de obtención de fosfatasa.—MARTLAND y ROBINSON la obtuvieron a partir de epífisis óseas de ratas raquíticas que mantienen en lisis en agua clorofórmica; por precipitación de los autolisados con éter y desecación del precipitado. Se obtienen así extractos poco activos, a lo sumo 0'5 U/mg., por la gran cantidad de impurezas que inhiben la actividad, principalmente los productos de hemólisis y el alto contenido en P.

ERDTMANN, parte de material renal y hace las autólisis con toluol, obteniendo del lisado extractos más activos (1'2 U. por c. c.). Sin embargo, el toluol no impide que pase al lisado la hemoglobina, y P contenido en los hematíes que disminuye la actividad. Para evitar este inconveniente, muy recientemente ALBERS utiliza, como medio para el lisado, la mezcla de toluol y éster acético en medio alcohólico. El éster acético impide el paso al lisado de los productos de hemólisis, e impide al mismo tiempo que pasen al mismo albúminas de grandes moléculas (este dato tiene gran interés para nosotros, que preparamos la fosfatasa según este método para inyectarla a conejos, puesto

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

que con los otros preparados nos hubiera sido necesario desensibilizarlos antes). ALBERS, en experiencias de precipitación fraccionada a diversas concentraciones de alcohol, obtiene extractos de la mayor actividad, cuando la concentración del alcohol en el lisado, es de 56 a 62 por 100. Los preparados obtenidos tienen una actividad alrededor de 6 U/mg.; es decir, que son diez veces más activos que los preparados más puros obtenidos por MARTLAND a partir de material óseo.

Expresión de la actividad.—No está todavía unificada la manera de medir la actividad del fermento, de modo que cada autor emplea una expresión de la «unidad» de fosfatasa, y la confusión es enorme. MARTLAND, ROBINSON y ALBERS, consideran la unidad de fosfatasa como el equivalente a la actividad de la misma, que de una solución de glicerofosfato sódico en una hora, libera 0.1 mg. de P a 37°, bajo un pH 8.6. Para expresar la actividad de los preparados del fermento, emplean los primeros autores la letra F, que es igual a los mgs. de P liberados en las condiciones expuestas anteriormente, durante una hora partido por los miligramos en peso seco del fermento. Nosotros empleamos una misma unidad para designar la actividad de fosfatasa, tanto en suero, como en tejidos. Empleamos la unidad de BODANSKY para el suero; es decir, que consideramos como unidad de fosfatasa al equivalente de la actividad necesaria para liberar de una solución de glicerofosfato sódico, durante una hora a 37° y bajo un pH 8.6, un mg. de P. Las determinaciones en tejidos, las referimos a gramo de sustancia; las de suero, a unidades por ciento, y las del fermento obtenido por nosotros, a unidades por miligramo.

SEGUNDA PARTE

(Labor personal)

V

METÓDICA

RESUMEN Y FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA NUESTRAS EXPERIENCIAS. RESULTADOS

1.º *Investigación de fosfatasa en suero.*—Hemos utilizado el método de BODANSKY con la modificación de determinar el P inorgánico, según BELL-DOISY, en lugar de hacerlo según KUTTNER-LICHTENSTEIN.

Hemos procedido de la manera siguiente: Extracción con jeringa seca de 15 a 20 c. c. de sangre de una vena de la flexura del codo, procurando evitar al hacer la extracción la estancación venosa. Colocamos la sangre en un tubo de centrifuga perfectamente limpio y seco (para evitar la hemolisis), tapamos el tubo y esperamos de 15 a 30 minutos a que rezume el suero. Centrifugamos durante 5 minutos y separamos el suero del coágulo aislándolo del aire mediante una capa de 2 cms. de espesor de éter de petróleo lavado. En un tubo ancho de centrifuga, colocamos 20 c. c. del substrato de BODANSKY y 2 c. c. de suero, y le añadimos éter de petróleo para que forme una capa aisladora. En otros dos tubos de la misma capacidad, colocamos 20 c. c. del substrato (control del substrato) y otros 20 c. c. del substrato y 2 c. c. de suero. Los 2 primeros tubos, convenientemente tapados, los

llevamos a la estufa a 37° en donde les mantenemos por espacio de una hora. El último, lo defecamos inmediatamente con 8 c. c. de ácido tricloracético al 10 por 100. Esperamos 10 minutos a que se aglutine el precipitado y lo centrifugamos durante 15 minutos. Del líquido sobrenadante claro tomamos 15 c. c. y determinamos P inorgánico según BELL-DOISY. En los tubos incubados, en el de control del substrato, investigamos cualitativamente con ácido molibdico, hidroquinona y la solución de carbonato con sulfito sódicos, la existencia de P inorgánico. En caso positivo (substratos viejos hidrolizados o no bien aislados del aire), preparamos de nuevo el substrato y anulamos los resultados obtenidos. El tubo incubado substrato, más suero, le defecamos con 8 c. c. de ácido tricloracético y procedemos análogamente para la determinación de P inorgánico. Para la comparación colorimétrica preparamos varios testigos de diferentes concentraciones (ordinariamente 5, 10 y en algunos casos 15 c. c. de la solución de KH_2PO_4 (1) diluida en la que 1 c. c. equivale a 0'005 mgs. de P) y comparamos colorimétricamente con el colorímetro de Dubosque, con el testigo más aproximado al problema, procurando que la diferencia de color entre ambas soluciones no sobrepase 10 divisiones del colorímetro. La diferencia entre el contenido de P inorgánico por ciento del problema menos el que contiene el tubo testigo no incubado en miligramos por ciento, nos da en unidades por ciento el valor de actividad de fosfatasa en suero.

Las determinaciones hay que hacerlas antes de las 6 horas a lo sumo, de haber extraído la sangre, para evitar los aumentos de fosfatasa en sueros conservados. Nosotros la hemos realizado casi siempre inmediatamente. Los enfermos en ayunas, para evitar las modificaciones postprandiales de fosfatasas en suero.

Con objeto de evitar la alteración que se produce rápidamente de las soluciones de ácido molibdico, que se manifiestan porque sus soluciones toman un color amarillento verdoso, nosotros preparamos solución de molibdato amónico y de hidroquinona con ácido sulfúrico, con objeto de que se forme el ácido molibdico en el momento de hacer la determinación.

En algunos casos, hemos hecho determinaciones comparativas investigando directamente P inorgánico en suero, según BELL-DOISY, y fosfatasa con arreglo a la técnica detallada más arriba, obteniendo valores sensiblemente iguales, siempre que se comprueba la no hidrólisis del glicerofosfato después de la incubación. De este modo se obtienen al mismo tiempo los valores de P inorgánico en suero.

(1) El KH_2PO_4 el de SÖRENSEN, especial para investigaciones sobre encimas.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

El K, lo hemos determinado según KRAMER-TISDALL.

El Ca, según CLARK.

El P inorgánico, como se ha dicho, según BELL-DOISY.

Con arreglo a la misma técnica de fosfatasa en suero, se ha investigado fosfatasa en líquido sinovial (cadáver).

2.º *Determinaciones de fosfatasa P inorgánico y Ca en tejidos.*—La hemos investigado en músculo, callo de fractura, y huesos humanos y de conejo.

Hemos utilizado el substrato de BAKWIN y BODANSKY, bajo un pH 8'6, determinando el P inorgánico en tejidos, según LOHMANN y JENDRASSIK.

Hemos procedido con arreglo al siguiente método:

Los tejidos recién obtenidos de la sala de operaciones, han sido divididos en varias porciones para las diversas determinaciones, y pesados inmediatamente en la balanza de torsión (hay que hacer en seguida las pesadas para evitar la pérdida de peso por evaporación, en este clima muy húmedo; ésta tiene que ser escasa). Antes de pesarlos es conveniente, si están impregnados de sangre (sobre todo el músculo), lavarlos *ligeramente* con suero fisiológico para arrastrar ésta. Las determinaciones de fosfatasa en callo se han hecho dobles y se ha dado el valor medio ya que el callo es un tejido poco homogéneo. Una vez pesados los fragmentos se machacan con arena (músculo); el callo y hueso es preferible primero fragmentarlos. Los colocamos en un Erlenmeyer con un volumen igual a cinco veces su peso de suero fisiológico, y los mantenemos bajo una capa de éter de petróleo, perfectamente tapados, durante 24 horas en el refrigerador a unos 5°. Centrifugamos y tomamos un centímetro cúbico del extracto al que añadimos 10 c. c. del substrato. Otra muestra análoga la defecamos inmediatamente con 4'5 c. c. de ácido tricloracético al 7 por 100 y determinamos P inorgánico según LOHMANN y JENDRASSIK. La primera muestra se la mantiene en la estufa a 37° por espacio de una hora. Tomamos las mismas precauciones que en las determinaciones de fosfatasa en suero, para cerciorarnos de que el substrato no está hidrolizado. La diferencia entre los valores de P inorgánico del problema y los del testigo, nos dan los valores de actividad de fosfatasa que referimos por un sencillo cálculo a un gramo de substancia.

El P inorgánico, en músculo, ha sido determinado según LOHMANN y JENDRASSIK.

El Ca, en sustancia fresca, ha sido determinado calcinando

una porción de los tejidos previamente pesada en la balanza de torsión. Disolviendo las cenizas en HCl, neutralizando con NH₃, precipitando con oxalato amónico, disolviendo el precipitado con H₂SO₄ y valorando con una solución centésimo normal de KMnO₄.

Método de obtención de fosfatasa. — Como la fosfatasa hasta el momento presente, según nuestros informes, no la prepara ninguna casa de productos químicos ni biológicos, tuvimos que prepararla nosotros mismos. Ensayamos el método de MARTLAND y ROBINSON, con el que fracasamos. Aunque hubiésemos conseguido obtener fosfatasa por este procedimiento, dado el escaso rendimiento del método y la poca actividad de los preparados, difícilmente hubiéramos podido emplear éstos para nuestras experiencias. Dada la identidad química de la fosfatasa ósea y la renal (según comunicación por carta de ALBERS), pensamos que el material renal sería el más conveniente para la obtención de fosfatasa. La hemos podido obtener gracias al excelente método recientemente publicado por ALBERS, de obtención de extractos de fosfatasa muy activos.

Hemos procedido con arreglo a la siguiente técnica:

Tomamos 1.250 grs. de riñones de cerdo frescos, a los que les separamos de las aponeurosis y restos grasientos, los lavamos al chorro para arrastrar éstos y los machacamos en una máquina de moler carne, de manera que queden convertidos en una papilla fina. A un kilogramo de esta papilla colocada en un matraz de 2 litros de capacidad, le añadimos 100 c. c. a partes iguales de éster acético y toluol y 1.000 c. c. de alcohol al 50 por 100. Agitamos y mantenemos la mezcla de 4 a 5 días a la temperatura del laboratorio, repitiendo de vez en cuando las agitaciones. Mantenemos el matraz perfectamente tapado durante este tiempo. Pasamos el líquido, al cabo de los 5 días por un lienzo para separar las partes más groseras de la papilla renal y lo filtramos. La filtración transcurre así rápidamente. El líquido procedente de la filtración tiene un color amarillo oro con una hermosa fluorescencia verde (debido según EULER al gran contenido en flavinas). Al volumen del líquido filtrado le añadimos alcohol de 96° hasta que la concentración de alcohol en el lisado sea de un 65 por 100, lo que comprobamos por medio de un alcoholómetro). Entonces se produce una precipitación gelatinosa. Tapamos el matraz y dejamos una noche el precipitado para que se aglutine. Para recogerlo nos fué preciso centrifugar en pequeñas porciones, ya que si se decanta se pierde bastante

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

y por filtración (como dice ALBERS), nosotros no pudimos recoger el precipitado por pasar a través del filtro. Esto es lo único que resulta un poco laborioso. Lavamos el precipitado una vez con alcohol y otra con éter, centrifugando cada vez y lo extendemos sobre vidrio de reloj de manera que forme una gran superficie, colocándolo en el desecador de sulfúrico a vacío. A las 48 horas, suele estar completamente seco, recogemos el polvo pardo que queda y lo colocamos en un tubo estéril en donde lo conservamos.

Experiencias en conejos.—Hemos practicado osteotomías a conejos con arreglo a la siguiente técnica:

Sujeto el conejo a la mesa de experimentación y previa depilación de la pata correspondiente (pata anterior), le embrocamos con iodo. Colocamos paños asépticos y practicamos una pequeña incisión de unos 2 centímetros en tercio medio de la cara dorsal del antebrazo. Separamos los músculos extensores y con un pequeño escoplo osteotomizamos en unos casos cúbito y radio, y en otros solamente el radio. Colocando la pata sobre una almohada, se hace la osteotomía muy cómodamente. Damos un par de puntos de seda (apenas sangra de modo que no hay necesidad de hacer hemostasia), para saturar piel y les colocamos un apósito con una gasa estéril pegada con colodion dejando sitio para poderles inyectar. Les colocamos una férula de alambre para inmovilizarles. La inmovilización no deja de ser un problema, pues los animales se quitan fácilmente la férula, aun fijándola con esparadrapo. Ultimamente hemos tenido que recurrir a ponerles escayolas, dejando en éstas una ventana sobre el sitio de fractura para poder inyectar. No hay que decir que el instrumental debe ser estéril y que hay que tomar todas las precauciones de asepsia. Así hemos conseguido que no se nos infectase ningún conejo. Otros conejos fueron fracturados subcutáneamente para estudiar la diferencia con los fracturados cruentamente.

RESULTADOS

Hemos determinado con el método modificado del de BODANSKY, los valores de fosfatasa en suero en veinticinco sujetos procedentes de diferentes Servicios y afectos de enfermedades que es conocido no influyen los valores de fosfatasa, para conocer las cifras normales. Los resultados pueden verse en la gráfica, fig. 3.

Como se ve, el valor más bajo ha sido el de 1'3 unidades por ciento y el más alto 3'1 U, por 100, con un valor medio

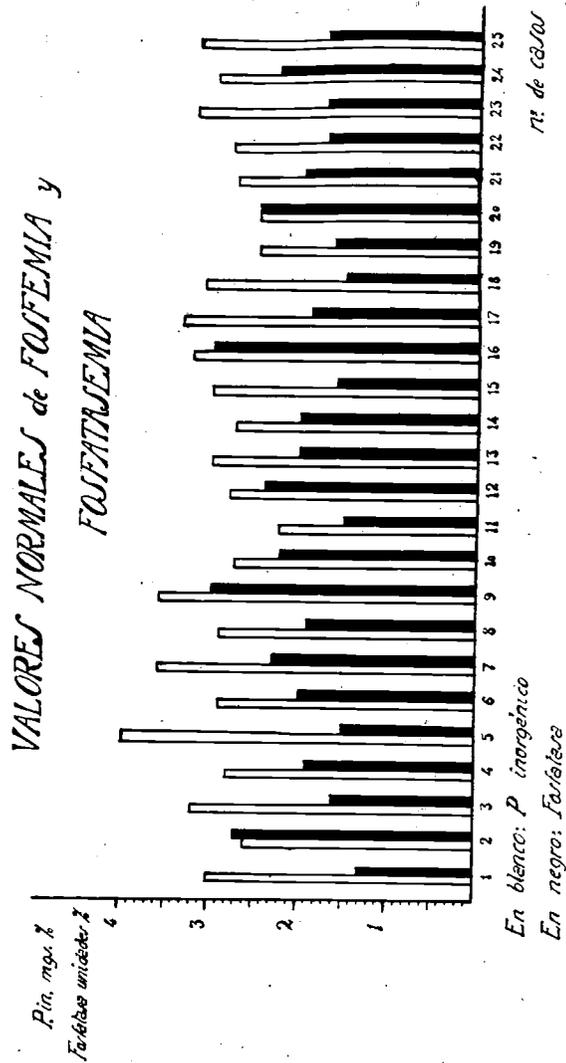


Fig. 3

de 2 U, por 100, que consideramos como el valor normal de fosfatase.

Si comparamos nuestros resultados con los de otros autores, vemos que éstos son muy aproximados a los obteni-

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

dos por BODANSKY, aunque ligeramente más bajos, y distan enormemente de los obtenidos por el método de KAY, fig. 4.

Nosotros hemos empleado glicerofosfato químicamente puro de Kahlbaum y no β glicerofosfato como BODANSKY. Lo mismo

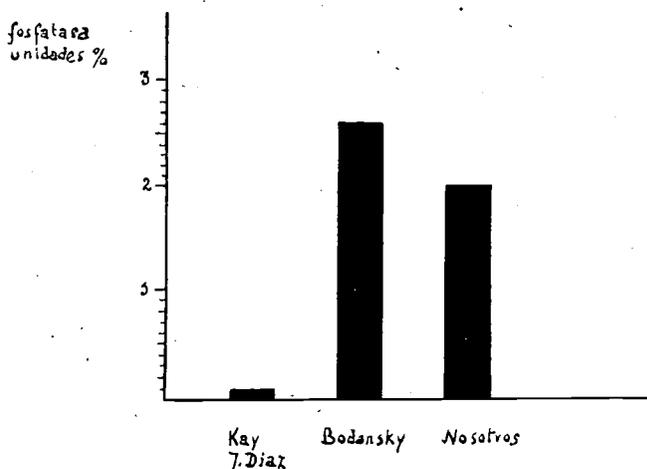


FIG. 4

hacen otros autores de tanta autoridad como RONA y RAPPAPORT, a pesar de las recomendaciones de KAY.

Creemos por lo tanto que el método descrito por BODANSKY con la modificación nuestra, de hacer la determinación de P inorgánico según BELL-DOISY, da resultados muy parecidos a los de BODANSKY y es perfectamente utilizable tanto en la clínica como en la experimentación.

Los resultados medios obtenidos de diversos huesos y músculos normales humanos, los expresamos a continuación:

<u>Músculo</u>	<u>Hueso</u>
0'86 U / grs.	1'3 U / grs.

Los huesos y músculos normales proceden de sujetos amputados por traumatismos y algunos de los primeros de esquirolas óseas de tibia, procedentes de sujetos a los que se les practicó la operación de Albee (ocho huesos y diez músculos).

Por lo tanto, normalmente los valores de fosfatasa en hueso

humano son superiores a los del músculo. Estos valores obtenidos por nosotros en huesos humanos son bastante inferiores a los obtenidos por BOTTERELL y KING, cosa que nos explicamos, ya que estos autores utilizan como substrato el fenilfosfato disódico, que por lo visto se hidroliza mucho más rápidamente. Nos parece más «fisiológico» utilizar el glicerofosfato que se acerca más a los esteres que se encuentran en el organismo.

El método de ALBERS para obtener fosfatasa, nos parece ideal por su sencillez y por su rendimiento. Obtuvimos de un kilogramo de papilla renal, unos dos gramos de un polvo pardo poco soluble en el agua, con el que forma a manera de una emulsión fina, e insoluble en el alcohol y éter. Determinamos el contenido de P inorgánico del preparado de fosfatasa, siendo éste igual a 25 γ /mg. El contenido en albúminas es escasísimo, pues 10 cgs. del extracto no precipitaron con ácido tricloracético. Para valorar su actividad (midiendo la velocidad inicial de hidrólisis), preparamos un substrato como recomienda ALBERS a base de glicerofosfato sódico al 0.15 por 100, empleando como amortiguador una mezcla 1/5 molecular de carbonato y bicarbonato sódicos; preparamos asimismo una solución de SO_4Mg (1) en la que 1 c. c. equivaliese a 1 mg. de Mg; procediendo de la siguiente manera:

10 mgs. de fosfatasa con 10 c. c. de agua destilada de manera que formase una emulsión fina. Tomamos 1 c. c. al que agregamos 30 c. c. del substrato, 5 c. c. del amortiguador y 0,5 c. c. de la solución de SO_4Mg (el pH de la mezcla es según múltiples medidas de MICHAELIS 8, 6). Lo llevamos a la estufa a 37°. Antes de colocar la mezcla en la estufa tomamos una muestra determinando P inorgánico según BELL-DOISY y durante la incubación fuimos extrayendo muestras para determinar P inorgánico a los 15', 30', 45', 60', 180', 240' y 300'. Las cantidades de P inorgánico liberado, las muestra la gráfica, figura 5, que nos indica la velocidad inicial de hidrólisis del fermento y su actividad.

Vemos que 1 mg. de fosfatasa ha liberado en una hora 4,45 mgs. de P inorgánico, observándose una detención de la

(1) Concentración de Mg para que la hidrólisis de la fosfatasa renal se realice en condiciones óptimas.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

hidrólisis desde los 45' a los 60', ésta ha continuado para mantenerse constante de los 180' hasta los 300'.

Esto nos indica que se ha llegado a la concentración de iones P suficiente para inhibir la actividad del fermento. Por tanto, la fosfatasa obtenida por nosotros es capaz de liberar

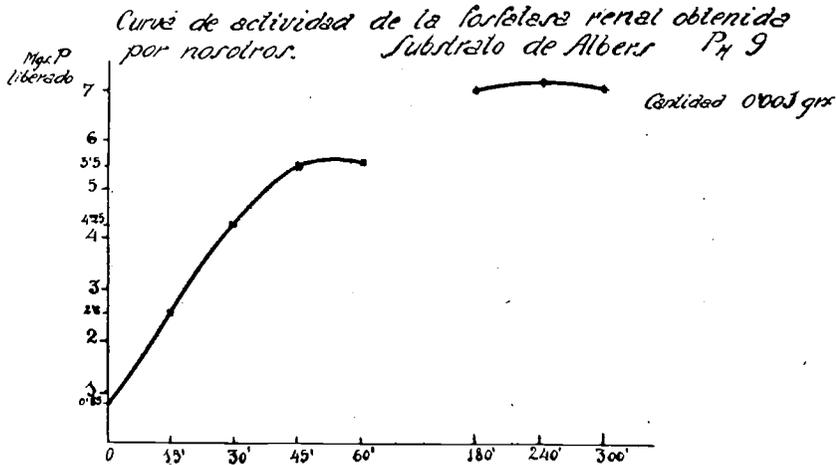


FIG. 5

más de cuatro veces su peso de P inorgánico. Es, por consiguiente, de una actividad ligeramente menor que los mejores preparados obtenidos por ALBERS. Este preparado es el que hemos utilizado en todas nuestras experiencias. Como quiera que estos preparados van perdiendo actividad con el tiempo (un 20 por 100 a las cuatro semanas), hemos tenido que preparar fosfatasa en dos ocasiones, y las dos veces hemos obtenido extractos de actividad sensiblemente análoga.

Hemos realizado las siguientes investigaciones:

1.º Investigación de los valores normales de fosfatasa en suero y tejidos muscular y óseo en la especie humana. Investigación de fosfatasa en líquido sinovial (cadáver).

2.º Investigación de los valores de fosfatasa, calcio, potasio y fósforo inorgánico, en suero de 52 fracturados, en diversos períodos del proceso de consolidación.

3.º Investigación de los valores de fosfatasa y calcio en callos de fractura humanos, en diversos períodos de consolidación. Determinación de fosfatasa y de calcio en músculos perifracturarios.

4.º Estudio experimental de las modificaciones que se producen en la consolidación de las fracturas por la inyección *in situ*, de un éster fosfórico (glicerofosfato sódico) y de fosfatasa renal en el conejo. Estudio de los valores de fosfatasa en callo, y de fosfatasa, calcio y fósforo inorgánico, en músculo perifracturario.

VI

FOSFATASA EN SUERO DE FRACTURADOS: SUS RELACIONES CON LOS ELEMENTOS MINERALES

VALORES DE FOSFATASEMIA, CALCEMIA, FOSFEMIA Y KALIEMIA, DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LAS FRACTURAS

HEMOS visto en lo que antecede, el pequeño número de trabajos y la escasez del material con que se han realizado, en lo que se refiere a las relaciones de fosfatasemia durante la consolidación de las fracturas. Estos no permiten sacar conclusiones respecto a si se producen o no, modificaciones y la significación que pudiesen tener éstas.

Nosotros entendemos que se plantean las siguientes cuestiones:

Primero. ¿Existe alguna modificación en los valores de fosfatasemia durante la consolidación de las fracturas?

Segundo. Coinciden estas modificaciones con la calcificación del callo de fractura, de manera que nos permitan formar un juicio de cómo van a tener lugar la consolidación?

Tercero. ¿Existe alguna relación entre los valores de fosfatasemia y los de los demás elementos minerales en suero durante la consolidación?

Cuarto. ¿Existen relaciones entre los valores de fosfatasa en suero y en callo óseo?

Quinto. ¿Qué significación tienen estas modificaciones?

Para investigar estas cuestiones, hemos determinado los valores de fosfatemia, calcemia, fosfemia y kaliemia en cincuenta y dos fracturados, adultos de 14 a 78 años, durante un período de año y medio, excluyendo aquellos casos en los que pudiese sospecharse una hiperfosfatemia de otro origen (raquitismo tardío, artrosis, ictericia, etc.), se han hecho cuatro determinaciones por término medio: al producirse la fractura, de dos a cuatro semanas, de cuatro a ocho, y de ocho a diez y seis semanas; es decir, hasta que por término medio ha tenido lugar la consolidación. Hemos procurado hacer las determinaciones, coincidiendo con los exámenes radiográficos. Naturalmente, en las fracturas tratadas con escayolas, sólo nos ha sido posible el estudio radiográfico, cuando éstas estaban ya consolidadas, puesto que a través de la escayola no se puede ver si existe o no callo. En cambio, en las tratadas con extensión continua, hemos podido ir comparando la calcificación del callo con las modificaciones de los elementos minerales en suero y fosfataza.

La mayor parte de las fracturas han sido de huesos largos, principalmente diáfisis de fémur y tibia. Las cincuenta y dos fracturas se descomponen en:

Omoplato	2
Húmero	6
Cúbito y radio	3
Colles	1
Pelvis	1
Fémur	13
Rótula	2
Tibia y peroné	17
Maleolos tibioperoneos	7

De ellas han sido intervenidas veinte (2 reducciones cruentas por fractura abierta, 2 fracturas de rótula en que se hizo osteosíntesis, y 16 osteosíntesis en fracturas de tibia con cintas de Parham). No se ha producido ninguna pseudoartrosis en los casos estudiados. Ha habido 3 retrasos de consolidación, 1 de cuello de fémur y otros 2 de diáfisis de tibia y húmero respectivamente. En 5 casos se trataba de fracturas múltiples, 2 casos refracturados y otro en el que se produjeron 2 fracturas consecutivas (cuello de fémur, y a los cinco meses de rótula, cuando la fractura no estaba todavía consolidada).

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

Los valores medios de los cincuenta y dos casos de fosfatasa, calcio, fósforo inorgánico y potasio en suero, los muestra la gráfica de la figura 6.

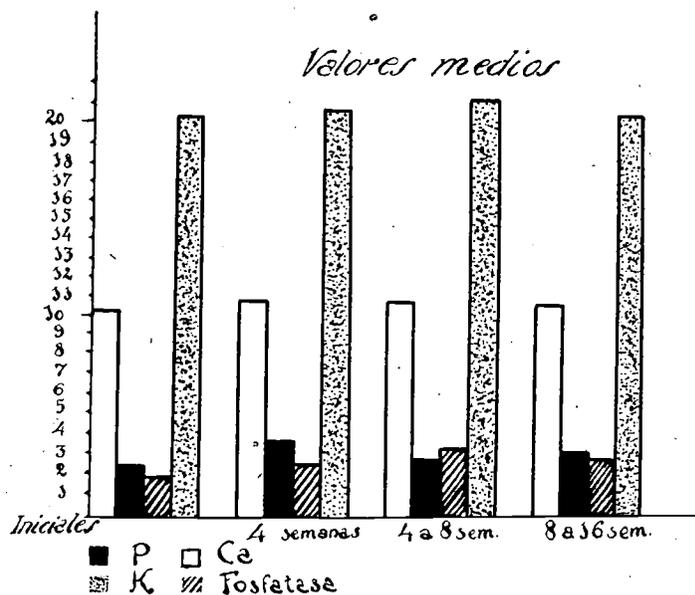


FIG. 6

Vemos que la calcemia y kaliemia muestran una constancia extraordinaria, durante todo el tiempo que dura la consolidación. No ocurre así con los valores de fosfemia y fosfatasa. Los primeros ascienden, alcanzando su mayor valor de la segunda a la cuarta semana, y tienden a descender de la cuarta a la octava semana, permaneciendo ligeramente más elevados que los valores iniciales, cuando ha tenido lugar la consolidación. En cambio, los valores medios de fosfatasa, aumentan de la cuarta a la octava semana, y permanecen elevados, habiendo descendido un poco, de la octava a la diez y seis semana. De todos modos, las modificaciones medias observadas, de los valores de fosfemia y fosfatasa, son ligerísimas.

No hemos encontrado relación alguna entre los valores de fosfatasa y la calcificación, del callo, como afirman que existe HUNSBERGER y FERGUSON, cuyos resultados han sido discutidos por BODANSKY y AUSTONI y COGGI.

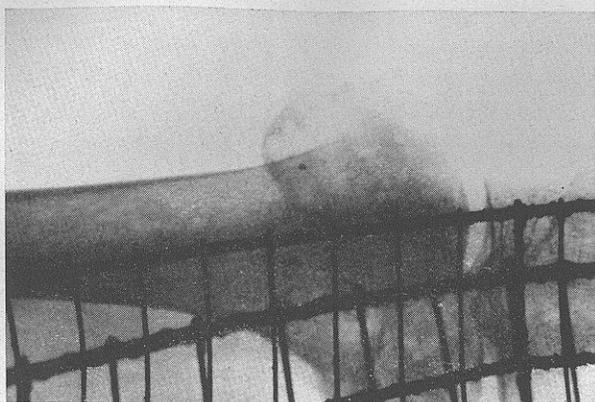


FIG. 8

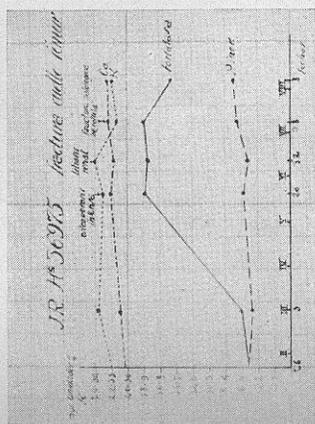


FIG. 9

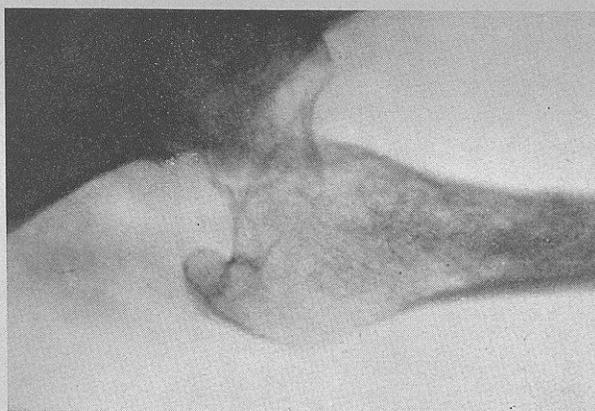


FIG. 7

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO



Fig. 12

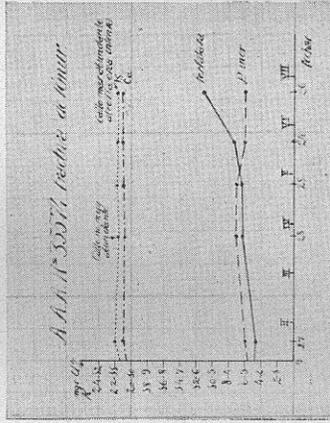


Fig. 11

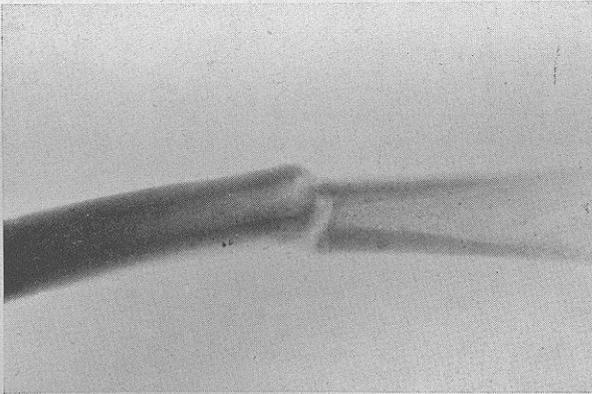


Fig. 10

En un 7,6 por 100 de los casos, hemos encontrado hiperfosfatasemias más intensas; de ellos, en dos casos, se trataba de retrasos de consolidación. En uno de estos casos con hiperfosfatasemia, se presentó ésta cuando el callo estaba ya bien calcificado. En todos estos casos existía una acentuada osteoporosis. Como creemos que ello tiene interés, vamos a comentar brevemente cada uno de estos casos y reproducir las radiografías hechas cuando se encontró la hiperfosfatasemia.

CASO 1.º—J. R. Hombre de 32 años. Historia núm. 36.975.

Ingresa el 24-I-35, con una fractura transcervical de cuello de fémur.

Tratamiento: Escayola a lo Whitman. A los 5 meses se le quita la escayola en dos valvas para hacer radiografía, fig. 7. No se ve callo. Atrofia muy intensa de la cabeza y extremidad superior del fémur. Se inmoviliza nuevamente con escayola. Tres semanas después tiene un cólico nefrítico, expulsa un cálculo y se ve radiográficamente otro en pelvis renal. Coincide esta litiasis con el período de máxima atrofia (caso análogo a los descritos recientemente por BOSHAMER y VOLKMANN de litiasis renal postfracturaria, coincidiendo con intensa osteoporosis). A los siete meses de producida la fractura al intentar movilizar rodilla suavemente bajo anestesia, se fractura la rótula. Obsérvese la intensa osteoporosis de la misma que coincide con el período de máxima hiperfosfatasemia, fig. 8 y 9.

Se ve claramente en este caso, la relación entre atrofia ósea e hiperfosfatasemia.

CASO 2.º—A. A. Hombre de 28 años. Historia núm. 35 574.

Ingresa el 8-VIII-35, con una fractura de tercio superior de diáfisis de fémur.

Tratamiento: Extensión Kirschner. Radiografía a las 7 semanas, figura 10. Callo escaso. No atrofia. Fosfatasemia normal, fig. 11. A los 5 meses, callo abundante y bien calcificado, atrofia de fémur y rótula, fig. 12. Fosfatasemia elevada.

CASO 3.º—J. P. Hombre de 22 años. Historia núm. 37.702.

Ingresa el 21-IV-35. Fractura espiroidea de tibia y peroné.

Tratamiento: Osteosíntesis. A los 2 meses ausencia de callo. Atrofia intensa de tibia. Fosfatasemia elevada, fig. 13 y 14

CASO 4.º—R. B. Mujer de 68 años. Historia núm. 40.019.

Fractura de diáfisis de fémur, tercio medio con tercio inferior.

Tratamiento: Extensión Kirschner. Radiografía 3 meses después.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO



FIG. 13



FIG. 15

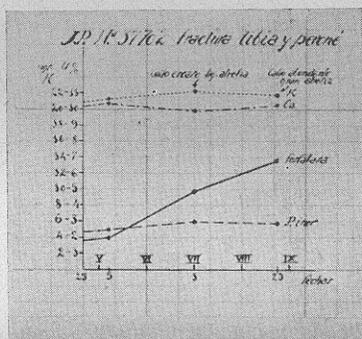


FIG. 14

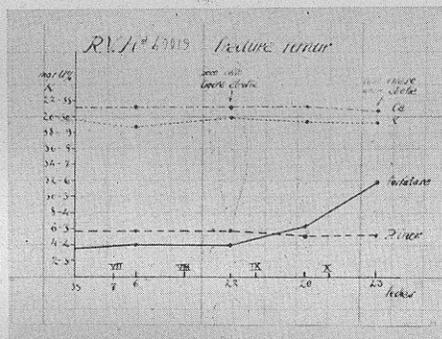


FIG. 16

Callo escaso. Osteoporosis de la extremidad inferior del fémur. Hiperfosfatasemia, fig. 15 y 16

Examinando estos casos, en los que existió hiperfosfatasemia, nos encontramos con que en dos de ellos se produjo un retraso de consolidación; sin embargo, en el caso segundo, los valores de fosfatasa eran normales cuando existía un callo

muy escaso, y en cambio más tarde, se produjo una hiperfosfatemia cuando el callo era abundante y bien calcificado, *coincidiendo* con la atrofia ósea.

Como casos demostrativos de la no existencia de relación entre la calcificación del callo y los valores de fosfatemia, nos parecen demostrativos los dos casos siguientes:

CASO 1.º—E. F. Mujer de 69 años. Historia núm. 38.471.

Fractura tercio inferior de fémur.

Tratamiento: Extensión Kirschner y osteosíntesis. Radiografía



FIG. 17

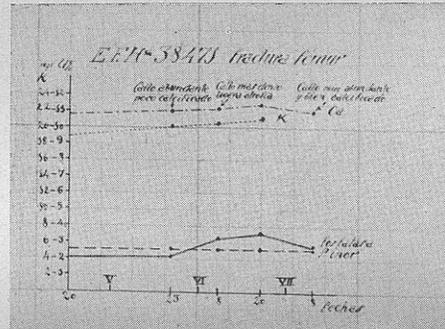


FIG. 18

a los 2 meses, fig. 17. Callo exuberante. Apenas tiene osteoporosis. Fosfatemia normal, fig. 18.

CASO 2.º—R. C. Mujer de 32 años. Historia núm. 40.313.

Fractura de diáfisis de fémur, tercio medio.

Tratamiento: Extensión Kirschner. Radiografía (a los 2 meses), callo moderado bastante denso. No atrofia ósea. Fosfatemia normal, figuras 19 y 20.

Del examen de todos los casos investigados (véase proto-

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

colo), deducimos que durante la consolidación normal de las fracturas, sólo se produce en la mayoría de los casos, una ligera hiperfosfatemia que se presenta cuando generalmente ha tenido lugar la consolidación. En los casos en que ha existido una hiperfosfatemia más intensa, ésta ha coincidido siempre con la existencia de una manifiesta osteoporosis.

Tenemos que admitir por tanto, que esta última está relacionada con la hiperfosfatemia. En los casos de retardo de



FIG. 19

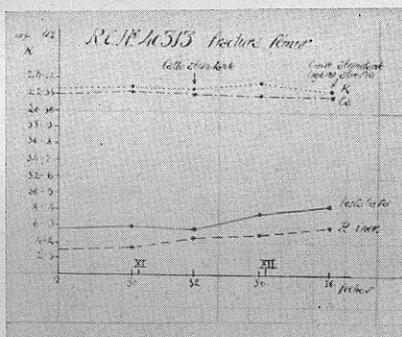


FIG. 20

consolidación, solamente en los que existía atrofia ósea intensa, se ha presentado hiperfosfatemia (dos de ellos), y los valores han sido normales en un caso en el que no existía osteoporosis.

¿Pueden por tanto los valores de fosfatemia darnos un elemento de juicio clínico, de cómo va a tener lugar la consolidación?

Creemos que no, ya que hemos visto formarse callos exuberantes con cifras normales de fosfatemia y retardarse la consolidación, sin que se modificasen éstas. Es decir, que afirma-

mos, la existencia de una independencia entre los valores de fosfatasa y la consolidación.

En ocho casos, hemos hecho investigaciones paralelas de fosfatasa y de fosfatasa en callo, no encontrando relación alguna entre ambos valores. En esto el comportamiento es análogo, al de los elementos minerales en suero y tejidos, que muestran una gran independencia.

No deja de ofrecer serias dificultades, la interpretación de estas hiperfosfatasemias que acompañan a la osteoporosis. Nosotros nos inclinamos a considerarlas análogas a las que ha obtenido BODANSKY y colaboradores, experimentalmente produciendo osteoporosis en conejos mediante la administración de drogas acidificantes (cloruro amónico). Sin embargo, no queremos afirmar, que sea éste el mecanismo por el que se producen, ya que las hiperfosfatasemias las hemos encontrado siempre en un período tardío, en que según el concepto actual del mecanismo físico-químico de la consolidación, parece demostrado que el estado de acidez local ha desaparecido. Es decir, que nos inclinamos a pensar que la hiperfosfatasa acompaña a la osteoporosis, cualquiera que sea el mecanismo productor de la misma (hiperfosfatasemias del hiperparatiroidismo, por ejemplo, etc.). El ligero aumento que se presenta en la consolidación normal lo atribuimos a la atrofia ósea fisiológica de los extremos de fractura, visible o no radiográficamente.

En cuanto al origen de la fosfatasa, esta relación entre hiperfosfatasa y osteoporosis, hace pensar en una movilización de fosfatasa de los depósitos óseos, que tuviese lugar al mismo tiempo que se produce la movilización de calcio, claro que este último no aumenta en la sangre, porque los mecanismos reguladores de la calcemia (paratiroides, sistema nervioso vegetativo...), impiden la modificación de los valores; en cambio la fosfatasa podría tener en este sentido una regulación más «lábil» que permitiese desplazamientos más duraderos. Sin embargo, cuanto digamos respecto al origen y mecanismo de regulación de la fosfatasa en el organismo, no puede pasar de pura hipótesis, ya que no tenemos hechos clínicos ni experimentales en que basarnos; actualmente se desconoce en absoluto cuanto hace referencia al mecanismo de la regulación de la fosfatasa. En este sentido la hiperfosfatasa de las fracturas sería secundaria; es decir, debida simplemente a la descarga

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

en la sangre de la fosfatasa contenida en los depósitos óseos. La participación de otros depósitos fisiológicos de fosfatasa en la producción de hiperfosfatemia (hígado, riñón, etc.), es cuestión no investigada hasta el presente y de la que no nos hemos ocupado.

En cuanto a las relaciones entre los demás elementos minerales del suero y la fosfatasa, durante la consolidación de las fracturas, nos llamó mucho la atención el comportamiento del P inorgánico. Obsérvese que los valores de fosfemia ascienden por término medio, de la segunda a la cuarta semana, y en cambio, en este período, permanecen constantes los de fosfatemia, que ascienden precisamente en el momento en que los valores de fosfemia tienden a descender. Esta disociación de las curvas de fosfemia y fosfatemia aparece a primera vista como algo paradójico. Parece lógico que si la fosfatasa actúa en medios óptimos liberando iones PO_4 de los esteres fosfóricos, el aumento de actividad de fosfatasa tendría que traducirse por la producción de una hiperfosfemia, y sin embargo en la realidad esto no ocurre así, sino que como hemos visto, las curvas de fosfemia y fosfatemia durante la consolidación de las fracturas, marchan completamente independientes y en ocasiones incluso en sentido inverso.

Para explicarnos este hecho, cabe preguntarse dos cosas: ¿La actividad del fermento tal como nosotros la medimos *in vitro*, está en razón directa de la concentración del fermento en el suero?, es decir, ¿a mayor concentración del fermento, la hidrólisis de los esteres es mayor?, ¿o las condiciones en que nosotros practicamos la valoración, añadiendo al suero un éster fosfórico, nos modifican los resultados de lo que ocurre en el mismo?

BODANSKY afirma, que a mayor concentración del fermento, la hidrólisis fosfatásica continúa, aún en presencia de gran cantidad de P inorgánico.

Para cerciorarnos de esto, se nos ocurrió estudiar la acción de la fosfatasa renal a diferentes concentraciones sobre los esteres fosfóricos del suero, sin añadir el substrato como se hace usualmente en las determinaciones de fosfatasa. Es decir, que en este caso los resultados que se obtuviesen, tenían que ser los más aproximados a lo que ocurre en el organismo, ya que incluso el pH en que se desarrolla la hidrólisis es el del

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

suero. Dispusimos la experiencia de la siguiente forma: Tomamos cinco sueros no hemolizados de diferentes sujetos, que distribuimos en diez tubos colocando un c. c. de suero en cada tubo y numerándolos 1 A, 2 A, 3 A, 4 A y 5 A; y otro centímetro cúbico en otros cinco tubos 1 B, 2 B, 3 B, 4 B y 5 B. A estos últimos tubos se les agregó 1, 2, 5, 10 y 15 mgs. de fosfatasa renal sólida. Llevamos todos los tubos a la estufa de manera que actuasen sobre los primeros la fosfatasa contenida normalmente en el suero; y en los segundo, ésta, más la que les habíamos añadido. Después de la incubación durante una hora, determinamos el contenido de fósforo inorgánico de cada tubo. Para saber la cantidad de fósforo inorgánico liberado por la fosfatasa añadida, tenemos que restar el contenido de fósforo inorgánico de la fracción de fosfatasa añadida y el valor de fósforo inorgánico que se encuentre en el suero, al que no se le ha añadido fosfatasa después de la incubación; de los valores de fósforo obtenidos en los tubos a los que les añadimos fosfatasa.

A continuación pueden verse los resultados obtenidos.

TIEMPO DE INCUBACIÓN 1 HORA A 37°. pH EL DEL SUERO

SUEROS	P. inorg. desp. incub. mgs. ‰	Cont. P. inorg. fosfatasa añadida mgs. ‰	Diferencia	P. inorgánico liberado
1 A (control).	4,5			
1 B (1 mg. fosfatasa).	7,5	2,5	5 - 4,5	0,5
2 A (control).	4			
2 B (2 mgs. fosfatasa).	10	5	5 - 4	1
3 A (control).	5			
3 B (5 mgs. fosfatasa).	20	12,5	7,5 - 5	2,5
4 A (control).	5			
4 B (10 mgs. fosfatasa).	32,3	25	7,3 - 5	2,3
5 A (control).	5,2			
5 B (15 mgs. fosfatasa).	45,1	37,5	7,6 - 5,2	2,4

Se observa, por tanto, que conforme vamos aumentando la concentración de fosfatasa en suero, se van hidrolizando los esteres fosfóricos, hasta un cierto límite (en nuestra experiencia

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

a los 5 mgs. equivalente a 27 U.); a partir del cual los valores de P inorgánico permanecen constantes; como consecuencia de ello, deducimos que efectivamente la hidrólisis fosfatásica es *hasta un cierto límite*, proporcional a la concentración de encima en el suero. Este límite podría estar condicionado o por la concentración alcanzada por el P inorgánico en el suero, que llegaría a inhibir la actividad de fosfatasa (en este caso 20 mgs. por 100) o porque el depósito de esteres fosfóricos del suero llegase a agotarse. Esta segunda hipótesis podría ser probable, ya que sabemos que la fosfatasa ósea (y lo mismo podemos pensar de las fosfatasas de la misma especificidad), sólo hidroliza del 50 al 60 por 100 de los esteres fosfóricos del suero (ROBINSON); si la cantidad contenida en el mismo oscila alrededor de 5 mgs. por 100 (RAPPAPORT), esta segunda hipótesis estaría de acuerdo con nuestros resultados. Pero lo que nos interesa es que podemos afirmar, que el suero normalmente no está saturado de fosfatasa, de modo que al aumento de la concentración de ésta en el suero, se sigue necesariamente una liberación proporcional de P inorgánico de sus esteres, hasta un cierto límite.

¿Cómo puede explicarse pues, que el aumento de fosfatasa en el suero no vaya acompañado de hiperfosfemia?

La única explicación que encontramos, es que los mecanismos reguladores de la fosfemia actúan y este P inorgánico escapa del suero. En cuanto al sitio donde pueda ir el P inorgánico, todos son interrogantes. Desconocemos casi en absoluto cuanto hace referencia a los equilibrios iónicos entre plasma y glóbulos. Si va a depositarse en los tejidos o es eliminado, es cuestión que entra de lleno en los complicados problemas del balance de fósforo, de los cuales, es nuestro propósito no ocuparnos. Sólo señalaremos el hecho de que esta hiperfosfatasemia sin hiperfosfemia coincide con la época en que según las experiencias de EDEN, se enriquece el callo de fractura en fósforo.

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

ELEMENTOS MINERALES EN SUERO Y CALCIFICACIÓN DEL CALLO

Hemos encontrado una constancia extraordinaria de los valores de Ca y K en suero durante la consolidación. No hemos visto descender nunca los valores de Ca, ni experimentar aumentos valorables. Estamos por tanto de acuerdo con TISDALL y HARRIS, RUDD, HABLER, PINCUSSEN y NEUMANN... y demás autores que afirman que las cifras de calcemia no se modifican durante la consolidación. Nos parece que muchos de los resultados contradictorios obtenidos son debidos a las diferentes condiciones en que han sido realizadas las determinaciones, muchas de ellas, bajo la influencia de productos hormonícos o vitamínicos que podían modificar los resultados. No nos explicamos de otra manera, las hipercalcemias que descubren PERVES y HOFFMEISTER, así como las oscilaciones caprichosas que encuentra TIMPE.

Los valores de fosfemia sufren un ligero aumento en las primeras semanas que nunca llega al doble de los valores iniciales, para descender lentamente después. Respecto al producto Ca P, en casi todos los casos ascendió a costa del P a valores por encima de 30, sobre todo, en las determinaciones hechas de la segunda a la cuarta semana. En siete casos, este producto fué siempre inferior a 30 y la consolidación tuvo lugar normalmente. De los tres retrasos de consolidación, en uno, el producto Ca P, fué inferior a 30, en los otros dos, superiores. A pesar de ello, el primer caso consolidó más tarde, sin que las cifras de Ca P ascendiesen por encima de 30. Por tanto, nos asociamos a SPEED, BARCROFT, etc., en contra de PETERSEN y afirmamos la independencia entre los valores de los elementos minerales en suero y la calcificación del callo. Estas modificaciones cuando existen, creemos por otra parte que no se las puede dar una significación causal en los retrasos de consolidación. En los casos en que se presentan, probablemente se deben a alteraciones de los mecanismos reguladores del mantenimiento de la constancia de los elementos minerales del suero.

Creemos que no se puede sin embargo afirmar, que la calcificación del callo es un proceso de mutación local de calcio, solamente porque las cifras de los elementos minerales en

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

sangre, apenas varían durante la consolidación, ya que estas cifras nada nos dicen respecto al Ca y P que se deposita en los tejidos; es decir, que no constituyen un índice del balance de Ca y P; y por tanto, creemos que hay que dirigir la atención sobre las modificaciones de estos elementos en los tejidos, fundamentalmente en los alrededores del callo de fractura y en éste mismo.

La investigación de fosfatasa en líquido sinovial, procedente de varias articulaciones de un cadáver, nos dió resultado negativo. Parece por lo tanto, que entre los fermentos que normalmente contiene el líquido sinovial, no se encuentra la fosfatasa (1).

(1) Sería interesante investigarla en el líquido sinovial de aquellos procesos articulares hiperregenerativos (artrosis, etc.).

VII

FOSFATASA EN CALLOS DE FRACTURA HUMANOS Y CALCIFICACIÓN

FOSFATASA EN CALLO DE FRACTURA HUMANO

SABEMOS por las investigaciones realizadas, sobre el contenido mineral del callo de fractura, que esté al comienzo de la consolidación es más rico en calcio que en fósforo; es decir, que la fijación del calcio tiene lugar antes que la del fósforo. Hemos visto que el origen de este último es atribuido en gran parte al fósforo orgánico, desarticulado por las fosfatasas en el mismo sitio de fractura y su fijación relacionada con la actividad de fosfatasa del callo mismo.

Las investigaciones realizadas hasta ahora para dar una base experimental a esta hipótesis, son extraordinariamente escasas (véase primera parte) y casi todas ellas se refieren exclusivamente a valores obtenidos en callos de fractura de conejos. Las investigaciones de TIMPE que se refieren a la especie humana, tienen una significación puramente cualitativa y no hay que olvidar que han sido realizadas en cadáveres y con material escasísimo. Es indudable que tratándose de fenómenos fermentativos, las alteraciones cadavéricas, tienen que modificar los resultados.

Determinaciones cuantitativas en callos de fractura humanos extraídos operatoriamente, no hemos encontrado hasta ahora en la literatura. Nos pareció, por lo tanto, de un gran interés, la determinación de la actividad de fosfatasa en callo de fractura humano, y el estudio de sus relaciones con la calcificación del mismo.

Dado el gran material de fracturados que son tratados en este servicio, siempre se presentan algunos casos con fracturas viciosamente consolidadas, en los que es necesario hacer una reducción cruenta. En otros casos en ciertas fracturas (espiroideas de tibia, etc.), hubo que practicar osteosíntesis. Por tanto hemos tenido ocasión de poder recoger callos de fractura de cuatro a setenta y cinco días en sujetos de tres a setenta años. Los callos de fractura recientes proceden de aquellos sujetos a los que se les hizo osteosíntesis, en los que como es conocido, es conveniente para hacerla esperar algunos días (con objeto de que la defensa de los tejidos traumatizados sea mayor, y que mejoren las condiciones de la piel); con cierta frecuencia se ha encontrado en estos casos, callo provisional que nos ha servido para hacer determinaciones de fosfatasa en callos precoces.

En las fracturas tratadas por osteosíntesis con cinta de Parham, tenemos el criterio de quitar las cintas cuando está avanzada la consolidación, con objeto de evitar el efecto de cuerpo extraño. Esta circunstancia nos ha permitido en dos casos estudiar los valores de fosfatasa y calcio en el mismo callo, en dos épocas distintas del proceso de consolidación, obteniendo los siguientes resultados:

	<u>Fosfatasa U/grs.</u>	<u>Ca mgs. %</u>
I Callo, 6 días.	14,4	7
II Callo, 42 días.	3,8	46
I Callo, 19 días.	7,9	26
II Callo, 58 días	4,6	44

Los resultados obtenidos clasificados cronológicamente aparecen en la fig. 21.

Hemos determinado después de haber hecho la gráfica, un callo procedente de una pseudoartrosis de diáfisis de húmero, en el que no existían motivos locales ni generales que explicasen la falta de consolidación. La actividad de fosfatasa era muy baja en relación al escaso contenido cálcico (2,5 U/gr. y 3 mgr. por 100 de Ca) En la gráfica vemos el comportamiento de un callo procedente de una pseudoartrosis de rótula casi análogo al de este último caso.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

Inspirándonos en el trabajo de TIMPE, comprobamos en dos callos precoces y uno bien calcificado, su conducta con respecto a la hidrólisis de la lecitina. Operamos lo mismo que TIMPE llegando a idénticos resultados. Nosotros incluso encon-

Valores de Ca y Fosfatasa en callos de fractura humeros

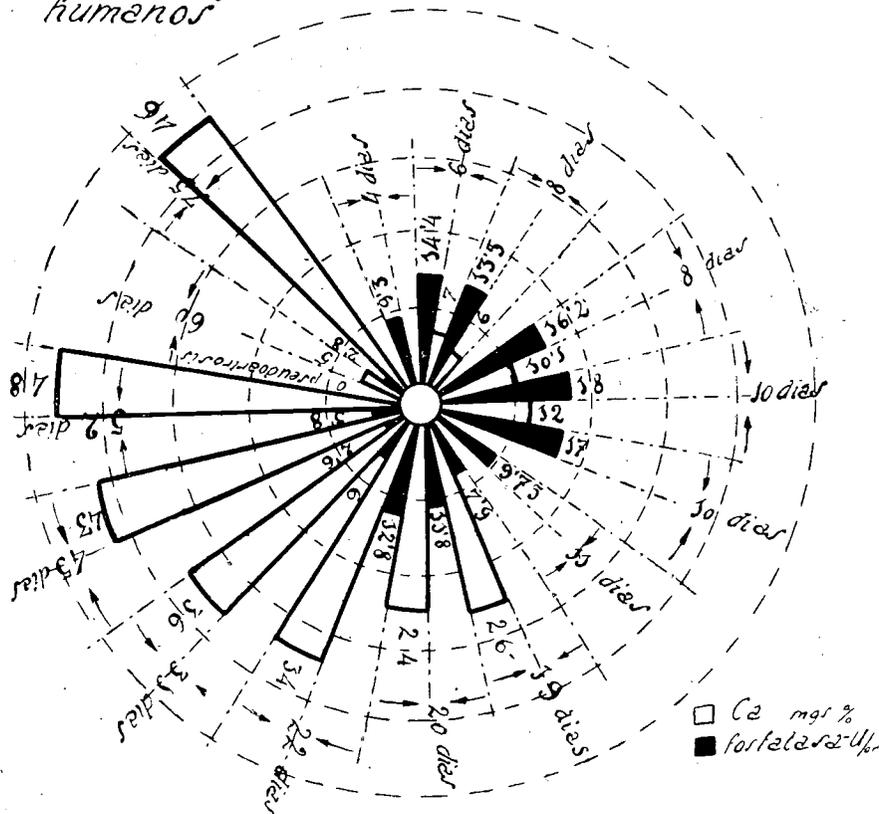


FIG. 21

tramos disminución de P inorgánico después de la incubación (¿debido a la absorción del ion PO_4 por la lecitina?).

Determinamos también los valores de fosfatasa y Ca en seis músculos perifracturarios con objeto de investigar la participación muscular en la calcificación del callo. Claro que en los fracturados humanos, sólo hemos podido conseguir músculo.

perifracturario, pero no músculo de un territorio alejado de la fractura. Esto sólo lo hemos podido realizar en experimentación animal. La comparación con los valores medios normales en otros sujetos, resulta un tanto aventurada, ya que en lo que se refiere a los músculos como depósito mineral, éste varía extraordinariamente de unos sujetos a otros, por lo que hay que ser muy cautos al valorar los resultados. He aquí los nuestros:

DIAS DE FRACTURA	MÚSCULO PERIFRACTURARIO	
	Fosfatasa	Calcio
6	0,67 U/grs.	12 mgs. %
10	0,26 U/grs.	10 mgs. %
19	0,46 U/grs.	18 mgs. %
21	0,56 U/grs.	9 mgs. %
22	0,52 U/grs.	14 mgs. %
30	0,34 U/grs.	13 mgs. %

Comparando los valores de fosfatasa encontrados en músculo perifracturario con el valor medio de fosfatasa en músculo normal, parece que son ligeramente más bajos. Los de calcio como se ve son muy irregulares, y no los valoramos por las razones apuntadas más arriba.

Como puede verse en la gráfica, fig. 21, los valores de fosfatasa en callo de fractura, se elevan durante la primera y segunda semana, alcanzando su máximo en callos de diez días y descendiendo rápidamente en razón inversa del contenido cálcico. A mayor calcificación del callo, menor actividad de fosfatasa. Llegamos por tanto a resultados opuestos a los obtenidos por KUWABARA en experimentación animal, que afirma la existencia de una relación directa entre calcificación y actividad de fosfatasa. Conforme va enriqueciéndose el callo en calcio, y sobre todo en aquellos callos ya con estructura ósea, la actividad de fosfatasa disminuye extraordinariamente, aproximándose a la del hueso normal. Esto lo hemos podido ver, no sólo al comparar unos casos con otros, sino también en los dos casos, en los que pudimos determinar la actividad de fosfatasa del callo en dos periodos distintos de la consolidación. En los dos callos de pseudoartrosis estudiados, como hemos visto, su actividad de fosfatasa se desvió de esta conducta; en uno de

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

ellos la actividad fué nula; en el otro, muy escasa en relación con el contenido cálcico.

Nosotros no atribuimos sin embargo la ausencia de consolidación a la no existencia de fosfatasa (cosa que sería pensar teleológicamente), ya que en uno de los casos, el de la pseudoartrosis de rótula, existían (dada la separación de los fragmentos, y la interposición de partes blandas), motivos sobrados para que la consolidación no tuviese lugar. No así en el segundo, en que clínicamente no pudimos explicarnos la falta de consolidación (1) Lo que afirmamos por tanto, es que en los callos de fractura humanos existe una relación entre la calcificación y la actividad de fosfatasa; y que ésta es muy pequeña o nula en los casos en los que la calcificación no tiene lugar. En cambio, la actividad de fosfatasa es grande en los callos que se calcifican normalmente, cuando éstos están constituidos simplemente por tejido conjuntivo poco calcificado.

Parece por tanto, como si la fosfatasa estuviese contenida en las células jóvenes del tejido conjuntivo, que van a calcificarse. Sin embargo, queda una circunstancia sin explicar y es la de porqué esta actividad disminuye, conforme va teniendo lugar la calcificación. Creemos ver en este hecho un caso análogo a lo que ocurre en el raquitismo.

En éste, la actividad de fosfatasa es muy grande y sin embargo la calcificación no tiene lugar, porque el estado acidósico del organismo entre otros factores, impide la calcificación. Cuando trasladamos este cartilago a un medio alcalino *in vitro* en el que puede actuar la fosfatasa, en presencia de esteres fosfóricos, éste se calcifica rápidamente. En el foco de fractura en un período precoz, sabemos que existe un estado de acidez local, que puede explicarnos que teniendo el callo una gran actividad de fosfatasa demostrable *in vitro*, no pueda ésta actuar hasta que las condiciones ambientales sean favorables. Estas son fundamentalmente: la reacción del medio, y tal vez la desaparición de algunos residuos proteínicos inhibidores (aminoácidos).

La actividad de fosfatasa en un tejido, no es por tanto

(1) Quizá influyese una inmovilización defectuosa, pues se trataba de una fractura de diáfisis de húmero que fué tratada por extensión continua en abducción.

medida de la hidrólisis de los esteres fosfóricos, mas que en aquellos casos en los que las condiciones ambientales en que se desarrolla el proceso fermentativo, sean análogas o muy parecidas a aquéllas en que nosotros colocamos al tejido *in vitro* para hacer la determinación.

La inhibición de la actividad de fosfatasa en callos muy calcificados, la atribuimos más bien a la presencia de los productos de hidrólisis, fundamentalmente los iones PO_4 en suficiente concentración para disminuir la actividad del fermento. En este caso al hacer la medida *in vitro*, persiste esta condición y la actividad del fermento es menor.

BODANSKY se pregunta, si estas medidas *in vitro* de la actividad de fosfatasa en los tejidos, pueden tener idéntica significación en el organismo. Nosotros insistimos en nuestra opinión, de que siempre que se demuestre que en el organismo se den las condiciones óptimas o próximas a ellas en que nosotros hacemos la medida del fermento, tenemos derecho a trasladar e interpretar estos fenómenos tal como ocurren *in vitro*, al organismo.

Ahora bien, si obtenemos un valor bajo de fosfatasa en un tejido, operando (como se hace en las determinaciones) en condiciones óptimas, podemos afirmar que en aquel tejido en el organismo, aun en las condiciones más favorables, no tendrá lugar la hidrólisis de los esteres fosfóricos. Tal es el caso de los dos callos procedentes de pseudoartrosis que hemos estudiado. En éstos, podemos afirmar, que en el organismo en contraposición con los callos que se calcifican normalmente, siendo bajos los valores de fosfatasa, no podrán estos tejidos liberar P inorgánico de sus esteres, sean cualesquiera las condiciones ambientales fisico-químicas.

Estas consideraciones nos condujeron a tratar de comprobar si la introducción en el foco de fractura del mismo éster fosfórico que utilizamos para determinar fosfatasa a la misma concentración, es capaz de influir sobre la consolidación; y los efectos que pudiesen obtenerse sobre la misma, produciendo artificialmente un depósito de fosfatasa muy activo en el foco de fractura, por la inyección *in situ* de fosfatasa a dosis crecientes.

VIII

EFECTO DE LA INYECCIÓN *IN SITU* DE UN ÉSTER FOSFÓRICO Y DE FOSFATASA SOBRE LA CONSOLIDACIÓN DE LAS FRACTURAS EN EL CONEJO

EFECTO DE LA INYECCIÓN "IN SITU" DE GLICEROFOSFATO SÓDICO Y DE FOSFATASA EN CONEJOS FRACTURADOS

EXISTEN antiguas experiencias sobre el efecto del glicerofosfato inyectado *in situ*, sobre la consolidación de las fracturas. EDEN ensayó entre otros compuestos fosforados el glicerofosfato sódico y le pareció observar aceleración en la consolidación.

Nosotros tratamos de estudiar aquí bajo otro punto de vista, las modificaciones que se producen en la consolidación de las fracturas en conejos, inyectándoles en el foco de fractura la solución de glicerofosfato sódico que constituye el substrato de BODANSKY para la determinación de fosfatasa, sin el veronal, ya que la reacción del medio en que se ha de verificar la hidrólisis, ha de ser *in vivo*, la de los tejidos del foco de fractura.

Para ello dispusimos la experiencia utilizando un lote de doce conejos de unos tres meses, lo más igualados posible, que dividimos en grupos de cuatro conejos. Uno, quedaba como testigo; otro, para inyectarle glicerofosfato sódico, y otro para inyectarle fosfatasa. En cada grupo osteotomizamos tres conejos cruentamente y uno subcutáneamente. Sin embargo, cuando ya teníamos osteotomizados todos los conejos, fué cuando fracasamos en la obtención de fosfatasa según el mé-

todo de MARTLAND y ROBINSON y a los ocho días de haberles hecho la osteotomía empezamos a inyectarles también glicero-fosfato. Los conejos experimentaron en general grandes reacciones por la inyección, quedando algunos muy deprimidos. De los 21 y 26 días de fractura, murieron algunos y el resto fueron sacrificados después de haberles hecho exámenes radiográficos. Se disecaron cuidadosamente las patas anteriores y se extrajo el callo de fractura, músculo perifractuario, y hueso y músculo de la pata homóloga para estudiar la actividad de fosfatasa de los primeros, y los valores de fosfatasa, calcio y fósforo de los segundos.

La forma en que se realizaron las experiencias y los resultados obtenidos pueden verse en el cuadro de la página siguiente, fig. 22.

El examen radiográfico nos dió el resultado que muestran las radiografías, figs. 23 a 35.

Se puede hacer la objeción previa de la desigualdad de las diferentes fracturas; es decir, que existen osteotomías sin apenas desviación y otras en las que existe una fractura conminuta, y que las condiciones de consolidación no son análogas. Obsérvese, sin embargo, que en cada grupo existen fracturas sin desviación, con desviación y conminutas, y pueden compararse cada una de éstas con su homóloga.

Nos sorprendió el resultado obtenido, ante el que quedamos algún tiempo perplejos. Nosotros esperábamos ver una aceleración en la consolidación, o por lo menos, que no se modificaría la calcificación del callo por la inyección de glicero-fosfato. Examinando las radiografías, se ve claramente que en aquellos conejos a los que se les inyectó desde el primer momento glicero-fosfato, no existe en absoluto callo de fractura radiográficamente, mientras que en los testigos y aquellos a los que se les inyectó glicero-fosfato a partir de los ocho días de producida la fractura, se ve callo más o menos abundante y calcificado. Entre los testigos y estos últimos parece existir callo más abundante y más denso en los segundos; sin embargo, nosotros concedemos escaso valor a estas diferencias tan pequeñas. Lo que sí afirmamos es que la inyección de glicero-fosfato sódico en el foco fractuario produce un efecto distinto si se inyecta precozmente en cuanto se produce la fractura o si la inyección se hace tardíamente (a los ocho días); en el primer

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

— Experiencias de inyección de glicerofosfato sódico en el cono fracturado —

Sujeto	Peso	Experiencia	Día de intervención	Radio de la inyección	Clase de gacha	Distancia de la inyección	Estado del cono	Callo	Índice de calcio	Índice de fosforo	Índice de magnesio	Índice de calcio + fosforo + magnesio	Ca. medio	P. medio	Mg. medio	Ca. + P. + Mg. medio
Control	3.250 grs.	—	12-III-35 (control)	35-136	gruu.	24	—	escaso	6	3,2	0,3	0,2	33	24	0,6	0,3
	3.226 "	—	12-III-35 (control)	35-136	gruu.	24	—	moderado	4,8	3,3	0,5	0,2	30	23	0,4	0,7
	3.250 "	—	14-III-35 (control)	35-136	expont.	20	—	muy escaso	2,2	2,6	0,3	0,4	32	23	0,3	0,5
	3.050 "	—	14-III-35 (control)	35-136	gruu.	20	—	muy escaso	5,3	0,8	0,3	0,3	36	20,5	0,3	0,4
Glicof. a 5% (10 cc)	3.300 "	20	12-III-35 (control)	35-136	expont.	25	500	no	8,5	2,6	0,3	0,3	35	18	0,8	0,6
	3.230 "	20	13-III-35 (control)	35-136	expont.	26	540	no	30,3	0,9	0,2	0,4	26	25	0,5	0,2
	3.325 "	20	14-III-35 (control)	35-136	gruu.	25	500	no	9,4	2,4	0,4	0,3	32	23	0,2	0,3
	3.400 "	20	14-III-35 (control)	35-136	expont.	23	460	no	33,1	2,8	0,4	0,2	25	20	0,4	0,6
Glicof. a 5% (5 cc)	3.300 "	20	16-III-35 (control)	35-136	gruu.	25	240	abundante	4,3	2	0,3	0,3	32	23	0,2	0,2
	3.280 "	20	16-III-35 (control)	35-136	gruu.	25	240	muy abundante	6,3	2,6	0,5	0,4	29	23	0,4	0,3
	3.620 "	20	12-III-35 (control)	35-136	expont.	23	360	moderado	4,8	3,8	0,3	0,3	30	26	0,2	0,2
	3.350 "	20	12-III-35 (control)	35-136	expont.	22	380	moderado	6,3	3,7	0,3	0,4	32	29	0,3	0,4

Fig. 22

caso, la consolidación se retarda; en el segundo, parece acelerarse o por lo menos se comporta como en los animales de comparación.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO



FIG. 29
Testigo

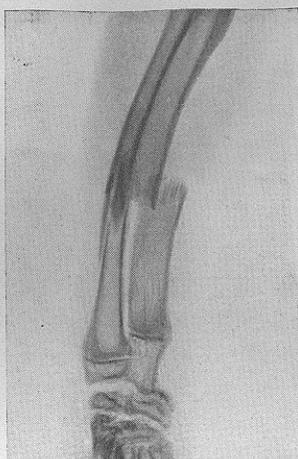


FIG. 30
Glicerofosfato I



FIG. 31
Glicerofosfato II



FIG. 32
Testigo

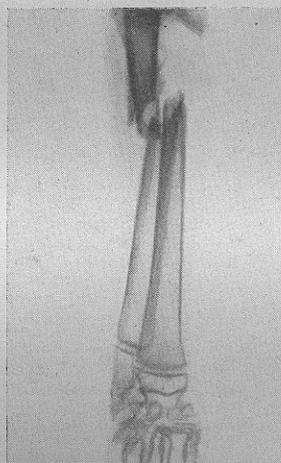


FIG. 33
Glicerofosfato I

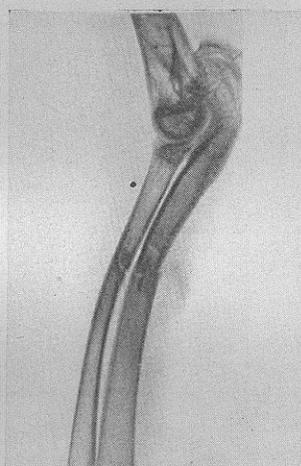


FIG. 34
Glicerofosfato II

Glicerofosfato I. Inyección de glicerofosfato desde el primer día de producida la fractura. — Glicerofosfato II. Inyección de glicerofosfato desde ocho días de producida la fractura.

Del estudio de actividad de fosfatasa de todos los callos, resulta que la actividad de éstos en el conejo, se comporta análogamente a como hemos mostrado nosotros que ocurre en la especie humana, es mucho mayor que la actividad de fosfatasa de huesos no fracturados, hecho que concuerda con los resultados obtenidos por BOTTERELL, KING, KAMADA, WILKINS y REGEN.

No hemos observado diferencias en la actividad de fosfatasa,

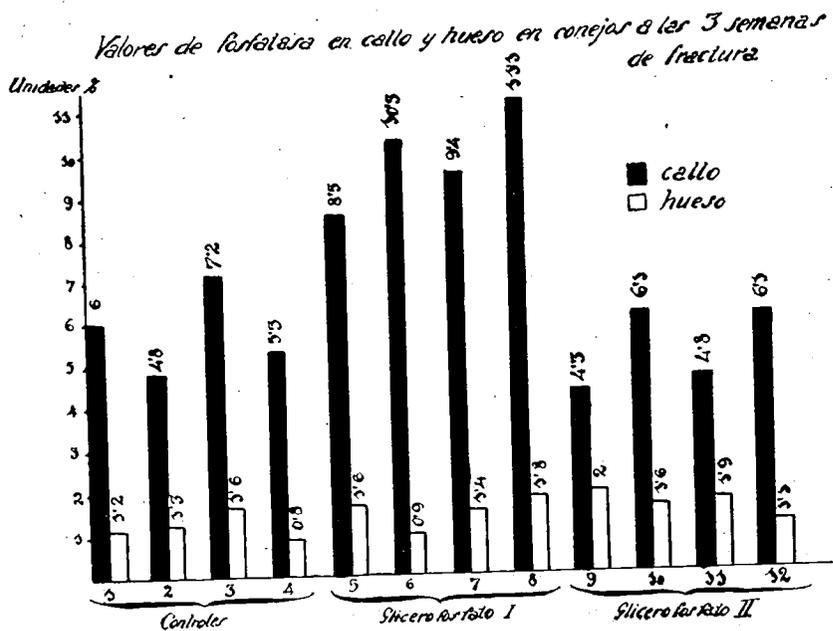


FIG. 35

ni en la consolidación entre los conejos fracturados cruenta y subcutáneamente.

Es curioso por lo demás, que la actividad de fosfatasa sea superior en los callos que no se calcificaron procedentes de conejos, a los que se les había inyectado glicero fosfato sódico desde el primer día de producida la fractura, que en los testigos y en los que se les inyectó glicero fosfato tardíamente en los que la consolidación fué normal (fig. 35).

Ocurre lo mismo en los primeros callos, que lo que tiene lugar en los callos precoces de la especie humana. Esto nos

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

hace pensar que la calcificación de estos callos no se ha producido, porque las condiciones normales para que actúe la fosfatasa han sido modificadas, ya que existía ésta más abundantemente, que en los que se calcificaron normalmente. Desde las experiencias clásicas de calcificación de cartilago (PFAUNDLER) y de callos de fractura (EDEN), a que nos hemos referido en la primera parte, sabemos que en el orden de fijación de los elementos minerales en el callo, primero es retenido el calcio y luego el fósforo, así como también que si introducimos un callo en experiencias *in vitro*, primero en una solución de fosfatos y luego en una de una sal cálcica, la calcificación no tiene lugar; esto es, que una condición imprescindible para que se produzca la precipitación cálcica, es que se encuentre calcio en forma difusible en las proximidades del foco de fractura, para que sea fijado por las albúminas del callo provisional. El factor necesario para la retención del calcio, vimos que lo constituye la acidez del medio. Nosotros interpretamos este retraso de consolidación en los conejos, a los que se les inyectó glicerofosfato desde el primer momento de producida la fractura, en el sentido de que la inyección diaria en el foco de una sustancia alcalina, como el glicerofosfato sódico, haya perturbado el desplazamiento normal del pH hacia el lado ácido de las albúminas del callo provisional y con ello la fijación de iones calcio. Aun cuando en este medio hayan actuado las fosfatasas liberando P inorgánico del glicerofosfato, éste no ha podido entrar en reacción y la precipitación no ha tenido lugar. Esta idea nos la confirma el hecho, de que en aquellos casos en los que comenzamos a inyectar a los ocho días de producida la fractura, la consolidación tuvo lugar normalmente. En este grupo la acidificación fisiológica y fijación del Ca, había tenido lugar cuando empezamos a inyectar glicerofosfato, y con ello no hicimos sino acentuar el restablecimiento fisiológico de la reacción del medio normal y con ello facilitar la acción de las fosfatasas y la calcificación. Todo ello viene a indicarnos la gran importancia del factor ambiental, reacción de medio en la calcificación del callo de fractura.

Observamos también aquí, como en los callos humanos, la diferencia que existe entre grande actividad de fosfatasa y calcificación, factores que distan mucho de ser sinónimos. La primera no es más que una condición para que tenga lugar la

segunda y está supeditada a otras condiciones, entre ellas fundamentalmente la reacción del medio.

Los valores de fosfatasa en músculos perifracturarios, no varían con relación a los del mismo músculo de la pata homóloga.

Tampoco se modifican los valores de P inorgánico, correspondiendo en esto, a la no elevación de la actividad de la fosfatasa muscular.

No ocurre así con el contenido en Ca del músculo peri-

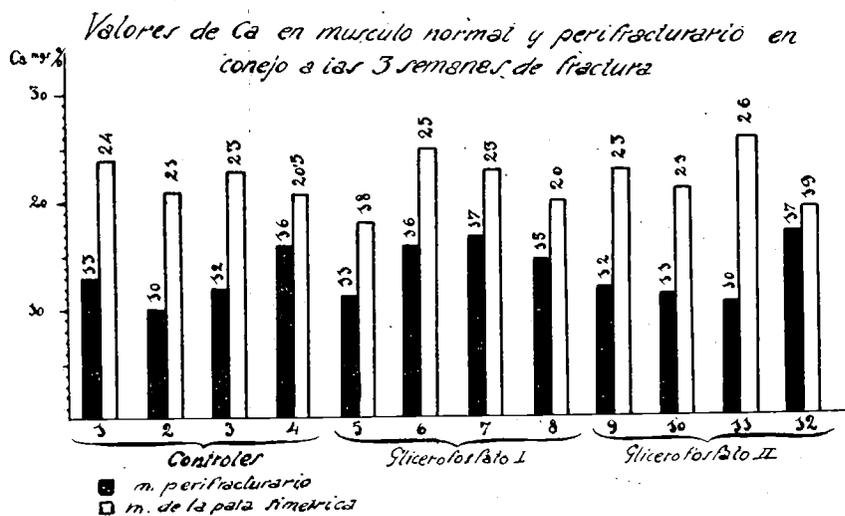


FIG. 36

fracturario que se encuentra siempre disminuido con relación al del músculo de la pata homóloga no fracturada. En la gráfica, fig. 36, pueden verse estos valores.

Estos resultados discrepan completamente de los obtenidos por SKOSSOGORENKO. Esta pérdida de Ca del músculo perifracturario, puede explicarse de dos maneras, o por una emigración del Ca del músculo perifracturario al callo de fractura; ya que el músculo puede considerársele en este sentido como un depósito, y por cierto muy lábil de calcio; o como cree TIMPE, por una «incapacidad» del músculo del animal fracturado para fijar calcio. Esta opinión la basa en experiencias comparando la fijación de Ca por músculos de conejo fracturado y sano.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

Nos parece un poco aventurado el sacar esta conclusión como hace TIMPE, comparando músculos de distintos animales. Conocedores del metabolismo mineral del músculo de tanta autoridad, como KATZ y HEUBNER, afirman que los valores de Ca muscular oscilan bastante en los diversos músculos de un mismo animal y a veces extraordinariamente de unos animales a otros de la misma especie. Es, pues, muy dudoso que introduciendo porciones de músculo de cuatro conejos en una solución de Cl_2Ca (a concentración análoga al contenido de Ca en el suero), manteniéndolas veinticuatro horas, y determinando el Ca que resta en la solución, por haber hallado valores más bajos en los dos conejos fracturados que en los otros dos, se pueda afirmar que la disminución de Ca en el músculo del animal fracturado, se debe a una incapacidad del mismo para fijar Ca. Esta, según TIMPE, se extiende a toda la musculatura del animal fracturado.

Nosotros afirmamos que el Ca del músculo perifractuario se encuentra disminuido en relación con el contenido en Ca del músculo homólogo del *mismo animal*, a las tres semanas de producida la fractura, y esto lo hemos encontrado con tal constancia en los doce conejos investigados, que creemos poder descartar en absoluto el que se tratase de una casualidad, debida a estas oscilaciones fisiológicas del contenido en calcio del músculo. Creemos que esta disminución se debe a la *emigración* del Ca muscular hacia el foco de fractura. En este sentido consideramos que el músculo participa en la aportación del Ca necesario para la consolidación.

No sabemos si esto ocurre también en la especie humana; pues por razones fáciles de comprender, no hemos podido procurarnos músculo de zonas lejanas al sitio de fractura.

Para investigar la influencia que pudiese ejercer una gran concentración de fosfatasa en el foco de fractura sobre la calcificación del callo, inyectamos fosfatasa a diferentes concentraciones en la pata fracturada del conejo.

Tomamos para ello un lote de diez y ocho conejos de unos cuatro meses, de peso aproximadamente análogo. Les fracturamos todos ellos subcutáneamente, inmovilizándoles con escayolas, a fin de evitar grandes desplazamientos. Dejamos nueve

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

como testigos, y a los otros nueve les inyectamos fosfatasa una vez por semana (tres semanas) en la siguiente forma:

Conejos	Fosfatasa por dosis	Total inyectado
1) 2)	0,1 gr. (450 U.)	0,3 gr. (1.350 U.)
3) 4)	0,2 gr. (900 U.)	0,6 gr. (2.700 U.)
5) 6)	0,4 gr. (1.800 U.)	1,2 gr. (5.400 U.)
7) 8)	0,5 gr. (2.250 U.)	1,5 gr. (6.750 U.)
9	0,7 gr. (3.150 U.)	2,1 gr. (8.450 U.)

Los conejos marcados con ' murieron al día siguiente de la segunda inyección sin que encontrásemos nada de particular en la autopsia que nos explicase la causa de la muerte. También murieron dos conejos de los testigos. Uno de estos últimos tenía la pata necrosada, necrosis producida por la escayola demasiado compresiva. La determinación de fosfatasa en callo fué hecha solamente en los tres conejos que murieron en la segunda semana. No creemos que pueda atribuirse su muerte a la inyección de fosfatasa, puesto que los demás toleraron perfectamente ésta, muchos de ellos con dosis más grandes.

A todos los demás conejos se les inyectó fosfatasa semanalmente y se les radiografió a los veintitrés días.

Las radiografías de los animales testigos y aquellas de los que se les inyectó fosfatasa, nos muestran que *no existen* prácticamente diferencias valorables entre el grado de calcificación de los callos que presentan los animales testigos y los tratados con fosfatasa, véanse figs. 37 a 48.

¿Significan estos resultados, que la fosfatasa no participa en el proceso de la consolidación de las fracturas? De ninguna manera. Sin embargo, parece natural que a mayor concentración de fosfatasa, la hidrólisis debía ser más intensa y mayor la concentración de P inorgánico, con lo que debiera acelerarse la consolidación. Nos explicamos que el primer depósito de fosfatasa que hicimos, no pudiese actuar, por no permitirselo la reacción del medio, pero no debió ocurrir así con las inyeccio-

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO



FIG. 37
Testigo

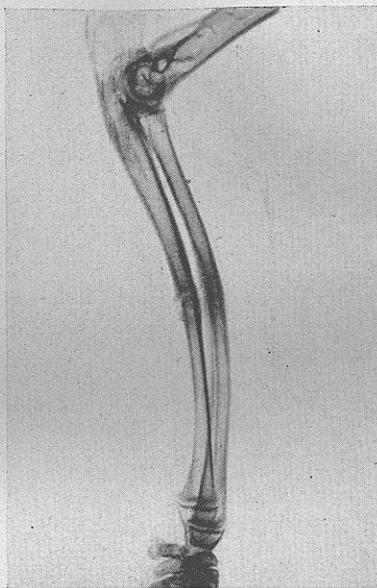


FIG. 38
Conejo núm. 2 (1550 U.)

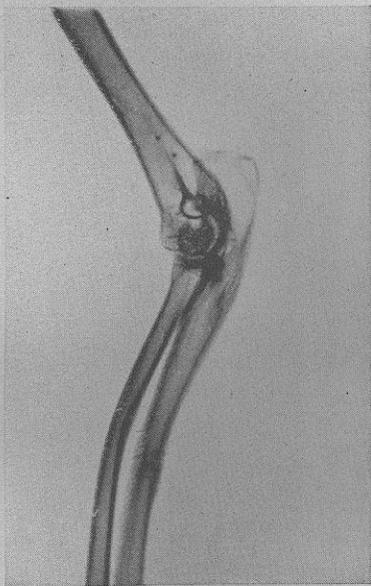


FIG. 39
Testigo



FIG. 40
Conejo núm. 4 (2700 U.)



FIG. 41
Testigo

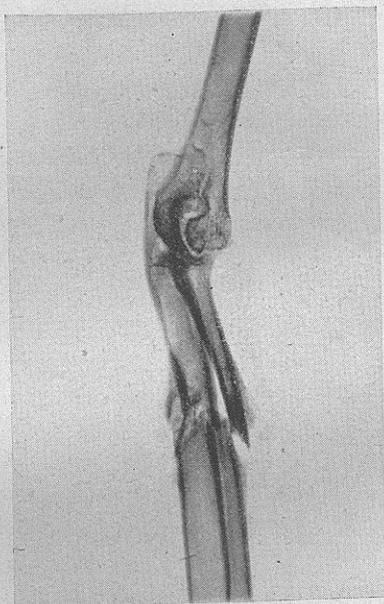


FIG. 42
Conejo núm. 5 (5400 U.)



FIG. 43
Testigo

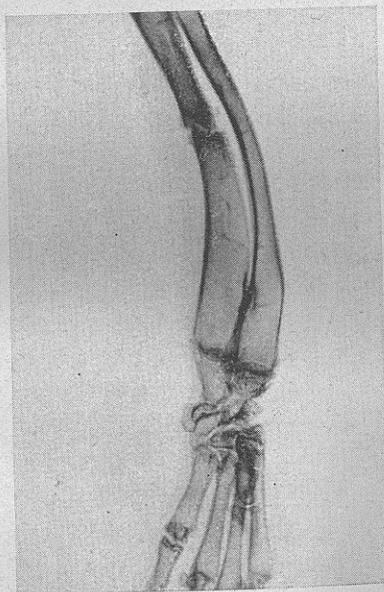


FIG. 44
Conejo núm. 6 (5400 U.)

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

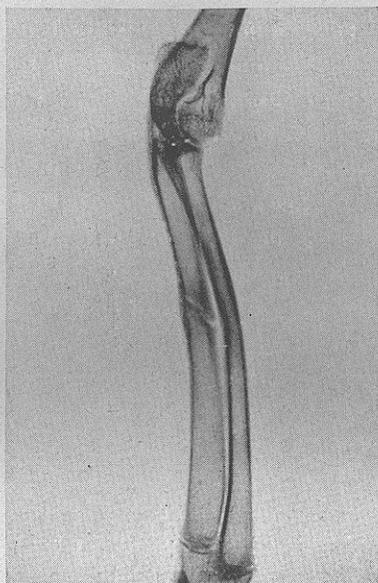


FIG. 45
Conejo núm. 8 (6750 U.)

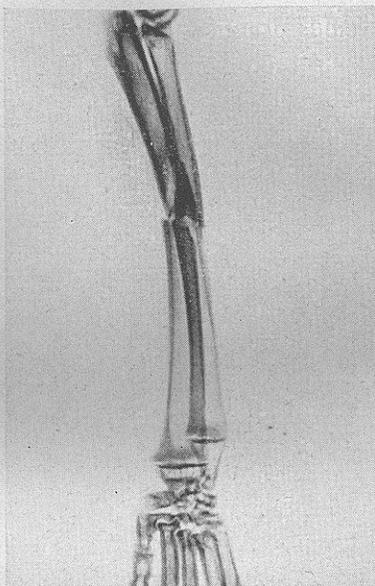


FIG. 46
Testigo

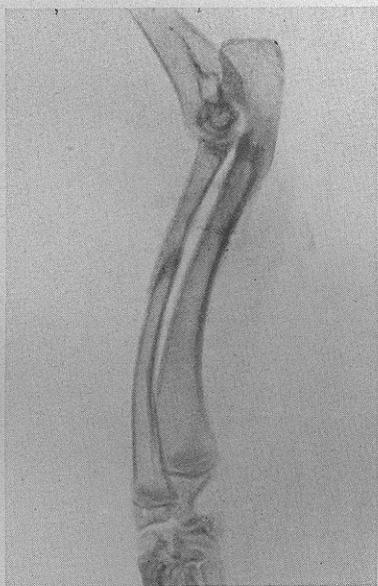


FIG. 47
Testigo

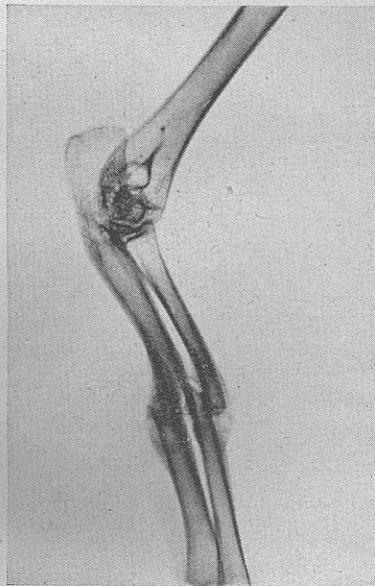


FIG. 48
Conejo núm. 9 (9450 U.)

nes practicadas en la segunda y tercera semana de producida la fractura. Mayor fué nuestra sorpresa, cuando determinando la actividad de fosfatasa del callo en los conejos 1, 3 y 7, que murieron a los nueve días de producida la fractura, nos encontramos con que los valores eran casi análogos a los que habíamos encontrado en callos de conejos a los que no se les había inyectado fosfatasa (8,9 U, 16,5 U y 12,6 U, respectivamente).

Ello nos hace pensar que la fosfatasa que nosotros inyectamos en el foco *no ha sido retenida* por el callo, sino que se ha depositado en otros tejidos, ha sido eliminada, o ha quedado inactivada irreversiblemente. Estos resultados nos indican por tanto que *no basta* inyectar fosfatasa de gran actividad a altas dosis, para producir un depósito de gran concentración del fermento en el sitio de fractura, como nosotros pensábamos. Creemos que ello puede explicar los resultados negativos obtenidos. A resultados análogos a los nuestros han llegado BOTTE-RELL y KING, inyectando fosfatasa ósea de menor actividad; sin embargo, estos autores se limitan a señalar el hecho.

IX

COMENTARIO FINAL

EN lo que antecede hemos expuesto el mecanismo bioquímico, por el que parece según las investigaciones modernas, que se verifica la calcificación del callo de fractura, así como nuestros resultados en lo que se refiere al papel de la fosfatasa en el proceso de la consolidación fracturaria.

Aquí vamos a exponer lo más someramente posible a la vista de los resultados obtenidos, el juicio que nos merece el papel de la fosfatasa en el grupo general de factores que intervienen en la calcificación. Haremos también brevísimamente algunos comentarios sobre la conducta del metabolismo mineral en las fracturas.

Condición indispensable para que la calcificación tenga lugar, es la presencia en el foco de fractura de iones Ca y PO_4 en concentración suficiente, para que el producto de los mismos rebase el producto de solubilidad del fosfato cálcico y tenga lugar la precipitación. La procedencia del Ca ha sido la más estudiada y parece claro que una gran parte del mismo procede de los extremos de fractura y del músculo perifracturario. En cambio, el origen del P inorgánico necesario para la calcificación, aparece mucho más oscuro, hasta que con arreglo a las ideas de ROBINSON se ha pensado en la enorme reserva que representan las combinaciones orgánicas fosforadas. Merced a un proceso fermentativo, pueden liberarse iones PO_4 con arreglo a las necesidades del organismo. Estas

sustancias orgánicas fosforadas, los esteres fosfóricos, se encuentran en la sangre y en los tejidos.

Difícil de delimitar es el papel de la sangre como factor de aporte de elementos minerales al callo de fractura. La ligera elevación de la fosfatemia ocurre en un período muy avanzado de la consolidación, siendo mucho más acentuada cuando existe osteoporosis e independiente de la calcificación del callo. Parece por lo tanto, que se trata de una hiperfosfatemia secundaria. El aumento de la fosfemia durante la consolidación, no coincide generalmente con la hiperfosfatemia, existe una amplia independencia entre ambas; sin embargo, en el suero la concentración del fermento es directamente proporcional a la liberación de P inorgánico hasta un cierto límite; pensamos, pues, que el P liberado por la fosfatasa en los casos en que existe hiperfosfatemia escapa del suero.

La investigación de los elementos minerales Ca y K en el suero, no nos permite sacar conclusiones sobre el papel de la sangre en el aporte de estos al callo de fractura. Nos indica solamente la manera cómo funcionan los mecanismos reguladores. Durante la consolidación fracturaria, estos valores son normales.

El músculo perifractuario contribuye al aporte de Ca al callo de fractura, puesto que los valores de este catión en músculo perifractuario, son siempre menores que en el músculo de la pata homóloga del conejo.

«Basta que se compruebe que la fosfatasa está aumentada en el hueso, y que es atraído el Ca (en forma soluble), para explicar la calcificación», afirma RABL, cuya opinión suscribe HÄBLER.

Sin embargo, distan mucho de ser sinónimas, actividad de fosfatasa y calcificación. Hemos visto, precisamente, que las mayores actividades las mostraban callos, en los que la calcificación *aún* no había tenido lugar. La participación de la fosfatasa en el proceso de la consolidación fracturaria, está supeditada a otros factores locales, entre ellos fundamentalmente la reacción del medio. El desplazamiento de la reacción de los tejidos del callo primero hacia el lado ácido, y el restablecimiento de la reacción normal en un período más avanzado de la consolidación, es condición necesaria para la consolidación. El primero está en relación con la concentración de Ca iónico y su

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

fijación; el segundo es indispensable para que puedan actuar las fosfatasas. De aquí, que la inyección de sustancias orgánicas fosforadas *alcalinas*, en un periodo precoz que anticiparían la hidrólisis fosfatásica *in vivo*, retrasen la consolidación. De un modo un poco esquemático, podríamos decir, que la fijación del Ca sobre las albúminas del callo, tiene lugar en la fase ácida y la liberación de P en la fase (ligeramente alcalina), de restablecimiento de la normalidad, en el proceso físico-químico de la consolidación.

La medida *in vitro*, de actividad de fosfatasa de los tejidos, nos da la actividad potencial de la misma, ya que operamos en condiciones óptimas; no nos indica que la hidrólisis se verifique en el organismo, si las condiciones *in vivo* no se aproximan a aquellas, bajo las que efectuamos la determinación.

El intento de producir artificialmente un depósito de gran actividad de fosfatasa, por la inyección de grandes dosis de preparados renales muy activos, fracasa por no ser *fijado* el fermento por los tejidos del callo o por ser inactivado por el mismo. No conocemos las condiciones necesarias para que la «fijación» tenga lugar. De aquí que el resultado práctico de la inyección de fosfatasa en el foco de fractura, para acelerar la consolidación, sea nulo.

No basta, pues, que la actividad de fosfatasa esté aumentada, como dice RABL, para explicar la precipitación cálcica. La fosfatasa, en la consolidación de las fracturas, no es más que un eslabón de la larga cadena de factores bioquímicos que rigen la calcificación.

X

PROTOCOLO

DETERMINACIONES EN SUERO DE FRACTURADOS

CASO 1.^o—P. D. Hombre de 41 años. Historia núm. 35.558.
 Ingresa en 8-X-34. Fractura oblicua tibia y peroné.
Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham. (Retraso de consolidación).

Fechas de Extrac. de sangre (1)	Ca	VALORES DE			Producto Ca P
		P. inorg. mgs. ‰	Fosfat. U. ‰	K	
12— X—34	10,6	2,9	1,9	20	30,7
4—XI—34	10,5	4	2,6	20,5	42,5
10— II—35	11	3,5	3,2	21	38,5
20— III—35	11	2,8	3	20,5	30,8
7—IV—35	11	2,6	3,1	21	28,6

En 4-XI-34, callo escaso. En 10-II-35, sigue con poco callo. Ligera atrofia. En 7-IV-35, callo abundante. Los valores de calcemia y kaliemia permanecen en límites normales con tendencia al ascenso los primeros. Los valores de P inorgánicos ascienden a las cuatro semanas y van descendiendo lentamente, así como el producto Ca P. Ligero aumento de la fosfatemia que se inicia a los cuatro meses coincidiendo con la atrofia.

(1) En los sucesivos casos, la primera columna de cifras indica las fechas de extracción de sangre; la segunda, los valores de calcemia; la tercera, los de fosfemia; la cuarta, los de fosfatemia; la quinta, los de kaliemia y la sexta el producto calcio fósforo.

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

CASO 2.º—P. P. Mujer de 52 años. Historia núm. 36.861.
 Ingresa 17-I-35. Fractura de tibia espiroidea.

Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham.

20— I—35	10,8	2,3	2	21	24,8
15— II—35	11	3,5	2,1	20	38,5
25— III—35	11,1	2,5	3,2	21	27,7
15— V—35	11,6	2,4	3,1	21,5	27,8

En 25-III-35, callo poco abundante bien calcificado. Ligera atrofia.
 En 15-V-35, callo escaso; fractura consolidada; persiste ligera atrofia.

Análogamente al caso anterior, tendencia ascenso calcemia. Kaliemia normal. Fosfemia, aumenta primeras tres semanas para descender después. Aumento fosfatemia a los dos meses. Persiste hasta la completa consolidación. Producto Ca P, como caso anterior.

CASO 3.º—Expuesto en el texto. J. R. Hombre de 32 años. Historia núm. 36.975.

CASO 4.º—A. P. Hombre de 23 años. Historia núm. 37.136.

Ingresa 2-II-35. Fractura diáfisis fémur por arrancamiento longitudinal, sin desviación.

Tratamiento: Inmovilización férula de Braun.

4— II—35	10,6	2,3	1,9	21,5	24,3
28— II—35	10,9	2,8	2,9	21,3	30,3
24— III—35	10,8	2,7	3,8	20,6	29,1
27—IV—35	10,5	2,6	2,8	21	29,4

En 24-III-35, fractura consolidada. Buen callo. No atrofia. Calcemia y kaliemia casi constantes. Fosfemia, asciende muy poco. Fosfatemia, asciende a las siete semanas y desciende al mes.

CASO 5.º—B. P. Hombre de 24 años. Historia núm. 37.138.

Ingresa 4-II-35. Fractura de cúbito con luxación de cabeza de radio.

Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham.

6— II—35	10,5	2,8	2,3	20	30,2
20— II—35	10,6	3,8	2,5	20,5	40,2
16— III—35	10,7	2,9	3,4	20,8	31
26—IV—35	10,3	2,5	2,6	20	25,7

En 16-III-35, poco callo. En 26-IV-35, buen callo. No atrofia. Calcemia y kaliemia, normales y constantes. Ligera hiperfosfemia a las dos semanas que desciende lentamente. Ligero aumento fosfatemia a las cinco semanas que también desciende.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

CASO 6.º—D. S. Mujer de 56 años. Historia núm. 37.282.

Ingresa 13-II-35. Fractura tibia y peroné

Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham:

15—II—35	10,4	2,3	2,6	21	24,9
28—III—35	10,6	2,9	3	20,5	30,7
10—V—35	11,3	2,9	2,2	20,8	32,1

En 28-III-35, callo poco abundante. Ligera atrofia. En 10-V-35, callo abundante bien calcificado. No atrofia. Calcémia con tendencia al ascenso. Fosfemia constante. Fosfatasemia se eleva ligeramente a las seis semanas, para descender luego.

CASO 7.º—F. B. Hombre de 42 años. Historia núm. 37.574.

Ingresa 25-II-35. Fractura maleolo interno tercio inferior peroné.

Tratamiento: Escayola.

26—II—35	10,2	2,8	2,3	20	28,5
8—III—35	10,3	2,9	2,4	20,5	29,2
1—IV—35	10,4	2,6	2,3	29,2	27

En 1-IV-35, fractura consolidada. Buen callo. No atrofia. Se observa constancia extraordinaria, valores tanto elementos minerales como fosfatasa.

CASO 8.º—F. C. Hombre de 42 años. Historia núm. 37.536.

Ingresa 27-II-35. Fractura cuello omoplato y fosa infraespinosa izquierda.

Tratamiento: Extensión en aparato de abducción.

27—II—35	10,6	3	2,4	20,5	31,8
2—IV—35	10,7	2,8	3,5	21	29,9
20—IV—35	10,6	2,6	2,5	21,3	37,5

En 20-IV-35, fractura consolidada. Disminución valores fosfemia desde el inicial. Ligero aumento fósfatasemia a las 5 semanas que descendiendo 3 semanas después. Descenso progresivo producto Ca P. A pesar de ellos, consolidación normal.

CASO 9.º—A. V. Hombre de 26 años. Historia núm. 37.632.

Ingresa 4-III-35. Fractura de tibia espiroidea.

Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham.

6—III—35	10,3	2,1	1,8	20,2	21,6
15—III—35	10,2	3,3	2	21	33,6
28—IV—35	10,8	3	2,9	21,2	32,4
3—VI—35	10,3	3,2	2,5	20,2	32,9

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

En 28-IV-35, callo abundante. No atrofia. Calcemia y kaliemia normales. Ligeró aumento fosfemia a las 5 semanas que persiste hasta completa consolidación. Tendencia elevación fosfatasemia que presenta máximo a las siete semanas, cuando ha consolidado la fractura.

CASO 10.—R. M. Mujer de 55 años. Historia núm. 38.003
Ingresa 23-III-35. Fractura de tibia y peroné tercio superior y condilos tibiales.

Tratamiento: Escayola.

24—III—35	10,3	3,5	2,1	19,6	36
19—IV—35	10,2	4,3	2,9	20	43,8
22—V—35	10,6	3,5	3,2	20	37
24—VI—35	10,5	3,7	3,5	21	38,8

En 22-V-35, poco callo. Muy ligera atrofia. En 24-VI-35, buen callo; persiste la ligera atrofia. Calcemia y kaliemia normales y constantes. Fosfemia, se eleva a las tres semanas para descender después a valores iniciales. Ligera hiperfosfatasemia que aparece después de la consolidación, coincidiendo con la atrofia.

CASO 11.—F. C. Hombre de 15 años. Historia núm. 37.645.
Ingresa 30-III-35. Fractura húmero tercio medio.

Tratamiento: Extensión en aparato de abducción.

1—IV—35	10,3	3,5	2,6	21	36
20—IV—35	10,8	3,9	3	19,5	40,2
18—V—35	10,6	3,8	2,9	20	40,0
26—V—35	10,5	3	2,8	20,5	31,5

En 20-IV-35, buen callo. Constancia de todos los valores minerales y de fosfatasa en suero.

CASO 12.—D. P. Hombre de 17 años. Historia núm. 38.135.
Ingresa 1-IV-35. Fractura de tibia abierta.

Tratamiento: Resección de herida y reducción cruenta. Escayola.

3—IV—35	11	1,9	1,6	21	20,9
19—IV—35	11	2	1,8	21,2	22
6—V—35	11,2	2,3	3,6	21	26
8—VI—35	11	2,1	2,8	20,5	23

En 8-VI-35, callo escaso. No atrofia. Se le manda volver dentro de un mes. No vuelve. Valores bajos de fosfemia con un producto Ca P, también bajo. A pesar de ello, la consolidación normal. Fosfatasemia ligeramente elevada al mes. Kaliemia normal.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

CASO 13. — E. P. Hombre de 17 años. Historia núm. 38.345.
 Ingresa 10-IV-35. Fractura parcelaria de cóndilo femoral izquierdo.
Tratamiento: Escayola.

11-IV-35	11	2,9	2	20	31,9
25 IV-35	11	3	2,1	21	33
27 - V-35	11,1	3,2	3,3	20,5	35,5
6-VI-35	11,2	3,1	2,9	20,8	35,7

En 6-VI-35, buen callo. No atrofia. Ligera hiperfosfemia e hiperfosfatemia coincidiendo con el término de la consolidación.

CASO 14. — M. L. Mujer de 46 años. Historia núm. 38.389.
 Ingresa 11-IV-35. Fractura de maleolos tibioperoneos.
Tratamiento: Escayola.

12 - IV-35	10,8	2,6	1,9	19,6	27
13- VI-35	11	2,9	3,7	20	21,9
10-VII-35	11	2,5	2,8	20,5	27,5

En 13-III-35, fractura consolidada. Callo poco abundante. No atrofia. Ligera hiperfosfatemia coincidiendo con el término de la consolidación. Los demás valores, constantes y normales. Producto Ca P bajo; a pesar de ello consolidación normal.

CASO 15. — T. C. Hombre de 23 años. Historia núm. 38.422.
 Ingresa 13-IV-35. Fractura de tibia y peroné.
Tratamiento: Escayola.

15-IV-35	10,9	2,3	1,9	20	25
20- V-35	10,6	3,3	2	20,2	34,9
5 - VI-35	10,6	2,9	3,3	20,5	30,7
30 - VI-35	10,7	2,8	2,8	20,6	29,9

En 5-VI-35, callo poco abundante. No atrofia. Ligera hiperfosfemia a las 3 semanas con tendencia al descenso. Calcemia y kaliemia, normales.

CASO 16. — E. C. Hombre de 21 años. Historia núm. 38.382.
 Ingresa 15-IV-35. Fractura de tibia y peroné tercio medio.
Tratamiento: Escayola.

16- IV-35	10,9	2,6	1,9	20,2	28,3
10- VI-35	11	2,8	2,6	21	30,8
13- VII - 35	11,1	2,6	3,8	22	28,1
18- VIII-35	11	2,7	2,6	21,5	29,7

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

En 13-VII-35, callo poco abundante. No atrofia. En este caso apenas aumenta la fosfemia; sin embargo, la consolidación tiene lugar normalmente. Ligera hiperfosfatemia a los 3 meses, con fractura consolidada.

CASO 17.—R. A. Mujer de 45 años. Historia núm. 38.392.

Ingresa 16-IV-35. Fractura antigua de rótula (de 2 meses).

Tratamiento: Refrescamiento de bordes de fractura. Cerclaje con alambre. (Se estudia callo).

17-IV-35	9,8	1,9	1,6	20	18,4
5-V-35	10,1	2	2,9	20,2	20,2
20-VI-35	10,1	2,2	2,8	19,8	20,3

En 20-VI-35, fractura consolidada. Callo escaso. No atrofia. Permanecen muy bajas las cifras de fosfemia. Ligero aumento fosfatemia a las 3 semanas, que permanece hasta término consolidación. Calcemia y kaliemia, normales.

CASO 18.—M. D. Hombre de 35 años. Historia núm. 38.408.

Ingresa 16-IV-35. Fractura cúbito y radio tercio inferior.

Tratamiento: Escayola.

16-IV-35	10,8	3	2,5	20,3	32,4
25-V-35	11	3,2	2,6	19,8	35,2
5-VI-35	11,1	3,3	2,7	20	36,6
25-VI-35	11	3	2,6	20,1	33

En 15-VI-35, buen callo. No atrofia. Todas las cifras permanecen constantes.

CASO 19.—Expuesto en el texto. E. F. Mujer de 68 años. Historia núm. 38 471.

CASO 20.—G. C. Hombre de 50 años. Historia núm. 38.546.

Ingresa 19-V-35. Fractura de maleolos tibioperoneos y marginal posterior.

Tratamiento: Escayola.

20-V-35	11	2,3	1,8	21	25
24-VII-35	11,2	3,2	2,8	21,2	35,8
22-VIII-35	11,6	3,4	2,5	22	38,2

En 24-VII-35, buen callo. No atrofia. Ligera hipercalcemia que permanece después de la consolidación. Ligera hiperfosfemia que se

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

comporta análogamente. Fosfatasemia asciende ligeramente, aumento que persiste después de la consolidación.

CASO 21.—A. C. Hombre de 37 años. Historia núm. 38.502.

Ingresa 24-IV-35. Fractura de maleolos.

Tratamiento: Escayola.

26— IV—35	10,9	2,3	1,9	20,3	25
29— V—35	10,3	3,4	2,8	20,5	35
17— VI—35	10,9	2,5	3,3	19,8	27,2
20—VIII—35	10,6	2,1	2,6	19,3	22,2

En 17-VI-35, fractura consolidada. Callo poco abundante. Ligera atrofia. Ligera hiperfosfemia al mes, que desciende ulteriormente. Aumento de los valores de fosfatasemia que tiene su máximo a las 7 semanas. Calcemia y kaliemia, normales.

CASO 22.—L. B. Mujer de 39 años. Historia núm. 38.700.

Ingresa 1-V-35. Fractura de maleolo externo.

Tratamiento: Escayola.

3— V—35	10,6	3,1	1,8	19,6	32,8
30— V—35	11	3,6	2,3	20,5	39,6
1—VII—35	10,8	3	3	20,2	32,4
11— XI—35	10,5	2,9	2	20,6	30,4

En 1-VII-35, buen callo. Ligera atrofia. Vuelve después de seis meses de producida la fractura y se le hace otra determinación. Gran constancia de los valores de calcemia y fosfemia. Los valores de fosfatasemia han aumentado ligeramente, coincidiendo con la consolidación, para descender en la determinación última.

CASO 23.—V. P. Mujer de 42 años. Historia núm. 38.771

Ingresa 2-V-35. Fractura de rama horizontal de pubis y rama isquiopubiana.

Tratamiento: Inmovilización en férula de Braun.

4— V—35	10,3	2,8	2,1	20,3	28,8
20— V—35	10,6	3	3	20,5	30,6
20—VI—35	10,5	3,1	3,2	20,8	32,5

En 20-VI-35, callo poco abundante. No atrofia. Constancia de valores de calcemia, kaliemia y fosfemia. Ligera elevación de la fosfatasemia que alcanza su máximo a las 6 semanas, cuando ha tenido lugar ya la consolidación.

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

CASO 24.—M. C. Hombre de 18 años. Historia núm. 39.616.
 Ingresa 12-V-35. Fractura de tibia tercio medio.
Tratamiento: Escayola.

14 - V-35	10,9	3	2,1	19,6	32,7
25 - VI-35	11,2	3,5	2,9	20	39,2

En 25-VI-35, fractura consolidada clínicamente. No se hizo radiografía. Valores constantes con tendencia al ascenso.

CASO 25.—A. B. Hombre de 32 años. Historia núm. 39.019.
 Ingresa 16-V-35. Fractura espiroidea de tercio superior de tibia y de maleolo peroneo.
Tratamiento: Escayola.

18 - V-35	10,3	2,2	1,9	20,3	22,6
16 - VI-35	10,8	2,9	2,6	20,5	31,2
20 - VII-35	10,7	3	3,5	20,9	32,1
3 - VIII-35	10,6	2,6	2,3	21	27,5

En 3-VIII-35, buen callo. No atrofia. En este caso coinciden las ligeras elevaciones de la fosfemia y de la fosfatasemia a las 8 semanas de la fractura. Calcemia y kaliemia, constantes.

CASO 26.—J. T. Hombre de 14 años. Historia núm. 39.214.
 Ingresa 28-V-35. Fractura de cúbito y radio hace un mes; refractura de ayer.
Tratamiento: Escayola.

28 - V-35	10,2	4,1	3,2	22	41,8
5 - VII-35	10,4	4,6	3,8	21,2	47,8
18 - VII-35	10,3	4,3	3,3	21,1	44,2

En 5-VII-35, buen callo. No atrofia. Obsérvese las cifras iniciales de fosfemia y de fosfatasemia debidas probablemente a la anterior fractura, que apenas se modifican por la segunda fractura.

CASO 27.—A. H. Hombre de 33 años. Historia núm. 38.981.
 Ingresa 29-V-35. Fractura antigua de maleolo interno.
Tratamiento: Enclavijamiento con clavija ósea.

30 - V-35	11,2	3,6	2,8	20,5	40,3
25 - VI-35	11,5	3,8	2,6	20,9	43,7
30 - VII-35	11,1	3,2	2,5	20,3	35,5
16 - VIII-35	11,3	3,1	2,7	20	35
10 - IX-35	10,9	3	2,3	20,6	32,7

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

En 16-VIII-35, buen callo. No atrofia. Ligera hipercalcemia a las 4 semanas. Los demás valores prácticamente constantes.

CASO 28.—C. M. Hombre de 32 años. Historia núm. 39.245.

Ingresa 29-V-35. Fractura de fémur tercio medio.

Tratamiento: Extensión Kirschner.

1— VI—35	10,8	2,9	1,9	20,2	31,3
17— VI—35	11	3,4	2,1	21,5	37,4
4— VII—35	10,9	3,3	3,5	20,6	35,9
6— VIII—35	11	3,2	2,4	20,5	35,2

En 4-VII-35, callo muy escaso. Escayola con estribo de marcha. El 6-VIII-35, callo abundante. No atrofia. Ligero aumento de la fosfemia a las dos semanas y de la fosfataseemia a las 4, cuando existe ya callo; estos valores descienden 4 semanas después. Calcemia y kaliemia, constantes.

CASO 29.—F. S. Hombre de 72 años. Historia núm. 39.285.

Ingresa 1-VI-35. Fractura omoplato izquierdo, radio izquierdo y ambos peronés

Tratamiento: Aparato de abducción de brazo e inmovilización con férulas de Braun de ambas extremidades inferiores; escayola en brazo y antebrazo izquierdo.

3— VI—35	10	2,1	1,8	21	21
20— VI—35	10,1	3,6	2	20,5	36,3
10— VII—35	10,2	2,5	2,9	21	25,5
1— VIII—35	10,5	2,6	2,8	22	27,3

En 1-VIII-35, radio callo escaso, ambos peronés, buen callo. Omoplato, callo abundante. Aumento de la fosfemia a las 2 semanas para descender después. Tendencia al aumento de la kaliemia. Fosfataseemia aumenta una unidad con respecto al valor inicial cuando ha tenido lugar la consolidación.

CASO 30.—D. I. Hombre de 51 años. Historia núm. 39.278.

Ingresa 1-VI-35. Fractura diáfisis de húmero.

Tratamiento: Extensión en aparato de abducción.

2— VI—35	10,4	2,5	1,6	20,5	26
17— VI—35	10,6	2,9	2,8	20,3	30,7
15— VII—35	10,7	2,8	3,1	20,6	30,9
12— VIII—35	10,5	2,6	2,7	20,8	29,3

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

En 17-VI-35, empieza a verse callo muy poco denso. En 15-VII-35, callo poco abundante. Atrofia moderada. Ligero aumento de los valores de fosfatemia a las 6 semanas cuando ha tenido lugar ya la consolidación. Demás valores, constantes.

CASO 31.—M. O. Hombre de 13 años. Historia núm. 37.645.
Ingresa 2-VI-35. Fractura de húmero con fragmento intermedio.
Tratamiento: Extensión en aparato de abducción.

2-VI-35	10,6	3,5	2,8	20,3	37,1
3-VII-35	10,9	3,6	2,7	20,9	39,2
15-VII-35	10,5	3,4	2,6	20,3	35,7

En 2-VII-35, buen callo. No atrofia. Constancia de todos los valores durante el tiempo que dura la consolidación.

CASO 32 —D. O. Hombre de 23 años. Historia núm. 39.378.
Ingresa 7-VI-35. Fractura de tibia tercio superior, enclavada.
Tratamiento: Escayola.

8-VI-35	10,6	3,1	2	20,5	32,8
2-VII-35	11	3,5	3,2	20,3	38,5
7-VIII-35	11,2	3,7	3,1	20,8	41,4

En 7-VIII-35, callo abundante bien calcificado. No atrofia. Calcemia con tendencia al aumento. Fosfemia y fosfatemia se elevan a las 4 semanas, persistiendo el aumento hasta la última determinación. Kaliemia constante.

CASO 33.—N. H. Mujer de 36 años. Historia núm. 39.386.
Ingresa 7-VI-35. Fractura de tibia y peroné con astillamiento
Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham.

8-VI-35	10,9	2,8	1,3	22	30,5
28-VI-35	11	3,9	2,9	21,5	42,9
12-VII-35	11,2	3,2	3,3	20,2	35,8
14-VIII-35	10,7	3	2,2	21	32,1

En 12-VII-35, se quitan cintas. Buen callo. En 14-VIII-35, callo muy abundante. No atrofia. Aumento de los valores de fosfemia a las 3 semanas que desciende, muy lentamente. Ligera hiperfosfatemia a las 6 semanas. Calcemia y kaliemia normales, con tendencia al ascenso la primera.

CASO 34.—F. C. Hombre de 23 años. Historia núm. 39.439.
Ingresa 9-VI-35. Fractura de rótula y escafoides carpiano.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

Tratamiento: Sutura de aletas rotulianas. Escayola en antebrazo.

11— VI—35	10,3	2,4	2,9	20,2	24,7
15— VII—35	10,6	2,8	2,7	20,5	29,6
8— VIII—35	10,9	3,1	2,9	20,6	33,7
6— IX—35	10,8	2,5	2,8	20,7	27

En 8-VIII-35, fracturas de rótula y escafoides consolidadas. Ligero aumento de la fosfemia a los 2 meses, que desciende al mes siguiente. Demás valores, constantes y normales.

CASO 35.—A. A. Mujer de 56 años. Historia núm. 39.901.

Ingresa 5-VII-35. Fractura fémur pertrocantérea.

Tratamiento: Escayola a lo Whitmann.

5— VII—35	10,8	2,5	2,1	19,6	27
6— VIII—35	11,2	2,6	2,8	20	29,1
3— IX—35	11,1	2,5	3,3	19,3	25,5
14— X—35	10,9	2,4	2,5	20	26

En 10-X-35, fractura consolidada. Callo moderado. No atrofia. Cifras de fosfemia muy bajas sin tendencia al ascenso, lo mismo que producto Ca P. A pesar de ello, la consolidación tiene lugar normalmente. Ligera hiperfosfatemia a las 8 semanas. Calcemia con tendencia al ascenso en los límites superiores de lo normal.

CASO 36.—M. A. Mujer de 62 años. Historia núm. 39.902.

Ingresa 6-VII-35. Fractura de tibia y peroné tercio medio.

Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham.

7— VII—35	10,6	2,5	2,1	20	26,5
20— VII—35	11	3,5	2,2	20,5	38,5
29— VIII—35	10,9	3,2	3,8	21,5	34,8
17— X—35	10,6	3	2,9	20,8	31,8

En 17-X-35, callo escaso. Ligera atrofia. Aumento de fosfemia a las 3 semanas. Hiperfosfatemia a las 7 semanas que desciende al mes.

CASO 37.—R. B. Mujer de 72 años. Historia núm. 40.009. (Va en texto).

CASO 38.—A. M. Mujer de 54 años. Historia núm. 37.964.

Ingresa 18-IX-35. Fractura cuello de húmero y tercio superior de tibia.

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Tratamiento: Extensión en aparato de abducción y escayola en miembro inferior.

18-IX-35	11,2	2,5	2,8	21	38
8-X-35	11,3	2,9	3	20,2	31,7
26-X-35	11,6	3,2	3,1	20	37
16-XI-35	11,3	3,1	3,2	20	35

En 8-X-35, fractura cuello de húmero consolidada. En 16-IX-35, fractura tibia consolidada. Callo escaso. Ligera atrofia. Ligero aumento de la fosfatemia que asciende una vez ha tenido lugar la consolidación. Ligera hipercalcemia.

CASO 39.—A. C. Mujer de 28 años. Historia núm. 41.124.

Ingresa 8-IX-35. Fractura de diáfisis humeral, tercio medio.

Tratamiento: Extensión en aparato de abducción. Después escayola en abducción de 45° (retraso de consolidación).

9-X-35	10,6	2,1	1,9	20,5	22,2
10-XI-35	10,8	2,3	2,8	20,6	24,8
11-XII-35	10,9	2,2	2,6		23,9
21-I-36	10,8	2,1	2,5	21	22,6
28-II-36	9,8	3,2	2,8	22	31,3

En 11-XII-35, no se ve callo. No atrofia. En 21-I-36, callo muy pobre. Sigue con movilidad anormal. Wassermann negativo. Se le administra *pro ossa*. En 28-II-35, ha progresado algo el callo, pero todavía es muy escaso. No atrofia. Sigue inmovilizada. Se observan cifras bajas de fosfemia que sólo tienden a ascender a los 5 meses, cuando empieza a consolidar la fractura. Fosfatemia normal. Calcemia normal, tiende a disminuir, después de la administración de *pro ossa*, mientras que la kaliemia tiende a aumentar.

CASO 40.—J. D. Hombre de 25 años. Historia núm. 41.300.

Ingresa 22-IX-35. Fractura de fémur abierta.

Tratamiento: Resección y sutura de herida. Extensión Kirschner.

9-X-35	11	3,2	2,3	21	35,2
23-X-35	11,2	3,5	2,4	20	39,2
12-XI-35	11	3,4	2,7	20	37,4
12-XII-35	10,8	3,2	2,8	20,5	34,5

En 23-X-35, existe abundante callo en período de calcificación. En 12-XI-35, abundante callo bien calcificado. No atrofia. Todos los valores normales, existiendo tendencia al ascenso, en las primeras semanas de la fosfemia y en las últimas de la fosfatemia.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

CASO 41.—A. L. Hombre de 20 años. Historia núm. 41.375.

Ingresa 27-IX-35. Fractura diáfisis fémur izquierdo.

Tratamiento: Extensión Kirschner; más tarde osteosíntesis.

9— X—35	10,6	3,2	1,9	20	33,9
28— X—35	10,4	3,4	2	21	35,3
29— XI—35	10,5	3,1	2,3	20	32,5
17— XII—35	10,7	2,8	2,1	20	29,9

En 8-X-35, no se ve callo. En 11-XI-35, callo voluminoso poco denso. En 29-XI-35 (diez días después de la reducción cruenta, no se puede ver callo por la escayola). En 17-XII-35, callo bien calcificado y abundante. No atrofia. Valores normales.

CASO 42.—A. S. Hombre de 24 años. Historia núm. 41.731.

Ingresa 11-X-35. Fractura de ambas tibias tercio medio y del primer metacarpiano.

Tratamiento: Escayola.

14— X—35	11	2,8	2,1	20	30,8
20— XI—35	11,2	3,2	2,6	21	35,8
15— XII—35	11,3	3	3,1	20,5	33,9

En 15-XII-35, ambas fracturas de tibia consolidadas. Buen callo. No atrofia. Tendencia aumento fosfatemia y fosfemia a las 5 semanas que persiste un mes después. Tendencia aumento calcemia.

CASO 43.—N. C. Hombre de 45 años. Historia núm. 41.732.

Ingresa 13-X-35. Fractura fémur tercio inferior. Anquilosis de rodilla en flexión por tuberculosis que data de 20 años.

Tratamiento: Escayola.

14— X—35	11,2	1,6	2	20	17,9
5— XI—35	11,1	1,8	2,9	19,5	19,9
7— XII—35	11,3	2,5	2,6	10	28,2

En 7-XII-35, callo abundante bien calcificado. No atrofia. A pesar de ser bajísimas las cifras de fosfemia que sólo ascienden relativamente, cuando ha tenido lugar la consolidación y ser asimismo muy bajo el producto Ca P, la consolidación se ha verificado normalmente.

CASO 44.—I. S. Hombre de 48 años. Historia núm. 41.977.

Ingresa 22-X-35. Fractura de diáfisis humeral.

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Tratamiento: Extensión en aparato de abducción.

23- X-35	11,1	2,3	2	20,5	25,5
18- XI-35	11	3,2	2,5	20,2	35,2
5- XII-35	10,9	3,5	2,8	20,1	38,1
22- XII-35	11	3	2,6	19,8	33

En 5-XII-35, callo poco abundante. No atrofia. Aumento de la fosfemia que alcanza su máximo a las 6 semanas para descender 3 semanas después de consolidada la fractura. Ligero aumento de la fosfatemia que coincide en este caso con la elevación de la fosfemia.

CASO 45.—J. P. Hombre de 21 años. Historia núm. 37.702. (Va en texto).

CASO 46.—F. V. Hombre de 18 años. Historia núm. 40.278. Ingresa 22-XII-35. Fractura de cúbito y radio.

Tratamiento: Escayola.

26- XII-35	10,5	2,1	2,8	19	22
18- I-36	10,3	3	2,6	20	30,9
13- II-36	10,4	2,5	2,3	19,5	26

En 13-II-36, buen callo. No atrofia. Ligero aumento de la fosfemia a las tres semanas. Demás valores normales.

CASO 47.—A. A. Hombre de 28 años. Historia núm. 35.574. (Va en texto).

CASO 48.—F. M. Hombre de 15 años. Historia núm. 41.864.

Ingresa 28 X-35. Fractura de fémur tercio medio. Herida infectada en hueco poplíteo.

Tratamiento: Extensión Kirschner.

29- X-35	11,4	2,6	3,2	19,8	29,6
12- XI-35	12,2	3,2	3,5	20	33
29- XI-35	12	3,8	3,5	20,5	45
12- XII-35	11,8	3,1	3,4	20	36,5

En 12-XII-35, buen callo. No atrofia. Este caso es el único en el que hemos observado hipercalcemia durante la consolidación. Aumento de la fosfemia a las 4 semanas. Demás valores, normales.

CASO 49.—E. E. Hombre de 20 años. Historia núm. 41.635. Ingresa 26-X-35. Fractura de tibia y peroné.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham.

3- XI-35	10,8	3	2,5	20,6	32,4
25- XI-35	11	3,3	3,8	20,1	36,3
12- XII-35	11,2	3,2	3,6	20,5	35,8
20- XII-35	11,4	3,3	2,6	20,6	37,6

En 12-XII-35, callo moderado. No atrofia. Ligeró aumento de la calcemia, que se mantiene después de la consolidación. Aumento de la fosfataseмия a las 3 semanas, que desciende después de la consolidación. Fosfemia y kaliemia, constantes.

CASO 50.—F. A. Hombre de 40 años. Historia núm. 42.393.

Ingresa 17-XI-35. Fractura de maleolo externo. Estallido de epifisis radial.

Tratamiento: Escayola.

19- XI-35	11	3,2	2,1	22	25,3
19- XII-35	11,2	2,5	3,3	21	28
2- I-36	11,1	2,7	3,8	20,6	29,9
18- I-36	10,8	2,3	2,6	20,9	24,8

En 19-XII-35, fractura de epifisis radial consolidada. No atrofia. En 18-I-36, fractura maleolo externo consolidada; callo escaso. No atrofia. Ligera hiperfosfataseмия, que alcanza su máximo a las 6 semanas y que desciende dos semanas después. Demás valores, normales.

CASO 51.—I. C. Mujer de 31 años. Historia núm. 42.508.

Ingresa 29-XI-35. Fractura de tibia espiroidea.

Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham.

30- XI-35	10,6	2,8	2,9	20,5	30
12- XII-35	11	2,9	2,8	20,6	31,9
15- I-36	10,9	2,7	3,7	20,1	29,4
18- II-36	11,2	2,6	2,7	20	29,1

En 15-I-36, se quita cinta. Callo escaso. No atrofia. En 18-II-36, sigue con poco callo. Ligera hiperfosfataseмия a las 6 semanas. Demás valores normales. Ligeró aumento calcemia después de la consolidación.

CASO 52.—M. M. Mujer de 60 años. Historia núm. 42.527.

Ingresa 13-I-36. Fractura de Colles.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

Tratamiento: Osteotomía y resección del callo, enclavijamiento del maleolo con clavija ósea.

Peso callo para fosfatasa $\left\{ \begin{array}{l} 640 \text{ mgs. Fosfat. } 2,3 \\ 480 \text{ mgs. Fosfat. } 2,9 \end{array} \right\}$ Fosfat. 2,6 U/gr.

Peso callo para Ca. 505 mgs. Ca = 43 mgs. por 100.

No se pudo tomar músculo perifractario por no existir a este nivel.

CASO 4.º—E. R. 10 años. Historia núm. 39.195.

Fractura oblicua de diáfisis de fémur.

Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham. Callo de 10 días.

Peso callo para fosfatasa $\left\{ \begin{array}{l} 212 \text{ mgs. Fosfat. } 16,5 \\ 125 \text{ mgs. Fosfat. } 17,5 \end{array} \right\}$ Fosfat. 17 U/gr.

Peso callo para Ca. 256 mgs. Ca = 12 mgs. por 100.

Peso músculo perifract. para fosfat. 110 mgs. Fosfatasa 0,26 U/gr.

Id. id. id. id. Ca 165 mgs. Ca = 10 mgs. por 100.

CASO 5.º—F. B. 3 años. Historia núm. 38.465.

Fractura de fémur oblicua tercio medio.

Tratamiento: Reducción. Escayola. Al día siguiente edema intenso en pie que obliga a quitar escayola. Se le producen abundantes flictenas y es necesario colocarle la extremidad inferior en elevación y esperar a que mejore para volver a poner escayola; entre tanto extensión. A los ocho días se ha desplazado el fragmento distal hacia adentro y arriba; tiene callo y no se puede reducir. Reducción cruenta y osteosíntesis con cinta de Parham. Se encuentra abundantísimo callo, bien calcificado que es necesario ir resecaando para descubrir los extremos óseos.

Callo de 31 días.

Peso callo para fosfatasa $\left\{ \begin{array}{l} 427 \text{ mgs. Fosfat. } 6,5 \\ 562 \text{ mgs. Fosfat. } 5,8 \end{array} \right\}$ Fosfat. 6 U/gr.

Peso callo para Ca. 326 mgs. Ca = 36 mgs. por 100.

Peso músculo perifract. para fosfat. 126 mgs. Fosfatasa 0,34 U/gr.

Id. id. id. id. Ca 236 mgs. Ca = 13 mgs. por 100.

CASO 6.º—E. F. 68 años. Historia núm. 38.471.

Fractura oblicua tercio inferior de fémur con gran astillamiento.

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Tratamiento: Extensión Kirschner. Se reduce el acortamiento pero persiste la separación de un fragmento intermedio.

Callo I = 6 días. Callo II = 53 días.

Peso callo I para fosfatasa { 235 mgs. } Resultados véase texto.
 { 190 mgs. }

Peso callo II para fosfatasa 422 mgs. Resultados véase texto.

Peso callo I para Ca. 118 mgs. Ca = 27 mgs. por 100.

Peso callo II para Ca. 546 mgs. Ca = 46 mgs. por 100.

CASO 7.º—N. H. 49 años. Historia núm. 39.386.

Fractura tibia con fragmento intermedio.

Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham.

Callo de 10 días.

Peso callo para fosfatasa. 136 mgs. Fosfatasa 17 U/gr.

No se pudo hacer Ca en callo por la escasez de éste. No hay músculo perifractario.

CASO 8.º—A. L. 20 años. Historia núm. 41.375.

Fractura fémur tercio medio.

Tratamiento: Extensión Kirschner. Por desplazamiento ulterior de los fragmentos, reducción cruenta. Abundante callo poco calcificado de 21 días.

Peso callo para fosfatasa { 260 mgs. Fosfat. 12,5 } Fosfat. 11,8 U/gr.
 { 430 mgs. Fosfat. 11,1 }

Peso callo para Ca. 490 mgs. Ca = 24 mgs. por 100.

Peso músculo perifract. para fosfat. 328 mgs. Fosfatasa 0,5 U/gr.

Id. id. id. id. Ca 320 mgs. Ca=9 mgs. por 100.

CASO 9.º—E. E. 20 años. Historia núm. 41.635

Fractura de tibia y peroné.

Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham.

Callo de 8 días.

Peso callo para fosfatasa { 140 mgs. Fosfat. 16,5 } Fosfat. 16,2 U/gr.
 { 190 mgs. Fosfat. 15,9 }

Peso callo para Ca. 118 mgs. Ca = 10 mgs. por 100.

CASO 10.—J. E. 47 años. Historia núm. 37.437.

Fractura a tres fragmentos de maleolos con fuerte desplazamiento

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

hacia lado interno y subluxación de astrágalo hacia afuera. Data de 45 días.

Tratamiento: Osteotomía y resección del callo y reducción cruenta. Callo de fractura abundantísimo, con estructura ósea.

Peso callo para fosfatasa $\left\{ \begin{array}{l} 860 \text{ mgs. Fosfat. } 2,4 \\ 640 \text{ mgs. Fosfat. } 3 \end{array} \right\}$ Fosfat. 2'6 U/gr.

Peso callo para Ca. 500 mgs. Ca = 43 mgs. por 100.

No existe músculo peritracurario.

CASO 11.—A. P. 27 años. Historia núm. 42.489.

Fractura oblicua tercio superior de cúbito con luxación de radio abierta.

Tratamiento: Resección de herida e intento de reducción. No queda reducida. Reducción cruenta.

Callo de 22 días.

Peso callo para fosfatasa $\left\{ \begin{array}{l} 160 \text{ mgs. Fosfat. } 13,2 \\ 143 \text{ mgs. Fosfat. } 12,4 \end{array} \right\}$ Fosfat. 12,8 U/gr.

Peso callo para Ca. 126 mgs. Ca = 35 mgs. por 100.

Peso músculo perifract. para fosfatasa 246 mgs. Fosfatasa 0,38 U/gr.

Id. id. id. id. Ca 149 mgs. Ca=11 mgs. por 100.

CASO 12.—A. M. 42 años. Privado.

Fractura de rótula.

Tratamiento: Cerclaje con alambre.

Callo de 11 días.

Peso callo para fosfatasa $\left\{ \begin{array}{l} 326 \text{ mgs. Fosfat. } 10,6 \\ 115 \text{ mgs. Fosfat. } 8,9 \end{array} \right\}$ Fosfat. 9,8 U/gr.

Ca no se determinó.

CASO 13.—I. C. 28 años. Historia núm. 42.505.

Fractura espiroidea de tibia.

Tratamiento: Osteosíntesis con cinta de Parham.

Callo de 4 días. Apenas hay callo de fractura; sin embargo, junto al hematoma, al refrescar los extremos sale una pequeña cantidad de tejido conjuntivo que es el que se investiga.

Peso callo para fosfatasa 106 mgs. Fosfat. 9,3 U/gr.

Por la escasez de material no se pudo hacer más que una determinación de fosfatasa y no se investigó calcio.

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

CASO 14.—F. G. 14 años. Historia núm. 42.395.

Fractura con minuta de tibia y peroné. No se consigue una buena reducción incruenta.

Tratamiento: Osteosíntesis con dos cintas de Parham.

Callo de 19 días. Segunda muestra, callo de 58 días.

Peso callo I para fosfatasa	{ 235 mgs. 176 mgs. }	Resultados véase texto.
Peso callo II para fosfatasa	{ 194 mgs. 110 mgs. }	Resultados véase texto.
Peso callo I para Ca.	143 mgs.	Resultados véase texto.
Peso callo II para Ca.	325 mgs.	Resultados véase texto.
Peso músculo perifract.	para fosfat. 129 mgs.	Fosfat. 0,46 U/gr.
Peso músculo perifract.	para Ca 210 mgs.	Ca=10,5 mgs. por 100.

CASO 15.—S. S. 40 años. Historia núm. 38.471.

Fractura de tibia y peroné izquierdos tercio inferior viciosamente consolidada. Data de 2 meses y medio. Callo muy abundante y bien calcificado.

Tratamiento: Osteotomía y resección del callo. Osteosíntesis con cinta de Parham.

Peso callo para fosfatasa	{ 476 mgs. Fosfat. 2,5 640 mgs. Fosfat. 3 }	Fosfat. 2,8 U/gr.
Peso callo para Ca.	546 mgs.	Ca = 46 mgs. por 100.

CASO 16 —V. L. 32 años. Privado.

Ingresa con una fractura de diáfisis de húmero en 15-IX-35.

Tratamiento: Extensión en aparato de abducción. Se consigue la reducción anatómica. En 15-III-36, sigue con movilidad anormal y no se ve callo. Wassermann negativo. Intervención: refrescamiento de extremos de fractura y colocación de un injerto óseo tomado de tibia. Entre los extremos de fractura se encuentra tejido fibroso.

Peso callo para fosfatasa	{ 511 mgs. Fosfat. 1,3 328 mgs. Fosfat. 0,9 }	Fosfat. 1 U/gr.
Peso callo para Ca.	495 mgs.	Ca = 3,2 mgs. por 100.

(EXPERIENCIAS EN CONEJOS, VÉASE TEXTO)

XI

CONCLUSIONES

PRIMERA

DURANTE el proceso normal de la consolidación de las fracturas en adultos (cincuenta y dos casos), se produce una ligera hiperfosfatemia que se presenta generalmente cuando ya ha tenido lugar la consolidación. No existen relaciones entre los valores de fosfatemia y la calcificación del callo. La hiperfosfatemia es más intensa en los casos en los que existe considerable osteoporosis.

SEGUNDA

Los valores de calcemia y kaliemia permanecen dentro de límites normales, con una gran constancia durante todo el tiempo que dura la consolidación. Los valores de P inorgánico ascienden en la primera semana, así como el producto Ca P para descender ulteriormente. No alcanzan nunca cifras dobles de las iniciales. El producto Ca P, fué en el 13,6 por 100 de los casos inferiores a 30, y la consolidación tuvo lugar normalmente.

TERCERA

De tres retrasos de consolidación, en dos de ellos fué siempre el producto Ca P superior a 30, en el otro nunca llegó a alcanzar esta cifra, incluso cuando la calcificación tuvo lugar. No existe relación entre los valores de los elementos minerales en suero y la calcificación del callo de fractura.

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

CUARTA

El líquido sinovial normal (cadáver) no contiene fosfatasa.

QUINTA

Existe una amplia independencia entre los valores de fosfatasa y fósforo inorgánico en suero durante la consolidación; generalmente cuando los valores de fosfatasemia son altos, los de P inorgánico tienden a descender.

SEXTA

Con el substrato de BODANSKY para la determinación de fosfatasa en suero, con la modificación de determinar fósforo inorgánico según BELL DOISY, se obtienen cifras normales concordantes con las de BODANSKY (2 U por 100). El método de ALBERS para la obtención de extractos muy activos, es altamente satisfactorio y muy superior en todos sentidos, pero especialmente en el de rendimiento al antiguo método de MARTLAND y ROBINSON. La fosfatasa renal obtenida por nosotros, tenía una actividad de 4,5 U mgrs.

SÉPTIMA

Los valores de fosfatasa en callos de fractura humanos, son siempre superiores a los valores medios de fosfatasa de diversos huesos humanos. Estos valores están en relación con el grado de calcificación del callo. Los valores muy altos corresponden a callos muy recientes con contenido relativamente bajo en calcio. Con el aumento de la calcificación van descendiendo. En dos callos fibrosos de pseudoartrosis, los valores fueron muy bajos y nulos.

OCTAVA

No existen relaciones entre los valores de fosfatasa en callo y los de fosfatasemia. Los callos humanos no hidrolizan la lecitina.

NOVENA

Los valores de fosfatasa en músculo normal, son inferiores a los del hueso. Los valores de fosfatasa en músculo peri-

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

fracturario humano, no son mayores que los valores medios de fosfatasa en músculos normales. En el conejo tampoco existen diferencias entre la actividad de fosfatasa del músculo perifracturario y el homólogo de la pata opuesta.

DÉCIMA

Los valores de calcio en músculo perifracturario en el conejo son inferiores a los del músculo de la pata homóloga. En cambio, los de fósforo, son sensiblemente análogos.

UNDÉCIMA

La inyección de glicerofosfato sódico en la pata fracturada del conejo obra de diferente manera, según que se inyecte desde el primer día de producida la fractura o al cabo de una semana. En el primer caso se retarda la consolidación; en el segundo, parece que se acelera.

DUODÉCIMA

La inyección de fosfatasa renal en dosis totales de 1.350 a 9.450 U, en el foco de fractura en el conejo, no influye sobre la consolidación. El estudio de la actividad de fosfatasa de estos callos, muestra que la fosfatasa inyectada no es retenida en el foco de fractura.

DÉCIMO TERCERA

La participación de la fosfatasa en el proceso de la consolidación de las fracturas, está supeditada a otros factores, principalmente la reacción del medio.

XII

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERS. — Über eine einfache Methode zur Darstellung hochaktiver Phosphasepräparate aus tierischem Material. *Hoppe Seilers Ztschr. f. physiol. Chem.*, 232, 189 (1935).
- ALBERS. — Über Nierenphosphatase. *Hoppe Seilers Ztschr. f. physiol. Chem.*, 232, 165 (1935).
- AUHAGEN UND GRZYCKI. — Der Einfluss von Fluorid auf die Phosphatasewirkung. *Biochem. Ztschr.*, 265, 217 (1933).
- AUSTONI ET COGGI. — La phosphatase du plasma dans différentes affections. *Presse méd.*, II, 1.594 (1934).
- AXHAUSEN. — Die Behandlung der schlechtheilender Knochenbrüche. *Deutsche med. Wchnschr.*, 1.686 (1926).
- BAJ. — Calcium content of the blood during callus formation. *Giorn. d. Batterio. e Immun.*, 2, 94 (1927), cit. per BANCROFT.
- BAKWIN AND BODANSKY. — Factors influencing the measurement of the phosphatase activity of tissue extracts. *J. Biol. Chem.*, 101, 641 (1933).
- BAMMAN. — Tierische Fermente (Esterasen, Phosphatasen). *Oppenheimer Hbch. Biochem. d. Mensch. u. d. Tiere. Ergänzungswerk I*, Bd., 422 (1933), FISCHER.
- BANCROFT. — Process of union after fracture. *Ann. Surg.*, 90, 546 (1929).
- BANKOFF. — Die Frakturheilung und ihre mechanische und biologische Förderung. *Arch. f. klin. Chir.*, 179, 256 (1934).
- BAUER, AUB AND ALBRIGHT. — Calcium and Phosphorus Metabolism. Bone Trabeculae as Source of Calcium. *J. Exper. Med.*, 49, 145 (1929).

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

- BERGMANN.—Callusbildung und innersekretorische Einflüsse. Deutsche Ztschr. Chir., 233, 302 (1931).
- BIER.—Die Bedeutung des Blutergusses für die Heilung des Knochenbruches. Heilung von Pseudoarthrosen und von verspäteter Callusbildung durch Bluteinspritzung. Med. klin., 6, 34 (1905).
- BIER. — Beobachtungen über Regeneration beim Menschen. Deutsche med. Wschr., 1.057 y 1.121 (1917).
- BIER. — Reiz und Reizbarkeit. München. med. Wchnschr., 1.473 y 1.521 (1921).
- BIER. — Über Knochenregeneration; über Pseudoarthrosen und über Knochentransplantate. Arch. f. klin. Chir., 127 (1918):
- BLOCK.—Die normale und gestörte Knochenbruchheilung. Neue dtsh. Chir., Bd. 62. Enke (1940).
- BODANSKY.—Determination of Plasma Phosphatase. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 28, 760 (1931).
- BODANSKY.—Determination of Serum Phosphatase. Factors influencing the Accuracy of the Determination. J. Biol. Chem., 101, 93 (1933).
- BODANSKY.—Non osseus origins of Serum Phosphatase. Its increase after ingestion of carbohydrates. J. Biol. Chem., 104, 473 (1934).
- BODANSKY. — Determination of Inorganic Phosphatase: Beer's Law and Interfering Substances in the Küttner-Lichtenstein Method. J. Biol. Chem., 99, 197 (1932).
- BODANSKY AND JAFFE.—Serum Phosphatase in diseases of the Bone: Interpretation and Significance. Arch. int. Med., 54, 88 (1934).
- BODANSKY AND JAFFE.—Effects of diet and Fasting on Plasma Phosphatase. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 29, 199 (1931).
- BODANSKY AND JAFFE. — Serum Phosphatase after Bile Duct Ligation in the Dog. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 31, 1.179 (1934).
- BODANSKY, JAFFE AND CHANDLER.—Serum Phosphatase Changes in calcium deficiency and in amonium chlorid osteoporosis. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 29, 871 (1932).
- BODANSKY, JAFFE AND CHANDLER.—Experimental Factors influencing Blood Phosphatase Values. J. Biol. Chem., 97, CXVI (1932).
- BONOME.—Zur Histogenese der Knochenregeneration Virchows Arch. f. path. Anat., 100, 293 (1885).
- BORST.—Vigantol und Frakturheilung. Zentralbl. f. Chir., 27, 3.266 (1927).
- BOSHAMER.—Nierensteinbildung und Unfall. Arch. f. Orthop., 32, 84 (1933).

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

- BOTTERELL AND KING.—Phosphatase in fractures. *Lancet*, I, 1.267. (1935).
- BUCHER. — Über das Wesen der Kalkimprägnation in Lichtwitz Medizinische Kolloidlehre, Verlag Steinkopff. 335. (1935).
- BLUM, DELAVILLE ET V. CAULERT. — Sur le rapports entre l'état physicochimiques des humeurs et les phenomenes d'ossification et de decalcification. *Compt. rend. Soc. de biol.*, 92, 182 (1925).
- BRANCATI. — Il principio teleologico sul processo di riparazione delle fratture. *Policlinico (sez. prat.)*, 40, 685 (1933).
- BRASAVAN UND SERDARUSIT. — Versuche über die Fluornatriumwirkung bei Knochenresektion. *Arch. f. klin. Chir.*, 184, 171 (1935).
- BRUGSCH.—Über die Hexosadiphosphatase der Muskulatur und Leber und ihre Spaltprodukte. *Biochem. Ztschr.*, 164, 199 (1925).
- CAMPBELL.—Ununited fractures. *Arch. Surg.*, 24, 900 (1932).
- CASTAGNI. — Influenza della radiazioni ultra-violetta nella formazione del callo osseo. *Chir. d. org. di movimento*, 18, 936 (1933).
- COLLAZO, RUBINO Y VARELA. — Die Rolle des Vitamins D für die Regeneration des Knochengewebes. *Arch. f. klin. Chir.*, 158, 214 (1930).
- COOLEY.—Mineral Metabolism ununited Fractures. *Am. J. Dis. Child.*, 50, 431 (1935).
- CHABANIER, LOBO ONELL ET CASTRO GALHARDO. — Action du traumatisme sur la repartition du chlore et du sodium entre le sang et les tissus et sur l'équilibre acide-base. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 17, 1.145 (1935).
- CHANDLER. — The healing of fractures in parathyroidectomized Albino Rats. *Anat. Rec.*, 35, 7 (1927).
- DEMUTH. — Über Hexosaphosphatasen im menschlichen Organen und Körperflüssigkeiten. *Biochem. Ztschr.*, 159, 415, 166, 162 (1925).
- DREGSTEDT AND KEARNS. — Experimental Study of Bone Repair. *Arch. Surg.*, 24, 893 (1932).
- EDEN.—Über Verknöcherung und über die Grundlagen und bisherigen Ergebnisse der Enpritzungen von Phosphatlösungen besonder des Natrium-Glikokoll - Phosphates bei verzögerter Frakturheilung. *München. med. Wschnschr.*, 1.160 (1924).
- EDEN. — Untersuchungen über Vorgänge bei Verknöcherung. *Klin. Wschnschr.*, 1.798 (1923).
- ENGEL. — Über die Beeinflussung der Callusbildung durch Hormone. *Deutsche Ztschr. Chir.*, 242, 213 (1934).
- ERDTMAN. — Über Nierenphosphatase und ihre Aktivierung. *Hoppe Seilers Ztschr. f. physiol. Chem.*, 172, 182 (1927).

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

- EULER.—Chemie der Enzyme (1925).
- FINE AND BROWN.—Influence of paratyroid extract Collip on Bones regeneration. *New England J. Med.*, 198, 932 (1928).
- FISCHER.—Über Bakteriengifte als Knochenneubildungsreiz. *Arch. f. klin. Chir.*, 167, 195 (1931).
- FRÄNKEL.—Hauptwirkungen der allgemeinen Regenerationshormone. *Arch. f. klin. Chir.*, 155, 2 (1929).
- FRANSEEN AND Mc. LEAN.—Phosphatase activity of tissues and plasma in tumors of bone. *Am. J. Cancer*, 24, 299 (1935).
- FREUDENBERG UND GYORGY.—Die Verkalkungsvorgang bei der Entwicklung des Knochens. *Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderh.*, 24, 17 (1923).
- FREUDENBERG UND GYORGY.—Kalkbindung der tierischen Gewebe. *Biochem Ztschr.*, 110, 299 (1920), 115, 96 (1921), 118, 50 (1921), 121, 131 y 142 (1921), 124, 299 (1921), 129, 134 (1922), 142, 407 (1923).
- FREUDENBERG.—Die biologische Bedeutung der Phosphatester der Blutkörperchen. *Klin. Wschnschr.*, 1.530 (1935).
- GHIRON.—L'importanza delle paratiroide secondo le odierne vedute. Pozzi (1924).
- GONZÁLEZ-AGUILAR y BUSTO.—Calcemia, paratiroides y patología ósea. *Progresos de la Clín.*, núm. 299 (1931).
- GÖTZE UND BRACKERTZ.—Die histologische Unterschiede der subkutanen und der operativen Frakturheilung. *Arch. f. klin. Chir.*, 178, 570 (1933).
- GÖTZE.—Grundsätzliches zur Knochenbruchheilung. *Zentralbl. f. Chir.*, 1.003 (1928).
- GRASSMANN.—Neue Methode und Ergebnisse der Enzymforschung, 81, 75 (1928).
- GREUNE.—Experimentelle Untersuchungen über örtliche Verchiebungen der aktuellen Reaktion bei Knochenbrüchen. *Inaug. Diss. Würzburg* (1931).
- GUSSAROW.—Kalkspiegel im Blutserum bei experimentellen Knochenfrakturen. *Arch. f. klin. Chir.*, 155, 39 (1933).
- HÄBLER.—Physikalisch-chemische Probl. in der Chir. Springer (1930).
- HACHENBURG.—Zur Beeinflussung der Frakturheilung durch Vigantol. *Deutsche med. Wschnschr.*, 1.959 (1932).
- HALASZ UND MARX.—Ist die Callusbildung durch Zuführung von Vitamin beeinflussbar? *Arch. f. klin. Chir.*, 169, 121 (1932).
- HASTINGS, SENDROY AND MURRAY.—*J. Biol. Chem.*, 71, 723 (1927), cit. por ROBINSON.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

- HELLMUTH UND TIMPE. — Die Änderung des Kalkspiegels und der Zustandsform des Calciums in der Schwangerschaft. Arch. f. Gynäk. 141, 479 (1930).
- HELLNER. — Der Einfluss des Vigantols auf den Frakturcallus beim gesunden Versuchstiere. Deutsche Ztschr. Chir., 209, 307 (1928).
- HENSCHEN. — Citado por HOFFMEISTER y por BLOCK.
- HERRMANN. — Experimentelle Untersuchungen über chemische Vorgänge bei der Krakturheilung und ihre Beschleunigung. Arch. f. klin. Chir., 130, núm. 1, 2 (1924).
- HEYDEMANN. — Knochenbruchheilung und innere Sekretion. Beitr. z. klin. Chir., 162, 362 (1935), Übersicht.
- HEYDEMANN. — Gesetzmässigkeiten der Knochenatrophie nach Frakturen. Beitr. z. klin. Chir., 157, 561 (1935).
- HEYMANN. — Die Wirkung von bestrahltem Ergosterin und Nebenschilddrüsenhormon auf Gewebephosphatasen. Biochem. Ztschr., 227, 1 (1930).
- HEUBNER. — Mineralstoffwechsel des Tierkörpers. Bergmann-Bethe Hbch. d. norm. u. path. Physiol. Bd., 16, 1.416. Springer (1931).
- HESSE UND BERNDT. — Kalkresorption und Kalkretention bei verschiedener Ernährung. Klin. Wschnschr., 1.607 (1935).
- HEITZ-BOYER ET SCHEIKEVITCH. — Du processus osteogenetique de reparation après le fracas osseux de guerre. Compt. rend. d. Soc. d. Biol., 81, 192 (1918).
- HOFFMEISTER. — Über Ablagerung und Resorption von Kalksalzen in den Gewebe. Ergebnisse d. Physiol., II, 429 (1910).
- HOFFMEISTER. — Blutkalkspiegel bei Knochenbrüchen und Erkrankungen. Deutsche Ztschr. Chir., 240, 414 (1935).
- HOFFMEISTER. — Beeinflussung schlechtheilender Frakturen durch ein eiweissfreies Extrakt aus Knochenkeimgewebe. München. med. Wschnschr., 1.055 (1935).
- HOWES AND MC. KEOWN. — Influence on a diet rich in casein on the strength of bone and the healing of fractures. Arch. Surg., 29, 786 (1934).
- HUNSBERGER AND FERGUSON. — Variations in Phosphatase and inorganic Phosphorus in serum during fracture repair. Arch. Surg., 24, 1.052 (1932).
- ISRAEL UND FRÄNKEL. — Versuche über den Einfluss der Avitaminose auf die Heilung von Knochenbrüchen. Klin. Wschnschr., 94 (1926).
- ISRAEL. — Einfluss der Schwangerschaft auf die Frakturheilung. München. med. Wschnschr., 949 (1927).
- JAFFE AND BODANSKY. — The effects of Parathormone and Ammonium

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

- Chloride on the Bones of Rabbits. *J. Exper. Med.*, 55, 695 (1932).
- JAFFE, BODANSKY AND BLAIR.—Rate of decalcification and the sites of bone lesions in experimental hyperparathyroidism. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 28, 795 (1931).
- JAKOBSON.—Zur Spezifität der Phosphatasen. *Biochem. Ztschr.*, 250, 304 (1931).
- JENNER AND KAY.—A clinical Method for the determination of plasma Phosphatase. *Brit. J. exper. Path.*, 13, 22 (1932).
- JENNER AND KAY.—The phosphatasen of mamalian tissues. *J. of. biol. Chem.*, 97, 735 (1931).
- JIMENEZ DIAZ, CLARIANA y BASSADONE.—Über die Phosphatasen des Blutplasmas bei "reumatischen" Erkrankungen. *Klin. Wschnschr.*, 277 (1935).
- KAMADA.—The callus Phosphatase and its participation in the healing of fracture. *Fukuoka Acta Med.*, 25, 207 (1932). *Referata Chem. Abstracts*, 26, 6.001 (1932).
- KAPPIS.—Weitere Erfahrungen mit der Sympathektomie bei verzögerter Konsolidation u. s. w. *Klin. Wschnschr.*, 1.441 (1923).
- KAPSAMER.—Zur Frage der knorpeligen Callusbildung *Virchows. Arc. f. path. Anat.*, 152, 157 (1898).
- KAY.—Plasma Phosphatase, particularly in Bone Diseases. *J. Biol. Chem.*, 89, 249 (1930).
- KAY.—Plasma Phosphatase One Method of determination. Some properties of this Enzyme. *J. biol. Chem.*, 89, 235 (1930).
- KAY.—A source of error in N and P determinations on filtrates obtained after precipitation of tissue colloids by trichloroacetic and or other strong acid. *J. biol. Chem.*, 93, 727 (1931).
- KAY.—Phosphatase in Growth and disease of bone. *Physiol. Rev.*, 12, 384 (1932).
- KAY.—Kidneyphosphatase. *Biochem. J.*, 20, 791 (1926).
- KAY.—Pyrophosphatase. *Biochem. J.*, 22, 1.446 (1928).
- KAY.—Changes in phosphoric ester content of the red blood cells and the liver in experimental rickets. *J. Biol. Chem.*, 99, 85 (1932-33).
- KAY AND LEE.—The rate of α and β glycerophosphates by enzyme. *J. biol. Chem.*, 91, 135 (1931).
- KEY AND MOORE.—Healing of fractures of defects in bone and of defects in cartilage after sympathectomy. *Arch. Surg.*, 26, 272 (1933).
- KING AND ARMSTRONG.—A. R. *Canad. Med. Assoc. Jour.*, 376 (1934), cit. por BOTTERELL.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

- KLEINMANN. — Die Zustandsform des Calciums in Geweben und Gewebssäfte. Biochem. Zstchr., 196, 98 (1928).
- KLEINMANN UND REMESOW. — Untersuchung über die Azidität des Gewebes bei der dystrophischen Verkalkung. Biochem. Zstchr., 196, 146 (1928).
- KLEINMANN. — Experimentelle Verkalkung durch Zuführung von Kalksalzen. Biochem. Zstchr., 196, 161 (1928).
- KLINKE. — Der Mineralstoffwechsel. Springer (1931).
- KNOPFLACH. — Behandlung der Knochenbrüche mit bestrahltem Ergosterin. Wiener med. Wschnschr., 739 (1928).
- KOLDAJEW UND ALTSCHÜLLER. — Über die Phosphatase des Blutes bei Knochentuberkulose. Beitr. z. Klin. d. Tuberk., 83, 433 (1933).
- KOLODONY. — Endocrine disturbances and fractures. Surg. Gynec. Obst. (1924), cit. por REDWITZ.
- KÖNIG. — Über den Abbau am gebrochenen Knochen, sein Wesen und seine Bedeutung. Arch. f. klin. Chir., 146, 624 (1927).
- KROMPECHER. — Die Knochenbildung. FISCHER. Jena (1937).
- KUBANY. — Callusbildung und Säurebasengleichgewicht. Arch. f. klin. Chir., 158, 203 (1930).
- KUGELMASS AND BERG. — Ossification, callus formation and calcification. Am. J. Dis. Child., 41, 236 (1931).
- KUTSCHER. — Über Harnphosphatase. Hoppe Seilers. Zstchr. f. physiol. Chem., 235, 62 (1935).
- KUWABARA. — Metabolism of cartilage and callus tissue. J. Biochem., 16, 389 (1932).
- LANDAUER AND UPHAM. — Effect of bone extract on phosphatase content of bones of creeper fowl. J. biol. Chem., 108, 12 (1935).
- LEHMANN AND COLE. — Parathiroidhormone and the calcification of fracture callus. J. A. M. A., 89, 587 (1927).
- LERICHE ET POLICARD. — Pourquoi un os se repare-t-il? Presse méd., 68 (1925).
- LERICHE ET POLICARD. — La Physiologie normale et pathologique de l'os. Masson 1926.
- LERICHE ET POLICARD. — Physiologie pathologique chirurgicale. Masson 1930.
- LERICHE ET POLICARD. — Position actuelle du probleme de l'osteogenese. Presse méd., 169 (1934).
- LEXER. — Die Überpflanzung von Knochen, Periost und Mark in Die freien Transplantationen Neue Deutsche Chirurgie 26 b. Teil. II, 1924.

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

- LEXER.—Pseudoarthrosis. Arch. f. klin. Chir., 119, 520 (1922).
- LEXER.—Lehrbuch der allgemeinen Chirurgie Enke. 1931.
- LEXER, E. W.—Über den zeitlichen Ablauf der Heilvorgänge am Knochenbruch. Beitr. z. klin. Chir., 159, 372 (1934).
- LINDSAY.—Observations on fracture healing in rats J. Bone and Joint Surg., 16, 162 (1934).
- LIPMANN.—Versuche zum Mechanismus der Fluoridwirkung. Biochem. Ztschr., 196, 3 (1928).
- LOHMANN UND JENDRASSIK.—Biochem. Ztschr., 178, 418 (1928), cit. por RONA.
- LUCCHESSE.—L'influenza delle surrenali sulla formazione del callo osseo. Policlinico (sez. chir.), 579 (1934).
- MACEVEN.—Role of various elements in the development and regeneration of bone. Philos. Trans. roy. Soc., London, 199, 253 (1908).
- MAC KEOWN AND OSTERGREEN.—The phosphatase content of fractured Bone Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 26, 600 (1932).
- MARCHAND.—Der Prozess der Wundheilung mit Einschluss der Transplantation. Deutsche Chir., 16, Stuttgart Enke. (1901).
- MARTIN.—Über Regeneration der Röhrenknochen. Arch. f. klin. Chir., 113, 1 y 114, 664 (1920).
- MARTIN.—Bruchhíperämie und Callusbildung. Arch. f. klin. Chir., 130, N.º 1 y 2 (1924).
- MARTLAND AND ROBINSON.—The preparation and use of the bone phosphatase. Biochem. J., 23.237 (1929).
- MARTLAND.—The phosphoric-esterase of blood at various hydrogen concentrations. Biochem. J., 19, 117 (1925).
- MARTLAND.—The phosphoric-esterase of blood. Biochem. J. 18, 1.152 (1924).
- MATTI.—Las fracturas y su tratamiento. Labor (1934).
- MONDRY UND BÖMINGHAUS.—Untersuchungen über den Einfluss saurer und alkalischer Ernährung auf die Knochenregeneration. Arch. f. klin. Chir., 161, 273 (1930).
- MOUZON.—Existet'il des moyens médicaux pour hatter le consolidation des fractures? Presse méd., 36, 1.063 (1928).
- MÜLLER.—Die normale und pathologische Physiologie des Knochens. Barth (1924).
- MURRAY.—Delayed and non union in fractures in the adult. Ann. Surg., 93, 961 (1931).
- MURRAY.—Healing of fractures. Arch. Surg., 29, 446 (1934). (Abundante bibliografía).

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

- OGAWA.—Epitelkörperchen und Schilddrüse in Ihren Beziehungen auf Frakturheilung und Knochenkalk. Arch. exp. Pathol. und. Pharm., 109, 83 (1925).
- OLLIER.—Traite experimental et clinique de la regeneration des os. Paris (1867).
- OWEN.—The problem of delayed union and ununited fracture. Ann. Surg., 95, 759 (1932). (Visión de conjunto).
- PAGE.—Die Wirkung von Parathyroidextract auf Blutphosphatase. Biochem. Zstchr., 226, 273 (1930).
- PANKRATIEW.—Zum Problem biologischer Behandlung der Knochenbrüche. Arch. f. Orthop., 32, 424 (1932).
- PASQUALINO.—Variazioni del contenuto in calcio, magnesio e fosforo inorganico nel siero di sangue dei canni fraturatti durante il periodo de formazione del callo osseo. Rivista di pat. sper., 9, 195 (1932).
- PAUWELS.—Der Schenkelhalsbruch ein mechanisches Problem. Enke (1935).
- PERVES.—Fractures et calcemie. Compt. réd. Soc. de Biol. 110, 1.249 (1932).
- PERVES.—Sur le taux de la calcemie au cours de la consolidation des fractures. Compte. rend. Soc. Biol., 114, 526 (1933).
- PETERSEN.—An experimental study of ununited fractures whit special reference to the inorganic bone forming elements in the Blood serum. Johns. Hopkins Hosp. Bull., 35, 378 (1924).
- PETROW.—Zur Frage nach der Quelle der Regeneration und der Knochenüberpflanzung. Arch. f. klin. Chir., 105, 915 (1914).
- PFAUNDLER.—Über die Kalkabsorption tierischen Gewebe und über Grundlagen einer neuen Rachitistheorie. München med. Wschnschr. 1.577 (1905).
- POCHHAMMER.—Über die Entstehung parostaler Kallusbildungen und die kunstliche Kalluserzeugung an Tieren und beim Menschen. Arch. f. klin. Chir., 94, 352 (1911).
- PODKAMINSKY.—Über Fermente in der Synovia und deren Bedeutung. Arch. f. klin. Chir., 165, 383 (1931).
- POTTS.—Role of hematoma. in fracture healing. Surg. Gynec. Obst., 57, 318 (1933).
- PINCUSSEN UND NEUMANN.—Über die Beziehungen der Knochenbruchheilung zu chemischen Veränderungen im Blute und ihre Beinflussung durch Calcium-Vitamin Behandlung. Arch. f. klin. Chir., 165, 483 (1931).
- PINCUSSEN.—Micrométodos. Salvat. 1929.

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

- RABL. — Über die Kalkablagerung bei der Knochenentwicklung. *Klin. Wschr.*, 1.644 (1925).
- RAPPAPORT. — Mikrochemie des Blutes. Hain (1935).
- RAVDIN AND D. JONAS. — Studies of calcium and phosphor metabolism in the fractures bones. *Ann. Surg.*, 84, 37 (1926).
- REDWITZ V. — Der Derzeitige Stand der Pseudarthrosenfrage. *Arch. f. klin. Chir.*, 182, 649 (1935), Übersicht. (Abundante Bibliografia).
- REHN. — Fraktur und Muskel. *Arch. f. klin. Chir.*, 127, 640 (1923).
- REGEN AND WILKINS. — The influence of Röntgenirradiation on the rate of healing of fractures and the phosphatase activity of the callus adult bone. *J. Bone and Joint Surg.*, 28, 61 (1936).
- ROBINSON. — Bone phosphatase. Ergebnisse der Enzymformchung von Nord-Weidenhagen, I, Bd. 280 (1932). Akad. Verlagsgesellschaft Leipzig.
- ROBINSON. — The significance of the esters phosphorics in metabolism. New-York, The New-York University Press. (1932).
- ROBINSON. — The possible significance of hexosaphosphoric esters in ossification. The encyme in the early stages of bone development. *Biochemic. J.*, 18, 1.354 (1924).
- ROCHE. — Über die Phosphatase des Blutes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 13, 841 (1931). *Ref. Chem. Zentralbit.*, II, 720 (1932).
- RONA. — Praktikum der Physiologischen Chemie. Zweiter Teil Blut und Harn. Springer (1929).
- ROSS. — Relation of the paratyroids to the healing of a fracture as controlled by Röntgen Rays. *Arch. Surg.*, 16, 922 (1928).
- ROHMANN. — Über künstliche Ernährung und Vitamine (1916).
- ROUX. — Das Gesetz der Transformation des Knochens. Theorie der funktionellen Anpassung. *Berliner klin. Wschr.* (1923), cit. por SCHILLING.
- RHODE. — Über den Ablauf der Regenerationsvorgänge am Röhrenknochen bei erhaltenem und geschädigter Gefäßversorgung, zugleich ein Beitrag über Herkunft und Entstehungsbedingungen des Bindegewebes nach Knochenverletzungen. *Arch. f. klin. Chir.*, 123, 530 (1925).
- RHODE. — Beiträge zur Frage der Methaplasie des Bindegewebes im Knochen. *Arch. f. klin. Chir.*, 129, 435 (1924).
- SCHADE. — Physikalische Chemie in der inneren Medizin. Steinkopff, (1923).
- SCHMIDT UND OBRASTZOW. — *Biochem. Ztschr.*, 172.262 (1926) cit. por HÄBLER.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

- SCHOTTE. — Die therapeutische Beeinflussung der Knochenregeneration. Deutsche med. Wschnschr., 849 (1931).
- SCHULZE UND ZSHAN. — Über die topographische Verteilung des Kalium und Calcium im gesunden und krankhaftveränderten Gewebe. Frankfurter Zstchr. f. Pathol., 48, 51 (1935).
- SCHWARZ, EDEN UND HERMANN. — Chemische Vorgänge bei der Verknöcherung und deren Beeinflussung. Biochem. Zstchr. (1924). Cit. por EDEN.
- SCHILOZEW. — Der Einfluss der Avitaminose auf die Heilung von Knochenbrüchen. Deutsche Zstchr. Chir., 209, 320 (1928).
- SCHILLING. — Das Pseudarthrosenproblem und seine Beziehungen zur normalen Knochenregeneration. Beitr. z. klin. Chir., 157, 121 (1933).
- SEEMEN v. UND SEELIGER. — Citados por HOFFMEISTER.
- SEGOVIA J. — El proceso de la consolidación de las fracturas. Arch. Med. Cir. Espec., 20, 97 (1925).
- SEGOVIA J. — Über das Verhalten des Calciums während der Frakturheilung. Zstchr. orthop. Chir., 48, 572 (1927).
- SHIPLEY, KRAMER AND HOWLAND. — Calcification of rachitic bones *in vitro*. Am. J. Dis. Child., 30, 37 (1925).
- SHIPLEY, KRAMER AND HOWLAND. — Studies upon calcification *in vitro*. Biochem. J., 20, 379 (1926).
- SKOSSOGORENKO. — Zur Frage über die osteogenetische Beteiligung der Muskeln bei der Konsolidation der Röhrenknochen. Arch. f. Orthop., 30, 125 (1931).
- SMITH AND MAIZELS. — Plasma Phosphatase in rickets and scurvy. Arch. Dis. Childhood, 7, 149 (1932).
- SPEED AND RIEDER. — Experimental healing of bone after parathyroidectomy. Arch. Surg., 21, 679 (1930).
- STEARNS AND WARWEG. — Phosphorus Partition in whole blood and in serum calcium and plasma phosphatase during healing of late rickets. Am. J. Dis. Child., 49, 79 (1935).
- TAMMAN. — Über die Vitasterinschädigung der Frakturheilung. Arch. f. klin. Chir., 165, 473 (1931).
- TANKO UND ROBINSON. — Die Hydrolyse von Hexosadiphosphorsäure-ester durch Knochenphosphatase. Biochem. J., 29, 961 (1935). Ref. Chem. Zentralbl., II, 2.532 (1935).
- TIMPE. — Frakturheilung und Mineralstoffwechsel. Deutsche Zstchr. Chir., 237, 31 (1932).
- TIMPE. — Das Auftreten und die Wirkung von Phosphatasen an der Bruchstelle. Deutsche Ztschr. Chir., 241, 505 (1933).

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

- TISDALL AND HARRIS. — Calcium and Phosphorus Metabolism in Patients with Fractures. *J. A. M. A.*, 79, 888 (1922).
- THOMPSON AND SWARTS. — The influence of the thyroid and parathyroid glands on the healing of fractures. *J. A. M. A.*, 57, 724 (1911).
- TSUNODA. — Experimentelle Studien zur Frage der Knochenbildung aus verlagerten Periostblasten. *Virchows Arch. f. path. Anat.*, 200, 93 (1910).
- ULRICH. — Experimentelle Beiträge zur Pathogenese der rachitischen Ossifikationsstörung bei Mensch und Tier; vergleichende Untersuchungen über das biochemische Verhalten von rachitischen Skelettmaterial bei Mensch und Tier. *Ztschr. f. Kinderhik.*, 47, 105 (1929).
- UMENO. — Studien über Phosphatase. *Biochem. Ztschr.*, 251, 317 (1931).
- VARA LOPEZ. — Experimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung der Frakturheilung durch Vigantol. *Deutsche Ztschr. Chir.*, 212, 101 (1928).
- VIRCHOW. — Citado por v. REDWITZ.
- VOGEL. — Über Frakturheilung mit besonderer Berücksichtigung der Bedeutung des Blutergusses für die Callusbildung. *Deutsche Ztschr. Chir.*, 91 (1908).
- VOLKMANN. — Über posttraumatische Nierensteine. *Arch. f. klin. Chir.*, 171, 86 (1932).
- WATANABE. — Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss der Avitaminose auf die Heilung von Knochenfrakturen. *Virchows Arch. f. path. Anat.*, 251, 281 (1924).
- WATT, J. — *Arch. Surg.*, 983 (1925). Cit. por HÄBLER.
- WEIDENRYEICH. — Das Knochengewebe, in v. MÖLLENDORF Hbch. d. mikrosk. Anat. d. Menschen, II, 2, 391 Springer. (1930).
- WELLS. — Calcification and ossification. *Arch. int. Med.*, 7.721 (1911).
- WERECHINSKY. — Vergleichende Untersuchungen über Explantation und Transplantation von Knochen, Periost und Endost. *Virchows Arch. f. path. Anat.*, 251, 268 (1924).
- WILKINS, REGEN AND CARPENTER. — Phosphatase of biopsy tissues in progressive myositis ossificans with report of case. *Am. J. Dis. Child.*, 49, 1.229 (1935).
- WILKINS AND REGEN. — Course of phosphatase activity in healing of fractured bone. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 32, 1.373 (1935).

Phosphatase und Knochenbrüche

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird der biochemische Mechanismus erklärt, durch welchen nach den heutigen Untersuchungen die Bruchcallusverkalkung sich vollzieht, sowie unsere Ergebnisse, die sich auf die Rolle beziehen, welche die Phosphatase in dem Prozess der Knochenbruchheilung spielt.

Voraussetzung für das Zustandekommen der Verkalkung ist das Vorhandensein an der Bruchstelle von Ca- und PO_4 -Ionen in hinreichender Konzentration, damit das Produkt derselben das Löslichkeitsprodukt des Kalziumphosphates übersteigt, und damit der Niederschlag stattfindet.

Die Herkunft des Kalziums ist eingehendst untersucht worden, und offenbar stammt ein grosser Teil des Kalziums von den Bruchenden und den den Bruch umgebenden Muskeln. Dagegen erscheint die Herkunft des für die Verkalkung notwendigen anorganischen Phosphors viel dunkler, ja man hat im Verfolgung des ROBINSON schen Gedankens an die gewaltigen Vorräte, die die organischen phosphorhaltigen Verbindungen darstellen, gedacht. Dank eines Gärungsprozesses können PO_4 Ionen frei werden, in dem Masse wie der Körper sie braucht. Diese organischen phosphorhaltigen Verbindungen, die phosphorhaltigen Esters, befinden sich im Blute und in den Geweben.

Schwer abzugrenzen ist die Rolle des Blutes als Zubringemittel mineralischer Stoffe zum Bruchcallus. Die geringe Erhöhung der Phosphatasämie tritt in einem sehr vorgeschrittenen Stadium der Knochenbruchheilung ein, und ist bedeutend ausgeprägter wenn Knochenschwund, und zwar unabhängig von der Callusverkalkung besteht. Es scheint sich also um eine sekundäre Hyperphosphatasämie zu handeln. Die Erhöhung des Phosphorgehaltes im Blute während der Knochenbruchheilung trifft gewöhnlich nicht mit der Hyperphosphatasämie zusammen, sondern es besteht eine weitgehende Unabhängigkeit zwischen beiden, wenn auch im Serum die Fermentkonzentration im direkten Verhältniss, bis zu einer gewissen Grenze, zu der Befreiung von anorganischem Phosphor steht, es ist also daran zu denken, dass das von der Phosphatase befreite Phosphor in den Fällen von Hyperphosphatasämie aus dem Serum entweicht.

Die Untersuchung der mineralischen Stoffe Kalzium und Kalium im Serum erlauben keine Schlüsse über die Bedeutung des Blutes als Zubringer jener Stoffe zum Bruchcallus. Sie gibt uns nur Aufschluss, über die Art, wie die Regulierungsmechanismen (Epithelkörper u. s. w.) arbeiten. Während der Knochenbruchheilung sind diese Werte normal.

Der die Bruchstelle umgebende Muskel trägt seinerseits zu der

Zuführung von Kalzium zum Bruchcallus bei. Denn die Werte des Kalziums in dem umgebenden Muskel sind immer geringer als in dem Muskel des entsprechenden Beines bei Kaninchen.

«Es genügt der Nachweis, dass die Phosphatase im Knochen vermehrt und das Kalzium herangezogen wird (im löslicher Form), um die Verkalkung zu erklären.» So behauptet RABL und bestätigt HÄBLER. Jedoch ist die Phosphatasewirkung weit davon entfernt, identisch mit der Verkalkung zu sein. Nach unseren Untersuchungen vermindert sich die Aktivität der Phosphatase bei menschlichen Bruchcallus in dem Masse als sich die Callus verkalken. Wir haben gerade die grösste Aktivität bei Callus beobachtet, in welchen die Verkalkung noch nicht stattgefunden hatte. Die Beteiligung der Phosphatase an der Knochenbruchheilung hängt von anderen örtlichen Faktoren ab. Besonders von der Reaktion des Milieus. Die Verschiebung der Reaktion der Callusgewebe, zuerst nach der sauren Seite und die Wiederherstellung der normalen Reaktion in einem vorgeschrittenem Stadium der Knochenbruchheilung ist Voraussetzung für die Heilung. Die erstere steht in Beziehung mit der Konzentration der Ca-Ionen und ihre Fixation, und die zweite ist unbedingt nötig, damit die Phosphatasewirkung stattfinden kann.

Darum ist es erklärlich, dass die Einspritzung von alkalischen, phosphorhaltigen, organischen Stoffen im Frühstadium, durch welche sich die phosphatasische Hydrolyse *in vivo* zu früh einstellen würde, die Knochenbruchheilung verzögern könnte.

Um es auf schematische Weise auszudrücken, können wir sagen, dass die Fixation des Kalziums in dem Eiweiss des vorläufigen Callus, in der Saurenphase und die Befreiung des PO_4 Ionen in der leicht alkalischen Phase der Wiederherstellung der normalen Bedingungen in dem physikalisch-chemischen Prozess der Knochenbruchheilung stattfindet.

In vitro gibt uns das Ausmass der Phosphataseaktivität der Gewebe, die potenzielle Aktivität derselben, zumal wir unter ausgezeichneten Bedingungen arbeiten. Es gibt uns nicht an, ob die Hydrolyse sich im Organismus vollzieht, wenn die Bedingungen *in vivo* sich nicht denjenigen nähern, unter welchen wir die Bestimmung ausführen.

Der Versuch, mittels Einspritzung grösserer Dosen hochaktiver Phosphatase-Nierenpräparate—nach dem Verfahren ALBERS dargestellt—künstlich eine grössere Phosphataseaktivität aufzuspeichern, scheidet daran, dass die Callusgewebe das Ferment nicht fixieren, oder das Ferment durch den Callus inaktiviert wird. Die für die Fixation notwendigen Bedingungen sind uns unbekannt. Daher ist das praktische Resultat der Phosphatase-Einspritzung in den Bruchherd, um die Knochenbruchheilung zu beschleunigen, gleich null.

Es genügt demnach nicht, dass die Phosphataseaktivität erhöht ist, wie RABL behauptet, um den Niederschlag des Kalziumphosphats zu erklären; die Phosphatase in der Knochenbruchheilung ist nichts weiter als ein Glied in der langen Kette der biochemischen Faktoren, welche die Verkalkung beherrschen.

BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICACIÓN DEL CALLO

Um die Bedeutung der Phosphatase bei der Knochenbruchheilung einem näheren Studium zu unterziehen, haben wir die folgenden Untersuchungen angestellt:

1. Untersuchung der normalen Phosphatasewerte im Serum, Muskel- und Knochengewebe des Menschen. Untersuchung der Phosphatase in der Synovial Flüssigkeit (Leiche).
2. Untersuchung der Phosphatase—Kalzium—Kalium—und anorganischen Phosphorwerte im Serum bei 52 Knochenbrüchen in verschiedenen Stadien des Heilungsprozesses.
3. Untersuchung der Phosphatase—und Kalziumwerte im menschlichen Bruchcallus in verschiedenen Stadien des Heilungsprozesses. Bestimmung der Phosphataseaktivität in den umgebenden Muskeln.
4. Untersuchung der Veränderungen, die sich in der Knochenbruchheilung einstellen, wenn *in situ* phosphorhaltiger Ester (Natrium-Glycero-phosphat) und Nierenphosphatase beim frakturierten Kaninchen, eingespritzt wird. Untersuchung der Phosphatasewerte im Callus und der Phosphatase—Kalzium—und anorganischen Phosphorwerte im umgebenden Muskel.

SCHLUSSBETRACHTUNGEN

Unsere Ergebnisse sind die folgende:

1. Während des normales Verlaufes der Knochenbruchheilung bei Erwachsenen (52 Fälle), kommt eine leichte Hyperphosphatasämie vor, und zwar gewöhnlich, wenn die Heilung schon stattgefunden hat. Es bestehen keine Beziehungen zwischen den Werten der Phosphatasämie und der Callusverkalkung. Die Hyperphosphatasämie ist in den Fällen intensiver, in welchen eine beträchtliche Osteoporose besteht.
2. Die Werte der Kalzämie und Kaliämie bewegen sich in normalen Grenzen, und bleiben während der ganzen Zeit der Heilung konstant. Die Werte für das anorganische Phosphor steigen in der ersten Woche an, desgleichen das Produkt Ca P, um dann später herunterzugehen. Sie erreichen niemals das doppelte der Anfangswerte. Das Produkt Ca P war in 16,3 % der Fälle geringer als 30, und die Knochenbruchheilung vollzog sich normal.
3. In drei Fällen, wo die Knochenbruchheilung sich verzögerte, war in zwei Fällen das Produkt Ca P immer höher als 30, und in dem dritten Fall erreichte es niemals diesen Wert, selbst dann nicht, als die Verkalkung stattfand. Es besteht keine Beziehung zwischen den mineralischen Stoffwerten im Serum und der Verkalkung des Bruchcallus.
4. Die normale Synovialflüssigkeit (Leiche) enthält keine Phosphatase.
5. Während der Knochenbruchheilung besteht weiteste Unabhängigkeit zwischen den Phosphatasewerten, und dem anorganischen Phosphor; wenn die Phosphatasämiewerte hoch sind, haben die anorganischen Phosphorwerte die Neigung, herunterzugehen.



6. Mit dem *Substrat* von BODANSKY zur Bestimmung der Phosphatase im Serum, mit der Änderung, das anorganische Phosphor nach BELL-DOVSY zu bestimmen, erhält man normale Werte, welche mit denen von BODANSKY (2 E. ‰) übereinstimmen. Das Verfahren von ALBERS zur Darstellung hochaktiven Phosphatasepräparaten, ist äusserst zufriedenstellend und in jeder Hinsicht überlegen, aber ganz besonders bezüglich des Wirkungsgrades gegenüber dem früheren Verfahren von MARTLAND und ROBINSON. Die von uns dargestellte Nierenphosphatase hatte eine Aktivität von 4,5 E. mgr.

7. Die Phosphatasewerte im menschlichen Bruchcallus sind immer höher als die durchschnittlichen Phosphatasewerte der verschiedenen menschlichen Knochen. Diese Werte stehen mit dem Verkalkungsgrad des Callus in Beziehung. Die hohen Werte entsprechen dem frischen Callus mit einem relativ niedrigen Kalziumgehalt. Mit dem Fortschreiten der Verkalkung gehen diese Werte herunter. In zwei fibrösen Callus bei Pseudoarthrose waren die Phosphatasewerte in dem einen Falle sehr niedrig, und in dem anderen Falle gleich null.

8. Es bestehen keine Beziehungen zwischen den Phosphatasewerten im Callus und denen der Phosphatasämie. Die menschlichen Callus hydrolysieren das Lecithin nicht.

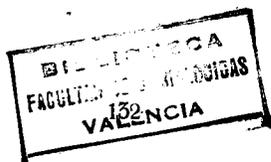
9. Die Phosphatasewerte im normalen Muskel stehen unter denen des Knochens. Die Phosphatasewerte des umgebenden Muskels beim Menschen sind nicht höher als die durchschnittlichen Phosphatasewerte in normalen Muskeln. Beim Kaninchen besteht auch kein Unterschied zwischen der Phosphataseaktivität des umgebenden Muskels und dem entsprechenden des anderen Beines.

10. Die Kalziumwerte im umgebenden Muskel sind beim Kaninchen niedriger als die des Muskels des anderen Beines. Dagegen sind die Phosphorwerte praktisch die gleichen.

11. Die Einspritzung von Natrium Glycerophosphat in die Bruchstelle beim Kaninchen wirkt verschieden, je nachdem man am ersten Tage oder nach einer Woche die Einspritzung vornimmt. Im ersten Falle verzögert sich die Knochenbruchheilung und in dem anderen Falle scheint sie etwas beschleunigt zu werden.

12. Die Einspritzung von Nierenphosphatase im Dosen von 1950 bis 9450 E. in dem Bruchherd beim Kaninchen hat keinen Einfluss auf die Knochenbruchheilung. Aus der Beobachtung der Phosphataseaktivität dieser Callus geht hervor, dass die eingespritzte Phosphatase nicht in dem Bruchherd zurückgehalten wird.

13. Die Beteiligung der Phosphatase an der Knochenbruchheilung hängt von anderen Faktoren ab, ganz besonders von der Reaktion des Milieus.





TERMINÓSE LA IMPRESIÓN DEL TRABAJO "CONTRIBUCIÓN
AL ESTUDIO DE LA BIOQUÍMICA DE LA CALCIFICA-
CIÓN DEL CALLO" EN EL ESTABLECIMIENTO TI-
POGRÁFICO DEL HIJO DE F. VIVES MORA,
CALLE DE HERNÁN CORTÉS, NÚM. 8, EL
DÍA 14 DE AGOSTO DE MCMXL,
VÍSPERA DE LA ASUNCIÓN DE
NUESTRA SEÑORA, EN LA
INSIGNE Y CORONADA
CIUDAD DE VALENCIA

L. ✠ D.