

Efectos de la calcitonina sobre la osteoporosis experimental inducida con metil-prednisolona a nivel de la cabeza femoral del conejo

A. AZNAR AZNAR, A. LOPEZ ALONSO, P. MORATINOS PALOMERO, S. SANCHEZ DOMINGUEZ, C. LASARTE, M. L. BENTURA y L. MUNUERA MARTINEZ

RESUMEN

Se reproduce un modelo experimental de osteopenia cefálica femoral, inducida en el conejo (30 conejos de raza Nueva Zelanda), con metilprednisolona y la respuesta de la misma a la administración de calcitonina.

Se hace la valoración de la osteoporosis según técnica histocitométrica, utilizando un fotomicroscopio de rastreo acoplado a un ordenador digital DPD-12.

Los resultados obtenidos son estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Descriptores: Osteopenia experimental y calcitonina. Osteopenia cefálica experimental por metilprednisolona.

SUMMARY

We present an experimental model of femoral cephalic osteoporosis, induced in the rabbit (30 specimens tupe New Zeland) by metilprednisolone and its response to calcitonine.

We evaluate the osteopenia following histocitometric technic, using a drag photomicroscope adjusted to a DPD-12 digital electronic counter.

The results are statistically significant ($p < 0,05$).

Key words: Experimental osteopenia: response to calcitonine. Experimental femoral cephalic osteopenia. Experimental osteopenia by methylprednisolone.

Introducción

Uno de los efectos secundarios de la administración de corticoides a nivel óseo, es la presentación de osteoporosis más o menos intensa, que puede ser la responsable de fracturas patológicas, principalmente en aquellas zonas del esqueleto ricas en tejido

esponjoso. (CURTISS, CLARK, HERNDON, 1954) (5).

KLEIN, ARNAUD, GALLAGHER, DE LUCA y RIGGS (1977) (12), consideran que el mecanismo básico por el que aparece osteopenia en pacientes tratados con dosis acumulativas de corticoides –hipercostisonismo endógeno–, estaría en relación con una disminución de la calcemia, consecutiva, no a un efecto directo de los mismos deprimiendo la absorción transmucal intestinal de calcio, sino por generar una alteración en el metabolismo de la vitamina D.

Hospital Militar «Gómez Ulla». Madrid. Servicio de Cirugía Infantil. Jefe de Servicio: Dr. Aznar Aznar.

Ciudad Sanitaria «1.º de Octubre». Madrid. Servicio de Traumatología. Jefe de Servicio: Prof. Munuera Martínez.

Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Departamento de Biológicas. Director: Prof. Carrato.

En esta línea, es interesante que pacientes con hipercortisonismo endógeno y sometidos a dosis moderadas de 25-OH-D, presentan un incremento en la absorción intestinal de calcio (HAHN, HALSTEAD, SCHARP y HAHN, 1976) (9).

La administración de calcitonina a ratas (MORGAN, MONAD, RUSSELL y FLEISCH, 1973) (13) con osteopenia experimental, corrige parcialmente la lesión ósea posiblemente por su acción directa a nivel de la membrana celular del osteoclasto.

Partiendo de estos hechos, el objetivo de este trabajo es poner de relieve los efectos de la calcitonina en la osteopenia experimental —a nivel de la cabeza femoral— inducida con dosis acumulativas de metilprednisolona.

Material y método

Se utilizan 30 conejos de raza Nueva Zelanda, machos, con un peso comprendido entre 2.180 y 2.550 gramos, con una media de 2.391 ± 52 gr distribuidos en tres series homogéneas de 10 conejos cada una.

A los animales de la serie T (testigo) se les inyectó 1 cc. de suero fisiológico semanalmente, por vía subcutánea. A los 10 conejos de la serie C, se les inyectó también semanalmente, 2,7 mgr de acetato de metilprednisolona (Depo-moderin) por vía subcutánea y a los de la serie C + C se les inyectó semanalmente acetato de metilprednisolona a la misma dosis y calcitonina sintética de salmón (Calsynar) a la dosis de 20 UI por vía subcutánea cada 3-4 días. Tanto a los conejos de la serie C como a los de la serie C + C se les hizo tratamiento antiabiótico protector con penicilina-benzatina 50.000 y estreptomycinina 0,05 gr dos veces por semana.

A todos los conejos se les alimentó con una dieta comercial standard rica en calcio y se les practicó semanalmente una extracción de 2 cc. de sangre de la vena colateral

de la oreja para determinación de calcio y fósforo.

Cada semana se sacrificaba un conejo de cada serie, después de ser pesado y se obtienen muestras de cabeza de húmero y cabeza de fémur, así como de aquellas vísceras que presentan alteraciones macroscópicas y se incluyen en formol al 10 por 100 para su estudio por microscopía óptica e histofotometría. A las 8 semanas de tratamiento se sacrifican todos los conejos supervivientes, y se da por finalizada la experiencia.

Para los estudios con microscopía óptica, se efectuaron las técnicas de rutina histológica (hematoxilina-eosina).

Para el estudio histofotométrico, se realizó de tal modo que las preparaciones fueron estudiadas en un fotomicroscopio de rastreo Zeiss, modelo 01, y tanto el registro como el almacenamiento de datos y su procesamiento fueron realizados con un ordenador de laboratorio PDP-12 digital.

Se trata de explorar de una manera directa y ordenada un área microscópica fijada por el operador e iluminada por una luz monocromática de 540 μ m. Midiendo en cada punto la intensidad lumínica que llega al fotómetro, podemos detectar si en ese punto concreto hay un núcleo celular, o no.

Para ello se cuenta con dos programas, «Apamos», facilitado por la firma Zeiss y Datplan, confeccionado por Barberain.

La finalidad del programa Apamos —que es el único que hemos utilizado en este trabajo— es adquirir datos desde el fotómetro, acoplado al microscopio y almacenados en una cinta magnética de trabajo.

Los valores registrados, pueden expresar, tanto las intensidades como las absorbencias del campo analizado.

La anchura de la rendija es de 0,5 μ m; el diafragma de medición de 0,1 μ m, de diámetro y el objetivo de 40 Å.

La unidad de salto utilizada para el barrido del campo microscópico problema es de una micra.

Coincidiendo con el blanco elegido, se

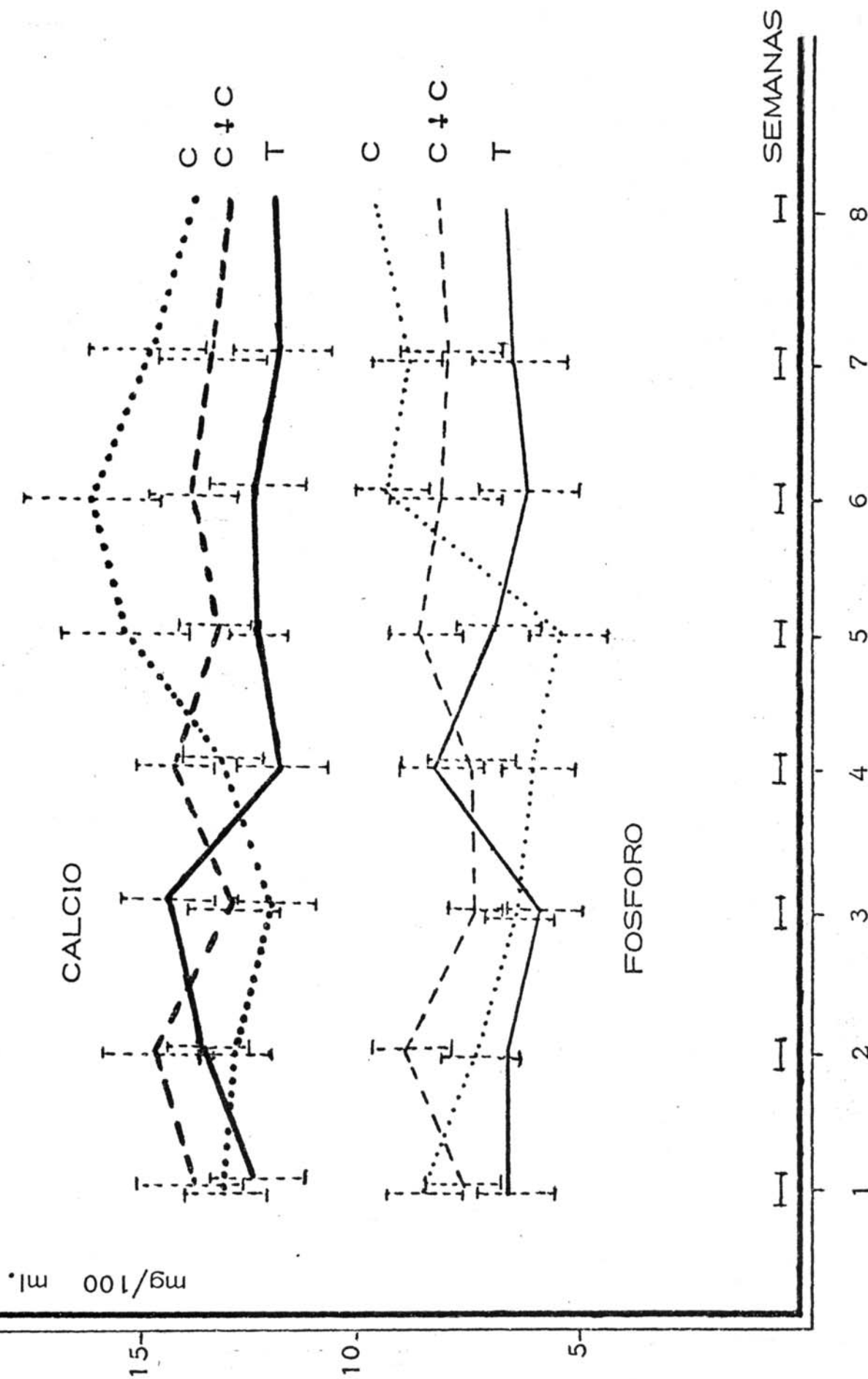


Fig. 1.— Cifras de calcio (líneas de trazos gruesos) y fósforo (líneas de trazos finos) obtenidas en las distintas series a lo largo de la experiencia. Las líneas continuas corresponden a la serie testigo, la discontinua a la serie tratada con corticoides y calcitonina y la de puntos a la serie tratada con corticoides.

ajusta la luz que envía el fotómetro a 100 por 100 de intensidad y se comienza la lectura del corte histológico.

Resultados

Todos los conejos de las series experimentales (C y C + C), mostraban en el momento de ser sacrificados una pérdida de peso que iba aumentando a lo largo de la experiencia y que oscilaba entre 90 y 920 gr, con una media de 442 ± 96 gr, sin que existiesen diferencias entre las dos series estadísticamente significativas. En el grupo testigo no se apreciaron variaciones significativas de peso.

Murieron 2 conejos de la serie C, uno a los 11 y otro a los 18 días del tratamiento, ambos por neumonía, y otros dos de la serie C + C a los 18 días y 19 días respectivamente, apreciándose focos de bronconeumonía en el estudio necrótico practicado, además de las lesiones hepáticas comunes a casi todos los animales de las series experimentales

consistentes en hepatomegalia que se va haciendo más intensa a lo largo del tratamiento y balonización hapatocitaria masiva que evoluciona hacia la necrosis de áreas extensas de hapatocitos sin que se vean fenómenos inflamatorios manifiestos.

Los resultados analíticos vienen representados en la fig. 1. Las cifras de fósforo y calcio en sangre no experimentaron variaciones significativas en ninguna de las series a excepción de la calcemia en la serie C tratada con corticoides que se ve aumentar a partir de la 5.ª semana de tratamiento.

Las cabezas femorales y de húmero no experimentaron variación en el peso en la serie T a lo largo de la experiencia, en cambio tanto en la serie C, como en la C + C hubo una disminución en el peso de las mismas, disminución que fue discreta en la serie C + C y mucho más manifiesta en la serie C. (Tabla 1).

Los resultados de las mediciones de las trabéculas óseas en las distintas series vienen representados en la tabla 2 (figs. 2 y 3). El estudio estadístico de los resultados obte-

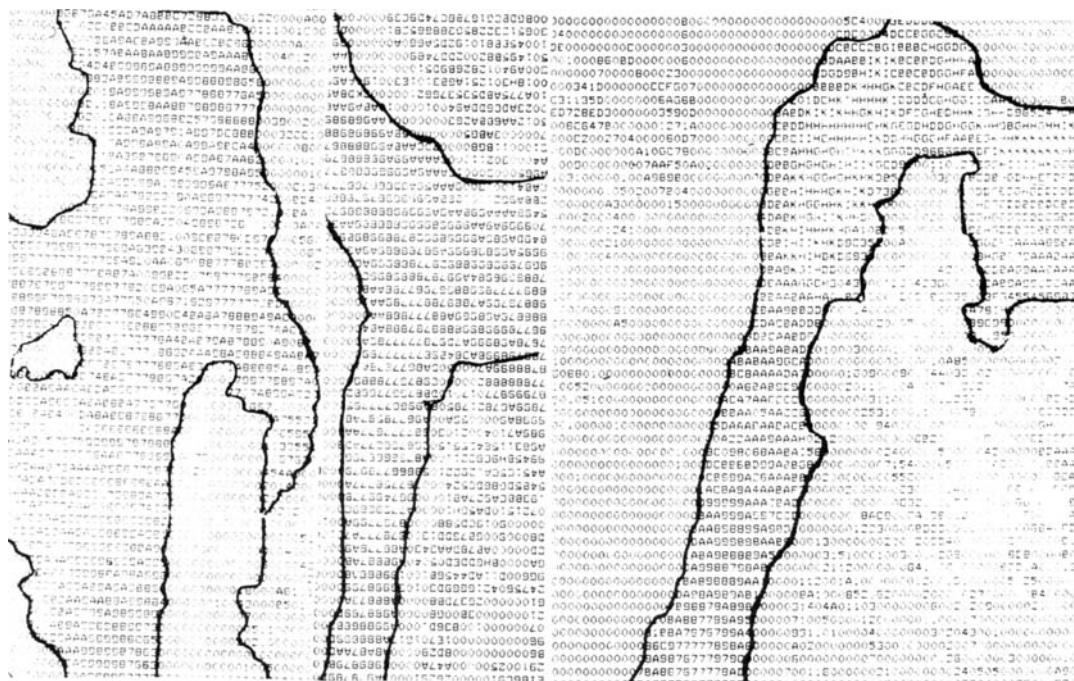


FIG. 2.— Histocitometría de trabéculas óseas pertenecientes respectivamente a cabeza femoral de serie testigo; de serie tratada con corticoides —trabécula central— y de trabécula perteneciente a serie de animales tratados con corticoides y calcitonina. (Explicación en el texto).

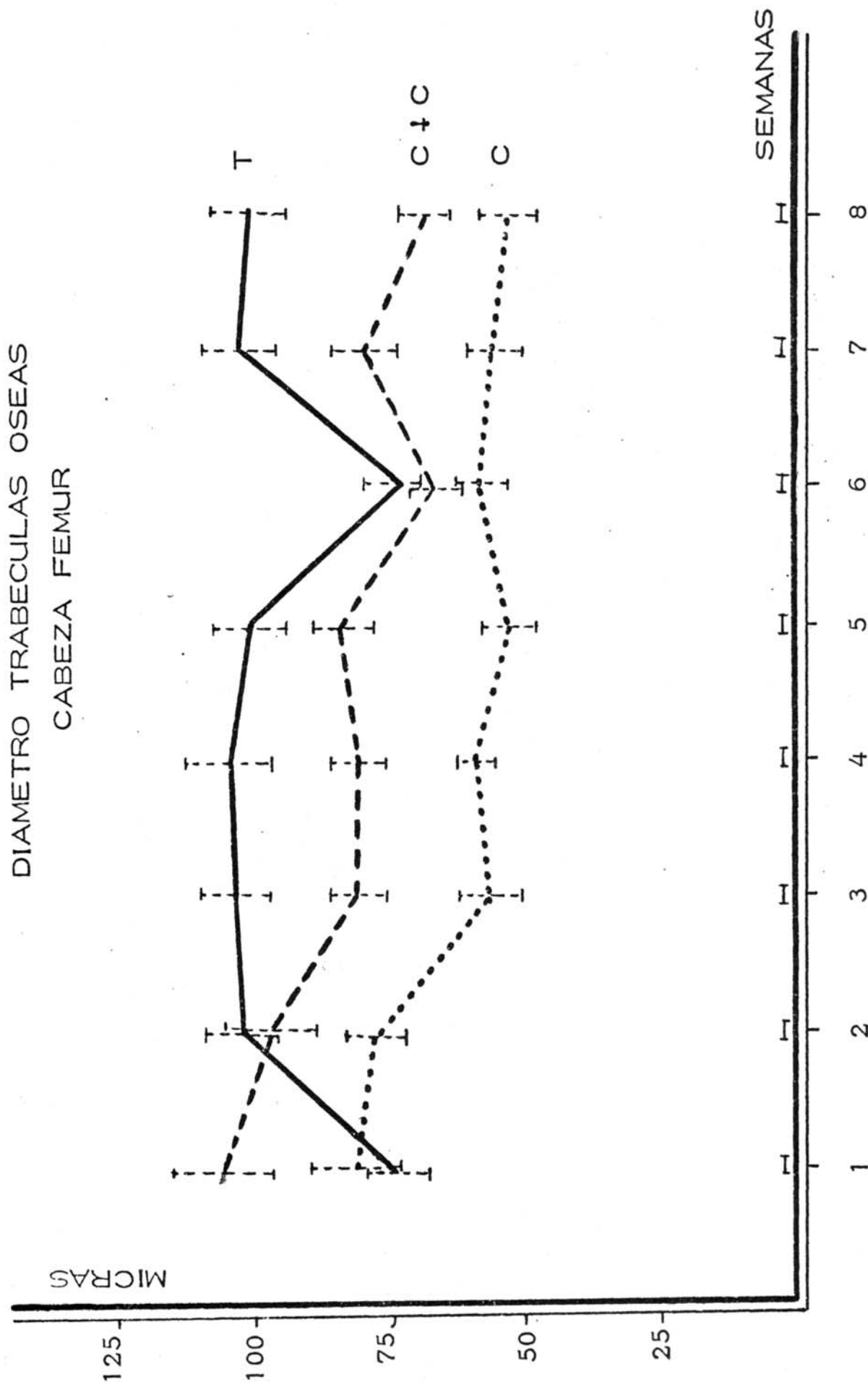


FIG. 3.— Diámetro de las trabéculas óseas de la cabeza femoral del conejo a lo largo de la experiencia con expresión del error standard. Serie T = línea continua. Serie C + C = línea discontinua. Serie C = línea de puntos.

nidos pone de manifiesto que el contraste de hipótesis medias dependientes entre los distintos valores para un nivel de confianza del 95 por 100 no demuestra diferencias significativas entre las series T y C + C. En cambio la T de Student muestra diferencias significativas para este mismo N.C. del 95 por 100 tanto entre las series T y C como entre las series C y C + C.

Discusión

En clínica humana se ha podido comprobar repetidamente, cómo la administración prolongada de corticoides provoca una osteoporosis que puede condicionar la presencia de fracturas trabeculares (EDSTROM, 1961) (6), (CURTISS, CLARK y HERDON, 1954) (5), (GALLAGHER, AARON, HORSMAN, WILKINSON y NORDIN, 1973) (8).

En determinadas afecciones reumáticas, pero muy especialmente en la artritis reumatoide, es evidente la existencia de una osteopenia más o menos severa, relacionada con la corticoterapia. (SAVILLE y KARMOSH, 1967) (16), (HAHN, HALSTEAD, SCHARP y HAHN, 1976) (9).

En el síndrome de Cushing, la presencia de osteopenia es un hecho constatado como una de las características significativas del cuadro (SUSSMAN y COPLAN, 1942) (17), (HOWLAND, PUGN y SPRAGUE, 1958) (10),

(STOFFER, INNACONNE y GABRILONE, 1961) (18).

ALOIA, ROGINSKY, ELLIS, SHUKLA y COHN (1974) (1), evidenciaron la reversibilidad del citado síndrome, una vez controlado el cuadro patológico. En el campo experimental abundan los trabajos dirigidos a crear el modelo de osteopenia inducido por corticoides, así como los efectos de diferentes terapéuticas para hacer regresar el cuadro óseo (WILLIAMS, BOWSER, HENDERSON y UZGIRIES, 1961) (21), (COLLINS, GARRETT, y JOHNSTON, 1962) (4), (BLACK y JEE, 1976) (2), y (JEE, BLACK y GOTCHER, 1981) (11).

La causa de la pérdida ósea en la corticoterapia es compleja y discutida. Entre los muchos factores que se citan como responsables, se dan entre otros: disminución de la síntesis de colágeno y mal absorción intestinal del calcio (RASMUSSEN y BORSIER, 1974) (15).

KLEIN, ARNAUD, GALLAGHER, DE LUCA y RIGGS (1977) (12), consideran que el mecanismo básico por el que aparece osteopenia en pacientes tratados con dosis acumulativas de corticoides -hipercortisonismo exógeno- estaría en relación con una disminución de la calcemia, consecutiva, no a un efecto directo de los mismos deprimiendo la absorción transmucal intestinal de calcio, sino por generar una alteración en el metabolismo de la vitamina D.

En esta línea, es interesante que pacientes con hipercortisonismo endógeno y sometidos a dosis moderadas de 25-OH-D, presentan un incremento en la absorción intestinal de calcio (HAHN, HALSTEAD, SCHARP y HAHN, 1976) (9).

La administración de calcitonina en conejos (MORGAN, MONAD, RUSSELL y FLEISCH, 1973) (13), con osteopenia experimental, corrige parcialmente la lesión ósea, probablemente por su acción a tres niveles diferentes: mucosa intestinal, túbulo renal y osteoclasto.

A nivel de la mucosa intestinal, favoreciendo la absorción intestinal del calcio, po-

Tabla I

Peso de las cabezas femorales

Serie testigo 0'5050 ± 0'042 mg

Serie	C + C	C
1 semana	0'5320 mg	0'4857 mg
2 semanas	0'45 mg	0'442
3 semanas	0'482 mg	0'4257 mg
4 semanas	0'4310 mg	0'4067 mg
5 semanas	0'4310 mg	0'4052 mg
6 semanas	0'4349 mg	0'4150 mg
7 semanas	0'4270 mg	0'3982 mg
8 semanas	0'4290 mg	0'3903 mg

	CABEZA		C	CABEZA T	HUMERO C + C		C
	T	FEMUR C + C			T	C	
1 SEMANA	73'9 ± 4'31	105'5 ± 10'1	81'1 ± 8'24	76'5 ± 3'8	87'7 ± 4'74	63'4 ± 6'78	
2 SEMANAS	100'4 ± 7'40	95'55 ± 10'02	79'65 ± 4'84	70'1 ± 5'45	82'2 ± 5'26	86'5 ± 4'56	
3 SEMANAS	102'9 ± 6'35	76 ± 4'93	56 ± 4'91	76'9 ± 6'93	74'1 ± 4'94	50'4 ± 4'49	
4 SEMANAS	104'7 ± 7'48	75'55 ± 4'90	57'35 ± 2'54	75'9 ± 3'95	60'4 ± 4'22	47 ± 4'33	
5 SEMANAS	100'3 ± 6'22	79'75 ± 5'95	55'5 ± 4'88	89'7 ± 5'48	69'5 ± 4'64	51'3 ± 7'75	
6 SEMANAS	74'5 ± 5'21	64'9 ± 4'22	59'05 ± 5'05	70'3 ± 3'21	74'3 ± 4'32	60' ± 2'71	
7 SEMANAS	104'3 ± 6'32	79'8 ± 5'52	57'9 ± 4'64	74'6 ± 5'27	77'8 ± 3'72	50'3 ± 525	
8 SEMANAS	97'6 ± 7'12	66'85 ± 5'12	54'9 ± 5'13	89'2 ± 4'90	72'9 ± 4'96	57'8 ± 7'75	
	(x)	(xx)	(xxx)	(x)	(xx)	(xxx)	
	100'2 ± 4'96	78'2 ± 6'72	52'7 ± 3'29	77'3 ± 3'84	79'2 ± 5'32	40'3 ± 3'91	
	(x)	(xx)	(xx)	(x.)	(xx)	(xx)	
	105'6 ± 3'80	84'3 ± 7'88	49'8 ± 4'18	77'7 ± 5'96	76'4 ± 6'47	42'2 ± 4'47	
MEDIA	96'44 ± 3'78	80'63 ± 3'86	60'39 ± 3'43	77'82 ± 2'11	75'45 ± 2'32	54'92 ± 4'21	

TABLA II - Diámetro en micras de las trabéculas óseas pertenecientes a las cabezas de fémur y de húmero de los conejos de las distintas series. T= Serie testigo. C+C= Serie tratada con corticoides y calcitonina y C= Serie tratada con corticoides. (x)=C, sacrificados a las 8 semanas. (xx) exitus a las 2'5 semanas. (xxx)= Exitus a los 11 días de tratamiento.

dría contrarrestar la disminución de reabsorción de calcio en los sujetos tratados largo tiempo con corticoides. (KLEIN, 1977) (12). Aunque este mecanismo de acción es cuestionado en la actualidad.

A nivel renal los trabajos de RASMUSEN (1974) (15) han clarificado el mecanismo de la beta-hidroxilación del 1.25 hidroxico-calciferol. Así mismo parece evidente que a nivel del túbulo tiene una acción antagónica a la PTH favoreciendo la eliminación de fosfatos por la orina.

Pero la verdadera importancia de su papel se centra a nivel del hueso donde parece ser que frena la reabsorción del calcio por acción directa sobre el osteoclasto activando la fosfo-diesterasa-nucleótido-cíclica y por lo tanto inhibiendo la concentración de AMP cíclico a nivel intracitoplasmático, paralizándose de esta forma los mecanismos

íntimos de la síntesis enzimática de la citada célula. (FRIEDMAN, 1965) (7) y (WASE, 1967) (20).

Todo esto ha hecho pensar que en cierto modo existe un cierto antagonismo entre calcitonina y cortisona lo que ha dado pie a una serie de trabajos tanto experimentales (THOMPSON, 1972) (19), como clínicos (PALMIERI, 1974) (14) y (BRISKIN, 1976) (3), comprobándose el beneficioso efecto de la administración de calcitonina en los casos de osteopenia por tratamiento prolongado con corticoides.

El efecto sobre la osteopenia cefálica femoral traducido en la disminución de diámetro de las trabéculas óseas es claro y estadísticamente significativo ($p < 0.05$), evidenciándose una disminución de dicha osteopenia al administrar conjuntamente con los corticoides, calcitonina.

BIBLIOGRAFIA

1. ALOIA, J. F.; ROGINSKY, M.; ELLIS, K.; SHUKLA, K. and COHN, S. (1974): «Skeletal metabolism and body composition in cushing's syndrome». *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39, 981.
2. BLACK, H. E.; JEE, W. S. S. (1976): A histomorphometric and biochemical evaluation of the effects of a diphosphonate in corticosteroid-treated rabbits. In Meunier P. J. (Ed): Bone Histomorphometry Second International Workshop, Toulouse, France. pag. 157.
3. BRISKIN, A. I.; DUBROV, E. Ya. and STRIZHA KOVA, L. L. (1976): «Effektivnost' Tirokal'Tsitonina pri lecheniy steroidnogo osteoporoz» (Efficacy of thirocalcitonin in the treatment of steroid osteoporosis). *Klinicheskaya Meditsina*, 54, 80.
4. COLLINS, E. J.; GARRETT, E. R. and JOHNSTON, R. L. (1962): «Effect of adrenal steroids on radio-calcium metabolism in dogs». *Metab. Clin. Exp.*, 11, 716.
5. CURTISS, P. H.; CLARK, W. S. and HERNDON, C. H. (1954): «Vertebral fractures resulting from prolonged cortisone and corticotropin therapy». *JAMA*, 156, 467.
6. EDSTROM, G. (1961): «Destructions of hip in rheumatoid arthritis during long-term steroid therapy». *Acta Rheumat. Scandinavica*, 7, 151.
7. FRIEDMAN, J. and RAISZ, L. G. (1965): «Thyrocalcitonin inhibitor of bone resorption in tissue culture». *Science*, 150, 1.465.
8. GALLAGHER, J. C.; AARON, J.; HORSMAN, A.; WILKINSON, R. and NORDIN, B. E. C. (1973): «Corticosteroid osteoporosis». *Clinics Endocrinol. Metab.*, 2, 355.
9. HAHN, T. J.; HALSTEAD, L. R.; SCHARF, C. R. and HAHN, B. H. (1976): «Mineral metabolism and response to 25-Hidroxy-vitamin D therapy in patients with steroid induced osteopenia». *Program of the Meeting of the Endocrine Society*, 58, 62 (ABSTR).
10. HOWLAND, W. J.; PUGH, D. G. and SPRAGUE, R. G. (1958): «Roentgenologic changes of the skeletal system in cushing's syndrome». *Radiology*, 7, 69.
11. JEE, W. S. S.; BLACK, H. E. and GOTCHER, J. E. (1981): «Effect of Dichloromethane Diphosphonate on Cortisol-induced bone loss in young adult rabbits». *Clin. Prthop.*, 156, 39-51.
12. KLEIN, R. G.; ARNAUD, S. B. and GALLAGHER, J. J. (1977): «Intestinal Calcium absorption in exogenous hypercortisolism». *J. Clin. Invest.*, 60, 253.
13. MORGAN, D. G.; MONAD, A.; RUSSELL, R. G. G. y FLEISCH, H. (1973): «Influence of dichloromethylene diphosphonate (Cl₂ MDL) and calcitonin on bone resorption, lactate

- production and phosphatase and pyrophosphatase content of mouse treated with parathyroid hormona in vitro». *Calcif. Tiss. Res.*, 13, 287.
14. PALMIERI, G. M. A.; DVORAK, J. and BOITOMI, R. (1974): «Calcitonin in steroid-induced osteoporosis». *N. Engl. J. Med.*, 290, 1.490.
 15. RASMUSSEN, H. and BORDIER, P. (1974): «The physiological and cellular basis of metabolic bone disease». Williams Wilkins Company, Baltimore, 364 pp.
 16. SAVILLE, P. D. and KARMOSH, O. (1967): «Osteoporosis of rheumatoid arthritis: influence of age, sex and corticosteroids». *Arthrit. Rheum.*, 10, 423.
 17. SUSSMAN, M. L., and COPLAN, B. (1967): «The roentgenologic appearance of the bones in cushing's syndrome». *Radiology*, 39, 288.
 18. STOFFER, L. J.; INNACCONE, A. and GABRILOVE, J. L. (1961): «Cushing's syndrome: A study of fifty patients». *Am. J. Med.*, 30, 129.
 19. THOMPSON, J. S.; PALMIERI, G. M. A.; ELIEL, L. P. and CRAWFORD, R. L. (1972): «The effect of porcine calcitonin on osteoporosis induced by adrenal cortical steroids». *J. Bone Joint Surg.*, (AM). 54, 1.490.
 20. WASE, A. W.; SOLEWSKI, J.; RICKES, E. and SEIDENBERG, J. (1967): «Action of thyrocalcitonin on bone». *Nature*, 214, 388.
 21. WILLIAMS, G. A.; BONSER, E. N.; HENDERSON, W. I. and UZGIRIES, V. (1961): «Effects of vitamin D calcium in the rat». *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 106, 664.