

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

EFFECTOS DE LA TIMECTOMIA SOBRE LA ESTRUCTURA
E HISTOQUIMICA DEL CARTILAGO DE CONJUNCION
Y SOBRE LA FIJACION ESQUELETICA DE LOS ISOTOPOS
RADIATIVOS FOSFORO, AZUFRE, ESTRONCIO



AURELIANO DAVILA JUNCAL

LICENCIADO EN MEDICINA Y CIRUGIA

OCTUBRE 1968



Universidad de Valladolid



80002595222



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

(ESPAÑA)

INSTITUTO ANATÓMICO SIERRA

Cátedra de Anatomía

PROFESOR A. PÉREZ CASAS

DON ANTONIO PEREZ CASAS , CATEDRATICO NUMERARIO DE ANATOMIA DESCRIPTIVA Y TOPOGRAFICA Y DE TECNICA ANATOMICA EN LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE VALLADOLID .

CERTIFICA : Que el trabajo de investigación que presenta para optar al Grado de Doctor el Licenciado en Medicina y Cirugía D. Aureliano Dávila Juncal sobre el tema : " Efectos de la timectomía sobre la estructura e histoquímica del cartílago de conjunción y sobre la fijación esquelética de los isótopos radiactivos fósforo , azufre y estroncio " , ha sido realizado bajo su inmediata dirección en el Laboratorio de la Cátedra , utilizando preparaciones originales .

El que suscribe garantiza la autenticidad de las preparaciones y de las conclusiones que figuran en el presente trabajo .

Y para que conste , y a efectos de justificar estos extremos , expide el presente certificado en Valladolid a doce de octubre de mil novecientos sesenta y ocho .

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO ANATÓMICO SIERRA

A Pérez Casas

- UNIVERSIDAD DE VALLADOLID -
=====

- FACULTAD DE MEDICINA -

Trabajo para optar al título de Doctor:

- EFFECTOS DE LA TIMECTOMIA SOBRE LA
ESTRUCTURA E HISTOQUIMICA DEL CAR
TILAGO DE CONJUNCION Y SOBRE LA -
FIJACION ESQUELETICA DE LOS ISOTO
POS RADIATIVOS FOSFORO, AZUFRE Y
ESTRONCIO -

de AURELIANO DAVILA JUNCAL.
Licenciado en Medicina y
Cirugía.-

bajo la dirección del Prof. Dr. ANTONIO PEREZ CASAS.
Catedrático de Anatomía de la
Facultad de Medicina de Valla
dolid.-

-Octubre 1968-

Mi gratitud al Prof. Pérez Casas por sus consejos y enseñanzas, y a D^a. M^a.-- Esperanza Bengoechea por el cariño y -- las horas dedicadas a iniciarme en las técnicas de este trabajo.

Su ejemplar vida de trabajo y dedicación a la enseñanza, admirada durante -- estos años de permanencia a su lado, han despertado mi interés por la investigación.--

CAPITULO I

- INTRODUCCION Y PLANTEAMIENTO DEL TEMA -

Las numerosas investigaciones fisiológicas y patológicas realizadas en campo clínico han demostrado la importancia de la función de la corteza supratentorial en el control de la función de los órganos internos, y por ello se ha afirmado (1) - (2) que el sistema nervioso central debe ser considerado como el centro de control de las actividades.

CAPITULO I

- INTRODUCCION Y PLANTEAMIENTO DEL TEMA -

La actividad del sistema nervioso central es el resultado de la integración de las señales que llegan desde los receptores periféricos y desde las áreas subcorticales. La actividad del sistema nervioso central es el resultado de la integración de las señales que llegan desde los receptores periféricos y desde las áreas subcorticales. La actividad del sistema nervioso central es el resultado de la integración de las señales que llegan desde los receptores periféricos y desde las áreas subcorticales.

- CAPITULO I -

- INTRODUCCION Y PLANTEAMIENTO DEL TEMA -

Las numerosas investigaciones fisiológicas y patológicas realizadas en torno al timo no han conseguido demostrar la esencia de su significación funcional, siendo por ello -como afirma GREENE (1)- un órgano misterioso, pero digno de merecer la atención de los estudiosos.

Lo único cierto que hay sobre el timo es que no es necesario para la vida; en la pubertad comienza a desaparecer su parénquima y en el adulto sólo quedan algunos vestigios, pues la mayor parte de su parénquima al involucionar constituye el cuerpo adiposo retroesternal de WALDEYER. La exéresis del timo en los animales aún en las primeras edades es aparentemente compatible con la supervivencia.

La naturaleza endocrina del timo, como el sentido real de sus funciones incretoras carecen actualmente del apoyo decisivo que supone el conocimiento de una hormona específica, pero en favor de la significación hormonal del timo pueden esgrimirse -siguiendo a ESTELLA (2) el cual se apoya en datos aportados por GERARD, DUSTIN, WINIWARTER, DU-

PERIE, BREWER y otros- los siguientes argumentos:

1º.- El estrecho parentesco embriológico del timo con el sistema tiro-paratiroideo, que acredita su origen común y su desarrollo simultáneo.

2º.- La continuidad tisular entre las paratiroides y el timo, o al menos entre los parénquimas de sus islotes aberrantes.

3º.- Las correlaciones funcionales e interdependencias patológicas con otras glándulas de secreción interna, principalmente gonadas, suprarrenales y tiroides.

4º.- El hecho de que la ablación tímica experimental origina trastornos constantes del crecimiento y de la calcificación, mientras que, por el contrario, la administración de extractos tímicos proporciona con frecuencia resultados exactamente inversos.

En los últimos años vuelve a ponerse sobre el tapete el pretendido papel hormonal del timo, a raíz de los trabajos del Premio Nobel de Fisiología SZENT GYORGY (3) y sus colaboradores, pues estos autores aislan del timo del ternero tres substancias de naturaleza proteica y bajo peso molecular, que controlan algunos procesos fundamentales de nuestra vida, y de las cuales, dos están relacionadas con la carcinogénesis.

Una, denominada promina, estimula o potencializa el -

crecimiento; otra, la retina, lo inhibe. Esta última se produce probablemente también en otros tejidos del organismo.

Ambas sustancias están presentes en los extractos del timo, y como su acción es antagónica, no puede demostrarse con el extracto total actividad alguna. Unicamente, separando ambos factores puede ponerse de manifiesto su acción. Los autores han observado que los ratones inoculados con virus de KREBS 2 y tratados simultáneamente con promina desarrollan rápidamente grandes tumores, mientras que los tratados con retina e inoculados con el virus, presentan primero una detención en el crecimiento tumoral y, finalmente, se asiste a una regresión del mismo. Al parecer, la proporción en que se producen ambas sustancias varía con la edad, de tal forma que la promina predomina en las edades avanzadas y la retina en las primeras épocas de la vida. Ello podría estar en relación con la mayor proporción con que se presentan los tumores en los sujetos de edad.

Es muy probable que la sustancia promotora de crecimiento, de SZENT GYORGY, sea la responsable del gigantismo que luego diremos han producido algunos autores en ratas a las que administraron durante un cierto tiempo extracto de timo.

De los extractos tímicos obtenidos de ternera, SZENT - GYORGY y colaboradores han obtenido también una tercera - sustancia denominada infertina, que hace estériles a los ratones machos o hembras, probablemente inhibiendo la influencia de las hormonas gonadotróficas en el período puberal. De confirmarse estos resultados, habría que reconsiderar estrechamente la función del timo y el desarrollo sexual.

No tendría nada de extraño que en el futuro se descubrieran nuevas sustancias biológicamente activas elaboradas por el timo, afirman los autores citados en último lugar. Por lo pronto, se ha demostrado que la hormona "juvenil" ú "hormona de PETER PAN" de los insectos que alarga su vida prolongando la fase de larva, existe en gran cantidad en el timo de los vertebrados. Administrando promina a la pupa (larva de insecto) la metamorfosis a mariposa se interrumpe, quedando el insecto en el estadio juvenil, lo cual hace pensar que en estos animales más superiores pueda ejercer también alguna función de control sobre la morfogénesis y el desarrollo (WILLIAMS, MOORHEAD y PULIS) (4).

El concepto funcional del timo hay que fundamentarlo conjuntamente en la base histológica y sobre los informes proporcionados por las técnicas habituales de investiga--

ción en las glándulas de secreción interna: extirpación, injertos e inyecciones de extractos.

Los experimentos de timectomía han proporcionado escasos datos en favor de la función tímica. En la inmensa mayoría de los estudios no se observó cambio apreciable en el organismo según se deduce de las experiencias de MORGAN y GRIERSON en pollos jóvenes, de ANDERSON en ratas y de RIDDLE en palomas. (Citado por ALVAREZ COCA) -- (5).

Para WINIWARTER (6) es posible que estos resultados negativos se deban a la existencia de tejido tímico disperso especialmente en la glándula tiroides.

Pero cuando la atimia experimental es realizada en condiciones técnicas satisfactorias, tal como la han logrado ACKERT (7), PEARCE (8), KLOSE y VOGT (9), AHEARN (10) y COMSIA (11), trabajando en animales jóvenes cuando es máxima la actividad tímica, entonces se logra un cuadro patológico muy característico, caracterizado por sistemática detención del crecimiento (traducida por la alteración de la curva de peso), distrofias diversas, caquexia y principalmente alteraciones de los huesos que recuerdan de lejos la osteopatía raquítica. Este cuadro, tanto más expresivo cuando el animal es más joven (LEITES (12) y LIMBERG (13), evoluciona en tres fases: laten

te, distrófica y caquéctica, y lo acompañan, a veces, -- perturbaciones menos netas o constantes, entre las cua-- les figuran la susceptibilidad a las infecciones, los -- trastornos psíquicos, la calciuria, la hipofosfatemia y-- otras variaciones serológicas o morfológicas de la san-- gre (MATSUNO (14) y MORRIS (15)).

En manos de COMCIA, concretamente, la timentomía to-- tal practicada en cobayas machos produce:

Trastorno rápido del estado general, apareciendo los-- animales muy abatidos, hasta el punto de que no se de-- fienden cuando son hostigados. El crecimiento está retar-- dado y en algún caso se detiene desde el principio; algu-- nas veces, aunque lentamente, puede el animal seguir cre-- ciendo por un período de tiempo que siempre es muy lige-- ro.

El animal disminuye de peso corrientemente, y otras -- veces la curva del peso es en zig-zag. La delgadez es ex-- trema, al punto de que la grasa subperitoneal desaparece. La supervivencia de estos animales es problemática.

Hay también trastornos de la osteogénesis, con defi-- ciente calcificación de los huesos, formación de tejido-- osteoide y persistencia de los cartílagos epifisarios, -- así como retraso en la soldadura de las fracturas. En -- los animales atímicos el esqueleto es reducido en todas--

sus dimensiones, pero principalmente en cinturas escapular y pelviana.

La detención del crecimiento y la delgadez son los puntos básicos de la timectomía. Dichos puntos no están absolutamente confirmados, pues sin recurrir a informaciones bibliográficas antiguas, tenemos los resultados contrapuestos conseguidos por ROWNTREE (16) y CHIODI (17) quienes trabajaron en más de cinco generaciones de animales. Los trabajos de ROWNTREE han demostrado que la timectomía hace sentir más intensamente sus efectos en los hijos que en la primera generación tratada. Los animales siguen procreando y tienen crías bien desarrolladas y sanas, pero en las generaciones sucesivas los individuos de la última son menores en tamaño y en peso que los de la precedente. Para el primero de estos autores la timectomía produce una detención incontestable del crecimiento, hecho que niega el segundo.

También PARK (18) y MACLURE (19) niegan terminantemente que la extirpación del timo produzca efecto alguno y llegan a la conclusión de que se trata de órgano no esencial para la vida.

Los injertos tímicos practicados con indudable éxito por RICHTER y JAFFE (20), JOLLY y LIEURRE (21), GOTTESMAR y JAFFE (22) rara vez conducen a estados de hipertimiza-

ción. GODARD (23) observó, sin embargo, durante sus investigaciones la adiposidad manifiesta y el aumento de la talla.

Los informes que proporciona la inyección de extractos tímicos parecen más instructivos que los facilitados por la timectomía o la trasplatación experimental.

SKLOWER (24) y ROMEIS (25) demostraron que la metamorfosis del renacuajo, realizada en un medio con tiroxina, se inhibía si se añadía extracto tímico. En la misma época se hicieron estudios sobre la muda de la culebra y el cambio de plumaje de los pollitos, cuya aparición se estimula con tiroxina, efecto que se retrasa, si al mismo tiempo de inyectar esta hormona, se administra extracto tímico. Pero, a juicio de ROMEIS, las alteraciones del crecimiento de los renacuajos subsiguientes a la administración de extracto tímico no se debe a la acción de una sustancia específica.

Las inyecciones repetidas de extracto tímico en el animal joven provocan a la inversa de la timectomía, aceleración del crecimiento. En los primeros días el crecimiento estatural y ponderal es mucho más rápido que en los últimos.

En los extractos acetosolubles de timo describió hipotéticamente ASHER (26) una hormona, la timocrescina, que

activaría el crecimiento y produciría aumento de peso -- cuando es inyectada a ratas recién nacidas, impúberes y -- maduras, de ambos sexos.

Posteriormente, ROWNTREE, CLARK y STENBERG (27) obser -- varon que la inyección por vía intraperitoneal del mismo -- extracto utilizado por HANSON produce disminución del pe -- so y del crecimiento.

Que la actividad reguladora del desarrollo y de los -- procesos de osificación persiste adormecida en el indivi -- duo adulto y es capaz de reaparecer en condiciones pato -- lógicas, parecen probarlo las investigaciones de ARIYOSKI (28), de MEITTENLEITER (29) y ENRIQUES (30).

El primer autor encuentra durante el curso de las -- fracturas la hiperplasia del timo, que sólo desaparece -- cuando la fractura ha consolidado.

El segundo, estudiando sobre dos lotes de ratas la -- evolución de las fracturas, comprueba que la irradiación -- estimulante del timo conduce a su consolidación en tres -- semanas, mientras que para el lote no irradiado el callo -- solo se forma al cabo de cuatro semanas; esta función -- osteógena del timo la considera independiente del metabo -- lismo del calcio, ya que la destrucción radioterápica u -- operatoria produce lesiones osteomalácicas y el injerto -- de la glándula activa el crecimiento, pero permaneciendo

constantemente inalterables las cifras de calcemia.

El tercer autor, en fin, comprueba que algún tiempo después de la fractura, el timo de los cobayas adultos dobla su peso. La reacción es débil al contrario en los animales muy jóvenes. Desde el punto de vista histológico, se observa que la cortical se distingue menos de la medular porque en ésta una gran cantidad de timocitos se transforman en corpúsculos de HASSAL monocelulares y éstos se unen en pequeños corpúsculos pluricelulares con la característica degeneración bien conocida de todos.

De estas observaciones, el autor deduce que la glándula tímica es estimulada en su función secretoria bajo la influencia de una fractura, bajo la influencia de sustancias que proceden de la misma fractura y en las cuales las sales de calcio y las albúminas juegan un papel importante.

A la acción de los preparados tímicos sobre el desarrollo no debe ser extraña la influencia directa sobre los metabolismos del calcio y del fósforo, o, dicho en otros términos, existen ciertas relaciones entre el timo y los metabolismos de estos minerales. Ahora bien, los resultados obtenidos por los investigadores no son tampoco coincidentes.

Así, NITSCHKE (31), por un lado, y REISS y colaborado

res (32), observan con el empleo de extractos hidrosolubles el descenso de calcio hemático y, a la larga, el aumento del calcio total, sobre todo esquelético, e hipofosfatemia. Por el contrario, otros autores han observado que la timectomía produce aumento del calcio en los tejidos, incremento de la calcemia y una mayor eliminación de este metal. El injerto de sustancia tímica produce un aumento de las concreciones calcáreas en los tejidos, hipocalcemia y menor eliminación de cal.

GEBELE (33) demostró que el aumento del metabolismo basal y el crecimiento estimulado por la hormona tiroidea, se inhibía al añadir el extracto tímico.

COMSA (34) ha demostrado en el cobaya que el hipermetabolismo producido con grandes dosis de tiroxina se neutralizaba con la administración de timo, así como la disminución de la colessterina en sangre y el aumento de la creatina en orina.

SANCHEZ MARTIN y LINAZASORO (35) han demostrado en ratas timectomizadas y en una enferma de la misma naturaleza la existencia de:

- aumento de la utilización periférica de la tiroxina radiactiva.
- aumento específico por el tejido muscular del tanto por ciento de capta-

La acción de la tiroxina ^{131}I , efecto que se inhibe con la adición del extracto tímico.

En el estado actual de la investigación se puede afirmar que el timo influencia la velocidad de renovación de los diferentes compuestos fosforados de los tumores, poniendo así en evidencia su acción sobre el metabolismo fosfórico en los casos normales y en las neoplasias.

SEELLIE (36) y ARAK (37) han mostrado la influencia del timo sobre la incorporación del ^{32}P , bajo sus diferentes formas.

PARHON, POTOP y NICOLESCOU-ZINCA (38) han mostrado en una serie de publicaciones la acción protectora del timo en el cáncer experimental, producido sea por el metilcolantreno, sea por trasplante de tumores. A juicio de los autores esta acción protectora se debe a la inhibición del aporte y de la utilización de las nucleoproteínas, disminuyendo también su nivel de síntesis.

En sus investigaciones han utilizado el ^{32}P porque de todos los radioisótopos el ^{32}P presenta una perspectiva más amplia sobre los metabolismos, pues este elemento tiene un papel primordial en el metabolismo intermediario.

En manos de los autores rumanos anteriormente citados,

la administración de extractos tímicos aumenta la incorporación del ^{32}P en los diversos órganos de los animales testigos y también en los animales portadores de tumores.

Parece evidente por tanto, que el extracto tímico estimula la velocidad del metabolismo fosforado, que el timo tiene una muy activa participación en el metabolismo fosforado.

Preocupado por las discordancias existentes entre los autores a propósito de la intervención del timo en el crecimiento osteogénico, y estimulado sobre todo por los hallazgos recientes de SZENT GYORGY, he querido realizar una modesta investigación para contribuir al esclarecimiento en la medida de nuestras fuerzas a la resolución de tan apasionante problema.

Como animal de experimentación hemos elegido el conejo por ser el más utilizado en investigaciones anteriores y como zona orgánica a estudiar en los mismos, después de practicarles la ablación del timo, hemos tomado la fisis y metáfisis de la extremidad superior del fémur.

Sabido es que fisis y metáfisis (RUBIN, (39) constituyen un conjunto inseparable cuya evolución regula el crecimiento en longitud de los huesos.

La fisis es la capa de cartílago epífiso-diafisario - proliferante, cuyo desarrollo ordenado organiza las células cartilaginosas en columnas que luego se hipertrofian, degeneran (o se desdiferencian, según PETERSEN (40) y se calcifican.

La metafisis está formada por tejido óseo, constituido por la invasión vascular de la capa de cartílago calcificado; es así, asiento de la osificación primaria reemplazada rápidamente para constituir la esponjosa secundaria.

La fisis o cartílago de conjunción de los animales en vías de crecimiento es el lugar de crecimiento de los huesos. Su desarrollo es de hecho uno de los puntos del organismo más sensibles al influjo de las carencias o de las intoxicaciones.

Como test a estudiar en el cartílago hemos utilizado por las razones que a continuación se indican, los siguientes:

- Alteraciones de la estructura normal.
- Fosfomonoesterasa I (fosfatasa alcalina).
- 5- nucleotidasa.
- Basofilia.
- Polisacáridos neutros (glucógeno).
- Mucopolisacáridos ácidos (ácido condroitin-sul_

- fúrico) por las técnicas del Azul Alcían y de la Metacromasia por el azul de toluidina.
- Lípidos.
 - Fijación de fósforo radiactivo y de estroncio - azufre radiactivo, o sea, estudio historradiográfico de fisis y metáfisis, porque este estudio por las premisas físicas en que se basa, es el único que permite un estudio directo del movimiento de las sales minerales en las estructuras esqueléticas (FANUCCI y LOASSES (41)).

Estudiamos la estructura del cartílago de conjunción en los animales timectomizados, porque en los disturbios del crecimiento (acondroplasia, condrodistrofias, etc.) - existen alteraciones del grosor del mismo y de la orientación columnar del cartílago de conjunción, asistiéndose entonces a un crecimiento desordenado y anormal del mismo.

El análisis del comportamiento de la fosfatasa alcalina reviste un extraordinario interés porque esta enzima juega un papel muy importante en la calcificación de los huesos.

ROBISON (42) ha demostrado la existencia de una estrecha relación entre los lugares de formación ósea y la aparición de una actividad fosfatásica cartilaginosa u -

ósea. La enzima ha sido evidenciada en el curso de la -- osificación perióstica, de la osificación membranosa y, -- particularmente, de la osificación endocondral (BEVELAN- DER y JOHNSON (43), MOOG (44), FREEMAN y MACLEAN (45), -- KABATH y FURTH (46), HOROWITZ (47), GOMORI (48), BOURNE- (49), FOLIS y BERTHRONG (50).

La actividad fosfatásica alcalina aparece en el momen- to y en el lugar donde va a comenzar la osificación y -- donde un depósito de fosfato cálcico está en trance de -- producirse.

Esta actividad es intensa a nivel del cartílago hiper- trofiado o en los osteoblastos periósticos (a final del- estadio preosteoblasto, más exactamente, según PRITCHARD (51).

Verosimilmente, son las células hipertrofiadas del -- cartílago de conjunción las que producen la fosfatasa al- calina, gracias a la cual las trabéculas longitudinales- se calcifican. Con la calcificación, la enzima desapare- ce del citoplasma de las células.

Al principio, la enzima es abundante en el citoplasma, pero después se hace extracelular. Según LORCH y DANIELLI (52), la fosfatasa intracelular parece estar asociada a- la formación de la matriz orgánica y al hacerse después- extracelular en su mayor parte, interviene entonces en -

el depósito de fosfato cálcico. Cuando la calcificación está avanzada, la actividad fosfatásica disminuye en algunos días. En ciertos momentos, cuando las células se multiplican activamente, la fosfatasa alcalina es detectada también en los núcleos (PRITCHARD), pero esta fracción del fermento no interviene en los procesos de calcificación ósea, sino en la multiplicación celular. La actividad fosfatásica de los núcleos está íntimamente relacionada con su actividad mitótica (CHEVREMONT y FIRKET - (53), a la intensidad del crecimiento.

Quando se estudian células de multiplicación frecuente, desprovistas en la interfase de fosfatasa alcalina - citoplásmica, se observa que la fosfatasa nuclear sufre importantes cambios en el curso de la mitosis.

Numerosos hechos demuestran claramente que la calcificación resulta, al menos en parte, de un aumento local de los iones fosfato liberados a partir de los compuestos orgánicos, bajo la acción de la fosfatasa alcalina de los osteoblastos.

Los cartílagos que no se osifican nunca jamás poseen fosfatasa alcalina; tales son los casos del cartílago de MECKEL, situado a nivel de la mandíbula del condrocráneo embrionario (PELL y ROBISON (54), y de los cartílagos costales. En la avitaminosis C en la que la osifica-

ción está perturbada, hay menos fosfatasa alcalina que normalmente (BOURNE, ZARZOLI y NADEL (55).

La osteogénesis puede ser perturbada por el berilio, que es un inhibidor de la fosfatasa alcalina, como han demostrado los bioquímicos (GRIER y colaboradores (56), KLEMPERER y colaboradores (57), DUBOIS y colaboradores (58), ROCHE y colaboradores (59) y como han demostrado también los dedicados a la histoquímica en los núcleos de las células cultivadas " in vitro ". Cuando se añade berilio al medio de cultivo de esbozos óseos en crecimiento organotípico, estos últimos presentan un retardo importante del aumento de la talla, así como de la osificación perióstica. A nivel de esta zona de osificación, la actividad fosfatásica alcalina de los osteoblastos, estudiada por el método de GOMORI está fuertemente disminuida e incluso anulada (BASSLEER y colaboradores (60).

La actividad fermentativa 5-nucleotidasa merece ser estudiada porque actúa específicamente sobre el enlace glúcido-fosfato en posición 5, hidrolizando de esta manera los ésteres fosfóricos.

Además, y en el concepto de HARVY (61), juega un papel importante en los transportes de iones y moléculas, siendo realmente esta enzima la que atribuye este papel que se había atribuido a la fosfatasa alcalina.

La substancia fundamental del cartílago está constituida por agua, colágena y condromucoide, una glicoproteína en la cual el ácido condroitinsulfúrico es el grupo polisacarídico. Este mucopolisacárido es uno de los principales constituyentes de la substancia fundamental del cartílago, aunque según ciertos autores estaría acompañado de mucopolisacáridos neutros.

Las células cartilaginosas son las que efectúan la síntesis del condroitin-sulfato. En efecto, el método histoautorradiográfico demuestra que el azufre 35 se descubre inicialmente en el citoplasma de los condroblastos y después en la substancia fundamental.

A la carga eléctrica negativa que posee debe la substancia fundamental del cartílago su basofilia.

Por los estudios de AMPRINO (62), de la Universidad de Turín, se sabe que la cantidad de ácido condroitinsulfúrico de las diferentes regiones de una pieza cartilaginosa no parece estar en relación directa con la cantidad de matriz por unidad de volumen, sino con el grado de basofilia de la substancia fundamental.

Siendo ésto así, las variaciones de basofilia que se encuentren en los cartílagos de los animales timectomizados pueden ser estimadas como fluctuaciones de la cantidad de ácido condroitinsulfúrico.

La existencia de glucógeno, polisacárido neutro en -- las células del cartílago fue demostrada por vez primera por ROUGET en el año 1859.

Es un polisacárido neutro, que dá las reacciones de -- BAUER y del PAS, no es metacromético, ni tampoco basófi- lo. Aparece en el citoplasma celular bajo la forma de fi nos gránulos, que caso de ser muy numerosos pueden reu-- nirse en pequeñas placas.

Aunque existe en todas las células de aquél es más -- abundante en las células del cartílago hipertrofiado. -- Los trabajos de SCHAJOWICZ, FRITZ y CARINI (63), señalan la existencia en todas las células del cartílago, excep- to en las más periféricas de la zona de crecimiento perí- condral, y excepto también en la capa tangencial del car- tílago articular.

En la zona proliferente del cartílago en crecimiento, las células aumentan de tamaño, especialmente cuando lle- gan al área del cartílago hipertrófico. Este aumento del tamaño de las células va acompañado por un aumento en la cantidad de glucógeno, no habiendo aumento en la concen- tración por unidad de volumen citoplasmático.

En algunos casos -afirman los autores- ocurre una pe- queña disminución en gránulos de glucógeno debido a la - abundancia de vacuolas en el área de algunas células.

Al ocurrir la calcificación, el glucógeno desaparece del citoplasma de las células, sucediendo lo mismo con la fosfatasa alcalina.

SCHAJOWICZ, FRITZ y CABRINI aseguran que cuando el crecimiento es rápido el glucógeno casi siempre falta en las últimas filas del cartílago hipertrófico calcificado. En cambio, cuando el crecimiento es lento el glucógeno es abundante y muestra una distribución regular.

El papel jugado por el glucógeno en la osteogénesis no es definitivo.

El metabolismo del glucógeno aporta energía para el crecimiento y funciones sintéticas del proceso de osificación, proveyendo o suministrando, probablemente, el grupo hidrocarbonado para los polisacáridos de la matriz cartilaginosa.

O quizá, el glucógeno interviene (HAM (64) en la formación de sustancias que son luego usadas por los osteoblastos para la producción de proteínas y de mucoproteínas para la matriz oséa, o que simplemente sirven para la producción de energía.

La interferencia en el sistema enzimático del ciclo glicolítico causa perturbaciones en la calcificación y, por tanto, en el crecimiento del esqueleto.

En ratones jóvenes, hechos diabéticos mediante la ad

ministración de aloxana, se ha observado la existencia de un tenor de glicógeno muy bajo a nivel de los cartílagos metafisarios (CARLOSTELLA (65)).

La hipofisectomía produce una disminución del glucógeno en los tejidos sujetos a calcificación a los quince días de haber sido practicada (PALEARI (66)).

Los animales escorbúticos presentan también una deficiencia de glucógeno en el cartílago metafisario (CARLOSTELLA).

En algunas deficiencias metabólicas ha sido comprobada la existencia de ausencia de glucógeno; tal sucede, por ejemplo, en las carencias de ácido ribonucléico y en los casos en que existe una limitación del depósito de sulfato en los cartílagos.

A la vista de cuanto queda escrito, se comprende que el estudio comparativo de las presuntas variaciones de glucógeno en la fixis, en preparaciones controles y experimentales, puede arrojar alguna luz sobre el tipo de influencia ejercida por el timo sobre el crecimiento osteogénico.

Los mucopolisacáridos ácidos, integrados por un elemento aniónico (sulfatado), un azúcar aminado y el ácido hialurónico, son PAS negativos, son metacromáticos y se colorean por el azul alcian.

El representante a nivel del cartílago de esta variedad de mucopolisacáridos es el ácido condroitinsulfúrico.

Como se ha dicho son metacromáticos. Se entiende por metacromasia la propiedad que poseen algunos colorantes de teñir los elementos histológicos en un tinte diferente del suyo propio.

La metacromasia constituye una reacción característica ante todo de los mucopolisacáridos ácidos (LISON - - (67) y, por tanto, del ácido condroitinsulfúrico. Permite distinguir aquellos mucopolisacáridos de los que son neutros y del glucógeno.

En un principio se pensó que esta reacción era dada exclusivamente por polisacáridos de peso molecular elevado que contienen un grupo ester sulfúrico. Pero actualmente se sabe que la dan, además, todos los polisacáridos cuyo grupo ácido sea un ácido carboxílico.

La metacromasia del sistema esquelético solamente existe en el hueso y en el tejido osteoide cuando aquél está desmineralizado, pero en animales raquíticos, la matriz ósea pobremente mineralizada y baja en calcio y fósforo, también se tiñe metacromáticamente (WILLIAM y GAINESVILLE (68).

Merece la pena ante todas estas consideraciones estu

diar las variaciones que en el contenido de los mucopolisacáridos ácidos pueda imprimir la exéresis del timo.

Gotitas de lípidos fueron descritas por LEIDY (69) - en los condrocitos, en el año 1849; posteriormente, SACERDOTTI (70) y otros autores, han apoyado la naturaleza no degenerativa de estos lípidos.

Las gotitas de lípidos no deben ser de naturaleza degenerativa por cuanto los lípidos están acumulados en tejidos inmaduros. Serían una simple reserva de energía, según STOCKWELL.

Lípidos de localización extracelular también se encuentran en el tejido cartilaginoso (PUTSCHAR (71) y SCHOTT (72).

PUTSCHAR fue el primero que vió lípidos en situación pericelular, extracelular. A juicio de SCHOTT es posible que ciertas fracciones de estos lípidos se hayan incorporado a los componentes de la matriz desde las células.

STOCKWELL (73) encuentra fosfolípidos intracelulares en las zonas de cartílago en vías de proliferación y probablemente están adscritos a organitos celulares implicados en la síntesis de los componentes de la matriz, necesaria después de la división celular.

ROTHFIELD y TAKESHITA (74) emiten la hipótesis de --

que los lípidos están implicados en la síntesis intracelular de los polisacáridos complejos, tal como sucede en los lipopolisacáridos de los microorganismos.

LEVI, (75), por su parte, escribe en la página 438 de su nunca bien ponderado libro de Histología: Las gotitas de ésteres de lecitina que aparecen en gran número en el citoplasma de las células cartilaginosas hipertrofiadas se forman a expensas del condrioma, y el fósforo desprendido de la lecitina es utilizado para la elaboración del material inorgánico del hueso en vías de formación (fosfato de calcio y de magnesio).

Interesa, a la vista de todos estos datos, realizar el análisis del comportamiento de los lípidos en los cartílagos de conjunción de los animales timotomizados y su comparación con las imágenes histológicas obtenidas de material procedente de animales controles.

El análisis autorradiográfico de la distribución del radiosulfato representa un medio útil en el estudio de la diferenciación y del crecimiento del cartílago, porque permite seguir en relación con la estructura histológica, la distribución topográfica y la intensidad relativa de la síntesis del compuesto más característico de la sustancia fundamental: el ácido condroitinsulfúrico.

No se olvide que DZIEWIATKOWSKI (76) (1951) afirma --

que el azufre radiactivo se incorpora a la substancia -
fundamental en forma de condroitin-sulfato.

Se fija sobre todo en las partes de cartílago hialino que van a ser sustituidas por tejido óseo: cartílago de conjunción, capa profunda del cartílago epifisario, - de acuerdo con la tesis de SIFFERT (77), según la cual los componentes de la matriz cartilaginosa son utilizados en la formación de la matriz ósea.

Ya el mesénquima preóseo o precartilaginoso absorbe cantidades relativamente elevadas de S35, antes de que haya signos de diferenciación morfológica. En la diferenciación del hueso, el S35 parece absorbido ante todo por los osteoblastos y preosteoblastos y después se deposita progresivamente en la matriz orgánica ósea.

El fósforo radiactivo se deposita, cuando es inyectado a animales jóvenes, en las osteonas jóvenes, y su fijación es tanto mayor cuanto más reciente sea la substancia fundamental.

Se deposita también a nivel del tejido perióstico o esponjoso en vías de osificación. Las osteonas que fijan el calcio con más avidez son las osteonas menos calcificadas, es decir, las más jóvenes.

Diversos estudios establecen que el estroncio radiactivo sigue un camino similar al del calcio, y que el --

radioestroncio puede ser un conveniente indicador para observar la transferencia y el contenido del calcio en los distintos compartimientos del cuerpo.

PAPILLON (78) fue el primero en señalar, allá en 1870, el paralelismo existente entre el "turnover" de estroncio y calcio, al encontrar que cierta cantidad de este elemento puede ser sustituido en el hueso por el estroncio.

Pocos años después, KUNIG (79) descubrió que el estroncio ingerido se deposita en el hueso, y GREENBERG y colaboradores (80), por un lado, y WEISSBERGER y colaboradores (81), hallaron que el movimiento del estroncio es paralelo al del calcio, bajo el influjo de agentes como la hormona paratiroidea y la vitamina D.

ELIAS C. DOWN y STANBURY (82) concluyen en su trabajo sobre los metabolismos del calcio y del estroncio en distintas enfermedades óseas, que son cualitativamente paralelos los índices de estroncio y calcio en los trastornos del metabolismo del hueso.

El metabolismo del calcio parece ir retrasado algunos días con relación al del calcio.

La fijación de los isótopos radiactivos sobre los tejidos de la región metafisaria y sobre el resto del tejido óseo, parece estar determinada por el grado de po-

limerización de los mucopolisacáridos de la substancia-
fundamental ósea (GERSH y CATCHPOLE (83), BELANGER (84)
etc.), y es tanto más intensa cuanto más reciente es la
substancia fundamental.

Estimamos que los datos anteriormente expuestos, abo-
gan en favor del empleo de trazadores radiactivos en el
estudio de las piezas procedentes de animales que su- -
frieron la exéresis de su " glándula " tímica. -

- CAPITULO II -

- MATERIAL Y TECNICAS -

I.- MATERIAL

Se empleó como animal de experimentación el conejo vulgar (*Lepus castoreus*), por su fácil adquisición y mantenimiento, resistencia a las infecciones, y poseer un cartilago de crecimiento de gran consideración.

CAPITULO II

- MATERIAL Y TECNICAS -

Se empleó como animal de experimentación el conejo vulgar (*Lepus castoreus*), por su fácil adquisición y mantenimiento, resistencia a las infecciones, y poseer un cartilago de crecimiento de gran consideración.

Para realizar la investigación los animales fueron separados

- CAPITULO II -

- MATERIAL Y TECNICAS -

I.- MATERIAL.

Hemos empleado como animal de experimentación el conejo vulgar (*Lepus cuniculus*), por su fácil adquisición y mantenimiento, resistencia a las infecciones, y poseer un cartílago de conjunción de grosor considerable.

Siendo preciso para nuestras experiencias, una identidad absoluta entre los animales testigos y experimentales, único medio de poder valorar las posibles alteraciones observables, realizamos las mismas, del modo siguiente:

De cada camada de conejos nacidos y cuando contaban de ocho a quince días de vida, practicamos la timectomía a las dos terceras partes, con lo que llegados los dos meses de vida, el número de conejos timectomizados y testigos fueron aproximadamente los mismos, dada la mortalidad de los animales timectomizados.

Para realizar la timectomía los conejos eran separa-

dos de la coneja madre, solamente el tiempo preciso para realizar la intervención, siendo inmediatamente llevados junto a los demás de la misma camada, para que -- las condiciones de alimentación y ambientales, fuesen -- las mismas, en todos los animales de la experiencia.

En el momento de la intervención los conejos pesan -- entre 75 y 150 gramos. Creímos que era conveniente realizar la intervención en edades muy tempranas, pensando en que las posibles consecuencias en el desarrollo del animal, serían más manifiestas.

La timectomía se realizó bajo anestesia general por inhalación con TRILENE.

Debe administrarse lentamente el anestésico, pues en caso de hacerlo rápidamente, puede llevar a una apnea -- mortal. Le acercamos a las fosas nasales y boca del animal, un algodón empapado en TRILENE, hasta notar una -- pérdida de tono muscular, momento en que separamos el -- anestésico y comenzamos la intervención. De esta manera hemos tenido pocos accidentes mortales.

Hicimos una incisión pramedial izquierda, de 2 a 4 -- cms. de longitud, a nivel de los dos primeros espacios -- intercostales izquierdos. Se seccionó la inserción de -- los esternocleidomastoideos a nivel de la fúrcula exter -- nal y se extirpó la extremidad interna de la 2ª costi--

lla. Este es el momento más delicado de la intervención, ya que por su cara posterior, muy próxima a la línea media, pasa la arteria mamaria interna, cuya sección produce una hemorragia mortal para el animal. Preferimos esta vía torácica a la cervical, pues en esta última, la proximidad de glándulas como el tiroides y paratiroides, hacen probable la lesión de las mismas durante las maniobras quirúrgicas.

Una vez extirpada la 2ª costilla se dispone de un campo por el que observamos la cara anterior del timo.- Haciendo una suave tracción, ayudada por una disección roma, para no seccionar órganos tan importantes como los grandes vasos, corazón y pulmones, a los cuales se adosa dicha glándula, logramos la extirpación en un solo bloque de aquella. Cerramos con catgut por planos e inmediatamente el animal despierta y es llevado junto a los demás de la camada.

Los accidentes operatorios a considerar fueron: las hemorragias copiosas, generalmente mortales, al seccionar algunos de los vasos cercanos a la glándula.

A pesar de que la asepsia no fue muy rigurosa, no tuvimos accidentes infecciosos en el postoperatorio. En el estudio postmortem para comprobar la no existencia de timo, encontramos cicatrices fibrosas con algún exu-

gado seroso, ocupando el espacio de la glándula extirpada.

En general, la mortalidad mayor de los animales timectomizados, no apareció inmediatamente después de la intervención, sino a los quince o veinte días. En estos casos el animal adelgaza, permanece quieto, y apenas huye cuando se le persigue. En las radiografías practicadas en estos momentos, se observa intenso meteorismo abdominal y hepatomegalia. Unos acaban por morir en caquexia y otros superan este período, recuperando, aunque sólo sea en parte, su desarrollo y vitalidad.

Todos los animales experimentales y testigos, vivían juntos, en las mismas condiciones ambientales y de alimentación. Entre los 50 y 70 días de vida, fueron sacrificados mediante la sección de carótidas y yugulares a nivel del cuello. Inmediatamente se extirpaban las extremidades superiores de las tibias.

El número de conejos sacrificados y estudiados en esta experiencia fueron:

3 camadas de 3 conejos timectomizados y 2 testigos = 15 animales.

4 camadas de 4 conejos timectomizados y 2 testigos = 18 animales.

2 camadas de 1 conejo timectomizado y 1 testigo = 4 animales.

II.- TECNICAS.

En este apartado vamos a describir, la sistemática de las distintas técnicas de estudio que realizamos en los animales objeto de este trabajo:

- a) Radiografía de los conejos vivos.
- b) Técnicas histoquímicas.
- c) Estudios historradiográficos.

A) RADIOGRAFIA DE LOS CONEJOS VIVOS.

Pensamos en que podía ser de interés, practicar radiografías a los animales testigos y timentomizados, ya que las consecuencias de la extirpación del timo, podrían expresarse en alteraciones del desarrollo y estructura de los huesos, y que éstas serían observables en las placas radiográficas, siempre que dichas alteraciones fueran de cierta intensidad.

Desde el primer momento, nos dimos cuenta, que sólo serían veraces nuestras conclusiones al estudiar las imágenes radiográficas, si éstas eran obtenidas en idénticas condiciones. Para cumplir esta premisa básica, que hiciese posible poder comparar las imágenes de animales testigos y timentomizados, colocamos sobre la misma placa radiográfica, tamaño 30-40 cms, uno al lado del otro,

el animal testigo y el animal timentomizado, siempre en la misma posición. Así, con un solo disparo del haz de rayos, y en la misma placa, tenemos las imágenes de los conejos testigo y timentomizado. De esta manera, siendo igual la distancia foco-placa, las características del haz de rayos, la misma placa, el mismo tiempo de revelado y fijado, las imágenes son perfectamente comparables.

Las radiografías fueron obtenidas con un aparato de Rayos de 250 KV., distancia foco-placa un metro, con un haz de rayos de 45 Kv, y una exposición de 0.2 segundos.

En estas condiciones, nos es posible estudiar una serie de parámetros en las imágenes radiográficas, tales como longitud del tronco y extremidades, longitud y anchura de cada hueso, espesor de la cortical, densidad de las estructuras óseas, etc.

B) TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS.-

Muerto el animal, obteníamos las extremidades superiores de las tibias. Sacrificamos siempre un animal testigo y otro timentomizado, el mismo día, para que los colorantes empleados en las tinciones fueran los mismos.

Los cortes para el estudio de todas las sustancias que seguidamente citaremos, y con el fin de evitar los inconvenientes que tiene el proceso de fijación e inclu

sión en parafina, hemos utilizado la congelación directa del material de estudio, haciendo incidir sobre la pieza colocada en el portaobjetos del microtomo, el chorro de anhídrido carbónico, que escapa de la bala industrial de este gas.

Con ello se evitan las pérdidas de actividad enzimática que tienen los procesos clásicos y de los cuales dan cuenta numerosos investigadores, LISON (84), PEARSE (85).

Congelado el material se procedió a su corte, de un grosor por sección de 20 micras, con el microtomo de congelación, fabricado por SARTORIUS-WERKE (Göttingen).

Hemos de señalar que las preparaciones fueron practicadas haciendo secciones perpendiculares a la superficie del cartílago y paralelas entre sí, para evitar que la oblicuidad de las secciones, indujera a falsas interpretaciones respecto al aumento o disminución del grosor del cartílago.

Las secciones eran montadas sobre portaobjetos limpios, sin aplicación previa de ninguna sustancia.

Hemos realizado las técnicas siguientes:

- 1) Negro sudán B.
- 2) Fosfatasa alcalina.
- 3) 5-Nucleotidasa.

- 4) Pas.
- 5) Pas-Alcian.
- 6) Azul de toluidina.

Creemos de utilidad describir muestra sistemática y las razones que hemos tenido para realizar el test.

1) NEGRO SUDAN B.

Con esta técnica estudiamos los lípidos en general.- En este término se incluyen un grupo de sustancias muy heterogéneas, tanto por su constitución química, como por su significado biológico. Unos, los glicéridos, representan sustancias de reserva energética; otros, son componentes habituales de las células y más especialmente del citoplasma y de la membrana celular (Fosfolípidos). Otros, los cériidos, son la materia prima en la formación de secreciones protectoras. Los esfingolípidos se encuentran en el tejido nervioso, y por último, los carotenoides y los cromolipoides intervienen en la formación de diversos pigmentos.

Resumiendo con CIACCIO (86), los lípidos representan: sustancias de reserva, componentes celulares, y participan en los procesos de secreción glandular. Por todo ello, sufren variaciones muy importantes con la actividad celular.

Para estudiar estas sustancias, nosotros hemos empleado la tinción con el Negro Sudán B. Este colorante fue introducido en histoquímica por LISON (87). Hemos elegido este colorante por dar coloraciones más acusadas que el resto de los colorantes de los lípidos.

En algunas partes hemos utilizado como coloración citoplasmática la eosina.

El procedimiento empleado es como sigue:

- 1º.- Lavado de los cortes en alcohol de 70º durante un minuto.
- 2º.- Coloración durante treinta minutos con una solución a saturación de Negro Sudán B. en alcohol de 60º.
- 3º.- Lavado de los cortes en alcohol de 70º durante un minuto.
- 4º.- Lavado rápido con agua destilada.
- 5º.- Algunas preparaciones hicimos coloración con eosina acuosa al 1 % durante dos o tres minutos.
- 6º.- Lavado en agua destilada.
- 7º.- Una vez secado el porta con los cortes, montaje en jarabe de Apathy.

Las sustancias grasas adquieren un color azul obscuro.

2) POSFATASAS ALCALINAS.-

Entre los fermentos susceptibles de investigación -- histoquímica, tienen un lugar preferente las fosfatasas alcalinas.

Las fosfatasas son enzimas capaces de liberar ácido-ortofosfórico a partir de ésteres naturales o sintéticos. En el grupo general de estas enzimas, las fosfatasas alcalinas pertenecen al subgrupo de las fosfatasas inespecíficas, junto con las fosfatasas ácidas. Ambas -- se diferencian por el Ph en que actúan.

La primera demostración histoquímica de este enzima -- fue realizada por ROBISON y colaboradores (88).

La fosfatasa alcalina hidroliza los ácidos fosfoglicérico y fosfopirúvico, catalizando la transferencia de residuos fosforados de una molécula orgánica a otra. Es una proteína rica en leucina y ácido glutámico, y en -- menos proporción contiene ácido aspártico, alanina y valina.

La primera técnica de aplicación general en histoquí -- mia fue publicada simultáneamente por GOMORI (89) en -- Chicago y TAKAMATSU (90) en Japón, y desde entonces se -- sabe que la localización preferente de la enzima es en -- aquellos lugares donde acontece la transferencia de mo -- léculas como sucede en los territorios de absorción, o --

bien en los que tienen lugar transferencias iónicas.

La distribución del enzima en los tejidos varía con la edad, sexo, régimen alimentario y ciclo biológico.

La fosfatasa alcalina es un factor de economía de los fosfatos, DANIELLI (91); interviene en el metabolismo de los ácidos nucleicos, BRACHET (92), NOVIKOFF (93); interviene en el metabolismo de los glúcidos, CORI y colaboradores (94); interviene en el metabolismo de los prótidos, BRACHET (95), RUNNSTROM (96); influye en la diferenciación celular, BERG y KARCZMAN (97); interviene en la osteogénesis, BRADFIELD (98), ROBERTSON (99), OSAWA (100); y preside fundamentalmente la transferencia de iones y moléculas, WILLMER (101).

La localización exacta de la actividad enzimática -- exige de ciertas y obligadas premisas; influye la naturaleza del fijador empleado, por cuanto el tratamiento con acetona, por ejemplo, condiciona una distorsión de las estructuras histológicas, que dificultan la exacta localización de la enzima.

Para los enzimas que no resisten la fijación o para aquellos como las fosfatasas, que pierden gran parte de su actividad en los procesos de inclusión en parafina, la congelación de los tejidos frescos, es lo ideal.

Nosotros hemos utilizado para la demostración de la

actividad fosfatásica, la variante de la primitiva técnica de GOMORI (al calcio), introducida por DANIELLI -- (al calcio-cobalto). Elegimos esta técnica por la fácil obtención del sustrato (glicerofosfato) y de los reactivos de visualización.

Nuestro proceder fue el siguiente:

- 1º. Los cortes son incubados en estufa a 37º durante 24 horas, en una mezcla de 20 c.c. de glicerofosfato sódico al 2 %; 20 c.c. de veronal sódico al 2 %; 10 c.c. de Nitrato cálcico al 2 % y 50 c.c. de agua destilada.
- 2º. Retirados de la estufa se pasan los cortes por una solución de Nitrato cálcico al 2 % durante dos minutos.
- 3º. Pase por Nitrato de Cobalto al 2 % durante el mismo tiempo.
- 4º. Lavado en agua destilada en un minuto.
- 5º. Tratamiento por una solución diluida al 2 % de sulfuro amónico, durante un minuto.
- 6º. Lavado en agua corriente durante diez minutos.
- 7º. Pase por alcoholes y xilol.
- 8º. Montaje en bálsamo.

El resultado final es una coloración negra intensa - en los lugares donde existe actividad enzimática. En la

incubación el ión fosfórico liberado, precipita bajo la forma de fosfato cálcico, el cual, después del pase por el resto de los reactivos, se transforma en fosfato de cobalto y por último, en sulfuro de cobalto que es de color negro.

3) 5-NUCLEOTIDASA.-

Dentro del grupo de las fosfatasas específicas, la más caracterizada es la 5-nucleotidasa, que actúa específicamente sobre el enlace glúcido-fosfato en posición 5.

A WILMER (102) se debe el conocimiento de que la fosfatasa alcalina juega un importante papel en los transportes de iones y moléculas. Sin embargo, a juicio de HARVY (103), el papel que se atribuye a la fosfatasa alcalina aquí, debe ser traspasado a la 5-nucleotidasa.

Como sustrato de la reacción se utiliza el ácido adenílico, GOMORI (104); Mc. MANUS, (105); LUPTON y HARDEN, (106).

Nuestro proceder en esta técnica es como sigue:

1º. - Incubación de los cortes en estufa a 37º durante doce horas en la mezcla siguiente:

50 c. c. de solución stock.

15 c.c. de solución sustrato.

La solución stock se prepara con:

Barbital sódico al 2 %	36,5 c.c.
Cloruro cálcico al 2 %	6 c.c.
Agua destilada	61 c.c.

La solución sustrato es:

170 mgrs. de ácido adenílico en 100 c.c. de --
agua destilada.

- 2º. - Tratamiento con nitrato cálcico al 2 % un minu-
to.
- 3º. - Lavar los cortes con acetato de cobalto al 2 %
durante cinco minutos.
- 4º. - Lavar muchas veces con agua destilada.
- 5º. - Tratamiento con sulfuro de amonio al 2 %, un -
minuto.
- 6º. - Pase por alcoholes y xilol.
- 7º. - Montar en bálsamo.

La actividad enzimática se manifiesta por una colora-
ción marrón obscura, análoga a la coloración lograda --
por las fosfatasas.

4) P A S .-

La reacción al ácido periódico -Schiff es la reacción de los glúcidos más importantes en Histoquímica, al ser privativa de los polisacáridos del grupo glicol o con fracciones glucídicas.

Según EVERSO PEARSE (107) las sustancias PAS positivas, comprenden cinco grupos: polisacáridos, mucopolisacáridos, mucos y glico-proteínas, glucos y fosfolípidos.

Nosotros hemos empleado esta técnica para estudiar el glucógeno en el cartílago óseo.

El papel del glucógeno en la osteogénesis no es definitivo, su localización histoquímica ha sido descrita de maneras diferentes.

BEVELANDER y JOHNSON (108) encontraron considerables cantidades de glucógeno en asociación con zonas de formación de hueso membranoso en cerdos.

JACKSON y SMITH (109) encontraron gránulos de glucógeno en los osteoblastos, tanto "in vivo" como "in vitro".

SSHAJOWICZ, FRITZ y CABRINI (110), en su trabajo sobre el glucógeno del cartílago en vías de osificación, afirman la existencia del hidrocarbonado en todas las células del cartílago, excepto en las más periféricas de la zona de crecimiento pericondral y en la capa tan-

gencial del cartílago articular. En el cartílago hipertrófico, aumenta la cantidad de glucógeno.

Cuando el crecimiento es rápido el glucógeno casi -- siempre falta en las últimas filas del cartílago hipertrófico calcificado.

En los casos de crecimiento moderado, estas células del cartílago hipertrófico, contienen frecuentemente pe queña cantidad de glucógeno. En fin, dichos autores señalan, que cuando el crecimiento es lento, el glucógeno es abundante y muestra una distribución regular en todos los osteoblastos.

El metabolismo del glucógeno aporta energías para el crecimiento y funciones sintéticas del proceso de osificación, preveyendo o suministrando, probablemente el gru po hidrocarbonado para los polisacáridos de la matriz ósea.

La demostración del glucógeno entraña algunas dificultades. Una de ellas se refiere a la forma y cuidados que se deben tener para la fijación de las piezas de estudio. Los investigadores parecen no estar de acuerdo -- acerca del fijador de elección en esta técnica.

Entre los distintos medios de fijación empleados, te nemos:

a) Fijadores alcohólicos .. alcohol de 100° ó 90°.

Líquido de Carnoy.

- b) Fijadores con glucosa: Formol puro saturado de glucosa.
- c) Fijadores con ácido pícrico: el BOUIN-ALLEN recomendado por BAUER (111).

Nosotros hemos empleado el alcohol absoluto, a pesar de las objeciones de LISSON (112).

Otro de los problemas es que no hay ninguna reacción-histoquímica específica del glucógeno. Para lograr la identificación del mismo, hemos empleado el método de la AMILASA. Este fermento salivar hace desaparecer todo el glucógeno de las preparaciones.

La técnica del reactivo de SCHIFF para la demostración de glucógeno en el cartílago, fue propuesta por MARCHESSE (113), WISLOKI, RHEINGOLD y DEMPSEY (114), MC. MANUS y FINDLEY (115). La oxidación que produce el ácido periódico, divide el grupo glicol en dos aldehidos, que son puestos en evidencia, por el reactivo de SCHIFF.

Nuestro sistema de tinción fue:

- 1º.- Fijación en alcohol absoluto durante 24 horas.
- 2º.- Cortes por congelación.
- 3º.- Acido periódico durante cinco minutos.
- 4º.- Lavado en alcohol de 80º ó 90º.

- 5º.- Tratamiento con reactivo de SCHIFF durante 15 - minutos.
- 6º.- Pase por tres baños de ácido sulfuroso, recientemente preparado, dos minutos cada uno.
- 7º.- Lavado con agua corriente.
- 8º.- Montaje.

El glucógeno y las sustancias PAS positivas se tifican de color rojo púrpura.

5) PAS-ALCIAN.-

Entre los glúcidos, son los polisacáridos los de más interés en Histoquímica. Estos pueden ser simples, mucopolisacáridos (ácidos y neutros), mucoproteínas (ácidas y neutras) y glicoproteínas.

Para su estudio hemos empleado la técnica que visualiza los mucopolisacáridos ácidos con azul alcian, y polisacáridos simples con el PAS.

El aumento de estos materiales en el tejido es interpretado de distinta manera según los autores. Se admite que su aumento es patente, en aquellos tejidos que atraviesan un momento de crecimiento intenso, donde, por ello, las actividades metabólicas son mayores.

El azul alcian fue introducido por STEEDMAN (116). -

LISON y RIZZOLI (117) han apuntado la analogía de resultados entre la coloración de azul alción y la metacromasia, en la demostración de los polisacáridos ácidos.

Nuestra metódica en esta tinción es como sigue:

- 1º.- Coloración de los cortes por azul alción durante treinta minutos (el colorante se prepara con 3 c.c. de ácido acético glacial, 1 gr. de azul alción y agua destilada hasta 100 c.c.).
- 2º.- Lavado en agua corriente, dos minutos.
- 3º.- Pasar los cortes por una solución de ácido perródico al 0,5 % durante cinco minutos.
- 4º.- Tratamiento con el reactivo de Schiff, 15 minutos.
- 5º.- Lavar con agua destilada, cinco minutos.
- 6º.- Pasar por tres baños de ácido sulfuroso recientemente preparado, dos minutos cada uno.
- 7º.- Lavar con agua corriente, cinco minutos.
- 8º.- Deshidratar con alcoholes-xilol.
- 9º.- Montaje en bálsamo.

Las sustancias PAS positivas tienen un color rojo -- púrpura debido al reactivo de Schiff al reaccionar con el aldehído. El azul alción tiñe a los mucopolisacáridos ácidos de color azul intenso.

6) AZUL DE TOLUIDINA.-

Los mucopolisacáridos ácidos, con radical sulfúrico o carboxilo han sido estudiados por el procedimiento de la metacromasia.

La metacromasia es un test que está ligado a la presencia de aniones, que tienen caracter electro-polar. - El grupo catiónico del colorante tiende a unirse con -- los grupos portadores de la carga electronegativa, anio nes del substrato.

Los grupos electronegativos del substrato son: el -- grupo carboxilo y el sulfúrico. El primero se encuentra formando parte del ácido hialurónico y el segundo del -- queratosulfato.

El fenómeno de la metacromasia consiste, según definición de ERLICH (118), en que ciertos tintes colorean determinados elementos histológicos con un matiz o tono diferente al de la solución colorante.

Las sustancias existentes en las preparaciones histo lógicas capaces del viraje metacromático son los polisa cáridos, que contienen una función ácida y sus sales, - sobre todo las que contienen radicales éster-sulfúrico. Los mucopolisacáridos que no poseen función ácida no -- son metacromáticos.

La influencia desfavorable del alcohol en la metacromasia es conocida hace muchísimo tiempo. Se ha señalado que la metacromasia debida a los radicales éster-sulfúricos sería alcohol resistente, en tanto que la debida al grupo carboxilo no lo sería, SILVEN (119), PEARSE -- (120), KRAMER (121).

Nosotros hemos empleado el método de NISSL (modificado por PERRIN). Los pasos a seguir con esta técnica fueron los siguientes:

- 1º.- Fijación en alcohol de 96º.
- 2º.- Inmersión en agua hasta descenso de los cortes.
- 3º.- Cortes por congelación.
- 4º.- Inmersión de dos minutos en solución acuosa-alcohólica fenicada de azul de toluidina (azul de toluidina, 1 gramo; alcohol 10 c.c.; ácido fénico, 5 gramos; agua destilada, 90 c.c.)
- 5º.- Diferenciación en alcohol de 96º hasta rebajar-teñido.
Los cortes deberán conservar coloración azul -- clara.
- 6º.- Aclaramiento en xilol fenicado (ácido fénico, - 25 c.c.; xilol, 75 c.c.).
- 7º.- Montaje en bálsamo.

Las sustancias metacromáticas aparecen teñidas en color violeta o rojo, mientras que las estructuras basófilas, no metacromáticas, quedan teñidas de azul.

C) ESTUDIOS HISTORRADIOGRAFICOS.-

Fueron RONTGEN y BECQUEREL (122), los que primero observaron el ennegrecimiento de las placas fotográficas por las radiaciones ionizantes. Posteriormente, LACASAGNE y LATTES (123) en 1929, hacen las primeras publicaciones sobre la distribución del polonio y el radium en los órganos del ratón, después de que HEVESY (124), en 1923, había demostrado la importancia del empleo de los cuerpos radiactivos en biología. El impulso que ha tomado, desde entonces, el empleo de los isótopos radiactivos con fines terapéuticos, diagnósticos y en la investigación, es de todos conocido. A ello contribuyó, en gran manera, el descubrimiento de la radiactividad artificial en 1933, por CURIE y DOLOOT (125), que marcaron una nueva etapa de grandes posibilidades en el conocimiento de problemas bioquímicos no resueltos hasta el momento.

El valor de los isótopos radiactivos en la investigación descansa en las consideraciones siguientes:

- a) Un radioisótopo, en un sistema dado, se comporta como elemento estable correspondiente.
- b) La sensibilidad del método permite a menudo con masas inferiores a miligramas, siempre que la actividad específica del elemento utilizado sea suficiente.
- c) La facilidad con que un compuesto marcado puede seguirse, gracias a su radiactividad.
- d) Los isótopos radiactivos y los elementos estables, pueden utilizarse conjuntamente en diversas técnicas físicas o químicas, con lo que podemos aumentar considerablemente el alcance de los resultados.
- e) La posibilidad de estudiar el funcionamiento de sistemas biológicos intactos, sin perturbaciones de naturaleza alguna.
- f) El empleo de trazadores radiactivos ha permitido introducir el parámetro tiempo, en numerosas experiencias donde era imposible hacerlo antes.

Para lograr conocer la presencia y la distribución de un elemento radiactivo en una estructura determinada empleamos la técnica de la autohistorradiografía. El principio de esta técnica es simple, y se basa en que las radiaciones ionizantes, como la luz, producen el ennegrecimiento de una placa radiográfica. Así, al poner en contacto un corte histológico de un animal al que --

previamente se le haya inyectado un compuesto radiactivo, con una película radiográfica durante un determinado tiempo, y revelando posteriormente dicha película, - aparecen en ella zonas impresionadas (en negro), y zonas sin impresionar (en blanco). Las zonas impresionadas corresponden fielmente a aquellos puntos en los que hay radiactividad. Lo mismo que sucede con la luz, la cantidad de ennegrecimiento depende de la cantidad de radiactividad, lo que nos permite, además de localizar el lugar en que se haya el elemento radiactivo, una apreciación cuantitativa del mismo.

La aparición de emulsiones radiográficas especiales, con una gran sensibilidad y poder de definición, la simplificación de las técnicas, y por último, la posibilidad de elegir el elemento radiactivo o compuesto marcado apropiado, hacen que esta técnica sea uno de los procedimientos histoquímicos más empleados en la actualidad y de un gran porvenir en la investigación.

La autorradiografía puede detectar de cantidades muy débiles a cantidades muy grandes de elementos radiactivos, para estas últimas, el límite se encuentra dado por la capacidad de solarización de la emulsión fotográfica. - La solarización es un fenómeno de inversión, por encima del cual las densidades decrecen en vez de aumentar.

Lo más importante de la autohistorradiografía es la fidelidad de reproducción de la localización y distribución del elemento radiactivo. El recorrido de la radiación en la película va a producir un "flou" que depende de varios factores: naturaleza de la radiación, distancia entre película y corte histológico y tipo de emulsión de la película. Debemos elegir elementos radiactivos que emitan una radiación de muy escasa penetración, para que este velo sea lo menor posible, así, el carbono 14, el tritio, el azufre, cumplen esta condición. En segundo lugar, el contacto entre el corte histológico y la película deberá ser íntimo. Mas tarde veremos cómo logramos esto.

Otro factor importante en la consecución de una buena imagen autorradiográfica es el tipo de emulsión de la película que vamos a emplear.

Las emulsiones fotográficas habituales se preparan mediante la introducción de una solución de nitrato de plata o de nitrato de plata amoniacal en una solución de cloruro que contiene gelatina. Es imprescindible que la emulsión que vayamos a emplear tenga una gran homogeneidad de los microcristales que la componen. La diferencia de forma y tamaño de los microcristales de una emulsión está determinada por el método de mezcla em-

pleado y por la madurez física ulterior de la emulsión. BOGOMOLOV (126), ha elegido por esta razón, para la preparación de emulsiones fotográficas nucleares, la técnica del amoniaco, que permite obtener microcristales muy homogéneos. Las películas empleadas por nosotros son de la Casa KODAK (Plates Stripping autoradiografic A.R.10).

El mecanismo íntimo por el que la radiación emitida por el elemento radiactivo produce el ennegrecimiento de la película es similar al de la luz. En la emulsión existen microcristales de BrAg. Las cargas eléctricas antes de la exposición a la radiación son $\text{Br}^- \text{Ag}^+$. Al incidir un fotón (radiación), se une al Br^- y se libera un electrón, el cual se une a la plata y la reduce Ag^+ más electrón, igual a plata metálica.

Vamos a pasar a describir el método autorradiográfico empleado por nosotros y los distintos pasos en la consecución de la imagen autorradiográfica.

Hay dos métodos de aplicación de la emulsión al corte histológico:

- a) emulsión líquida (coating).
- b) emulsión en forma de película (stripping).

Nosotros empleamos el método de stripping o de contacto. El tipo de película la A.R., de Kodak.

El camino seguido para la autohistorradiografía es:

- 1º.- Administración del isótopo a los animales objeto de la experiencia.
- 2º.- Preparación de los cortes.
- 3º.- Puesta en contacto con la emulsión.
- 4º.- Exposición.
- 5º.- Revelado.

1º.- ADMINISTRACION DEL ISOTOPO.

A los animales de la experiencia se inyectaron tres isótopos: azufre radiactivo, fósforo radiactivo y estroncio radiactivo. Todos ellos nos fueron suministrados por la Junta de Energía Nuclear (Madrid).

Los animales testigo y timectomizados fueron inyectados en el mismo momento y con la misma cantidad de compuesto radiactivo.

El radiofósforo (^{32}P ., emisor beta, de una energía de 1.71 Mev, período de semidesintegración de 14 días), fue inyectado intraperitonealmente, a la dosis de 40 microcurios por 100 gramos de peso. Estos animales fueron decapitados a la hora y veinticuatro horas después de la administración del isótopo.

El radioazufre (^{35}S ., emisor beta de una energía de-

0,167 Mev, y período de semidesintegración de 87 días), se inyectó a la dosis de 0.32 microcurios por gramo de peso. Los animales fueron decapitados a los 10 minutos, 30 minutos.

El radioestroncio ($^{85}\text{Sr.}$, emisor gamma, de 0,51 Mev, de energía, y de 65 días de período de semidesintegración), se inyectó intraperitonealmente a razón de 0.1 - microcurios por 100 gramos de peso del animal.

El radioestroncio es un trazador muy interesante para conocer la transferencia del calcio en los distintos compartimentos del organismo.

2º.- PREPARACION DE LOS CORTES.

Una vez decapitado el animal, se extirpan las extremidades superiores de las tibias. Se fijan en formol al 10 % y guardadas en nevera. A las 24 horas con microtomo de congelación se practican cortes de 20 micras de espesor. Los cortes se pegan en portas perfectamente limpios y desengrasados. Los portas se lavan con mezcla crómica y luego se pasan repetidas veces por agua destilada. Se dejan secar al aire, sin que les llegue el polvo y posteriormente son introducidos en una solución de gelatina y alumbre de cromo.

3º.- PUESTA EN CONTACTO CON LA PELICULA.

Esta operación es realizada en cámara oscura, ya -- que las emulsiones son sensibles a la luz al igual que a las radiaciones. Solamente se puede tener encendida -- una pequeña luz roja de muy poca intensidad y a distancia de un metro del lugar donde se trabaja. Debemos esperar de 10 a 20 minutos para acomodarse a la obscuridad -- antes de empezar el trabajo.

Para colocar la película sobre el corte histológico -- deben guardarse ciertas precauciones. La emulsión se -- presenta en forma de una película de espesor constante, adosada a una lámina de vidrio. En las cajas, estas pla -- cas de vidrio con la emulsión, aparecen agrupadas de -- dos en dos, mirándose por la cara que tiene la emulsión.

En la cámara oscura, con la vista adaptada a la se -- miobscuridad, se corta con una hoja de afeitar, una se -- rie de rectángulos de 3 por 5 cms. A continuación se -- despegan los bordes de cada trozo y se colocan con sumo cuidado en un cristizador con agua destilada a una -- temperatura de 20º, con la cara de la emulsión hacia el agua. Debemos separar con sumo cuidado la película del -- cristal, para que no se desprenda un pequeño destello -- luminoso, electricidad estática, que impresionaría la -- película. Una vez colocada la película sobre la superfi

cie del agua, en unos segundos se hidrata y aumenta de tamaño. El porta con los cortes histológicos se introduce en el agua, y de abajo a arriba se hace ascender hasta colocarle debajo de la película, procurando que dicha película se extienda sin formar pliegues sobre los cortes. Luego las preparaciones se colocan en cestillos de cristal y son secados con una corriente de aire frío de diez a veinte minutos. Una vez secados los portas en los cestillos, se envuelven en papel negro y se guardan en una caja de cartón envuelta a su vez con otro papel, para impedir llegue la luz. Estas cajas se depositan en una nevera durante los días que dure la exposición, o sea, hasta el momento del revelado.

4º.- TIEMPO DE EXPOSICION.

Es un problema difícil de resolver, sobre todo en Medicina, donde es casi imposible prever la cantidad de elemento radiactivo que va a fijarse en la zona a estudiar. No hay un tiempo óptimo, ya que las distintas zonas presentan diferentes actividades. Deberán hacerse varias pruebas con tiempos de exposición variables hasta lograr una imagen correcta.

Nosotros hemos realizado varios tiempos de exposición, así:

Fósforo 3 días.
Azufre 7 id.
Estroncio 3 id.

5º.- REVELADO.

Uno de los problemas más delicados. Hay dos preceptos fundamentales: hacer el revelador con agua destilada y emplear productos puros. El revelador que empleamos tiene la siguiente composición:

Elon 2 gramos.
Sulfito sódico anhidro 90 id.
Hydroquinona 8 id.
Carbonato sódico anhidro 45 id.
Bromuro potásico 5 id.
Agua destilada 1000 c.c.

El tiempo de permanencia de la película en el revelador es de cinco minutos. Trás un paso por agua destilada, se introduce en el fijador, de 20 a 30 minutos. El fijador usado es el rápido ácido de Kodak.

Una vez fijadas se lavan las preparaciones con la película en agua destilada, para limpiarlas del fijador.- Son secadas, posteriormente, ante una corriente de aire frío.

Quedan así, en condiciones de ser observadas y estudiadas en el microscópio, con el que veremos una serie de puntos negros que corresponden a las zonas donde se localiza el isótopo.

- CAPITULO III -

- ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA -

Como se ve en una revisión longitudinal del mismo se discierne en el capítulo de conjuntos a espíritu de libertad, tres veces más frecuentemente y más en contacto con el mundo espiritual que con el mundo material, hoy día la gran mayoría de los ciudadanos.

- CAPITULO III -

- ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA -

En el debate, un tipo auxiliar, como, a menudo, se ve en la vida, en contacto con el mundo espiritual, hoy día la gran mayoría de los ciudadanos.

En fin, en contacto con el mundo espiritual, hoy día la gran mayoría de los ciudadanos, hoy día la gran mayoría de los ciudadanos, hoy día la gran mayoría de los ciudadanos.

En fin, en contacto con el mundo espiritual, hoy día la gran mayoría de los ciudadanos, hoy día la gran mayoría de los ciudadanos, hoy día la gran mayoría de los ciudadanos.

- CAPITULO III -
=====

- ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA -

Sabido es que en una sección longitudinal del hueso - se distinguen en el cartílago de conjunción o epífiso-diafisario tres zonas macroscópicamente visibles, que son:

1º.- En contacto con el hueso epifisario una capa blanco-azulada, homogénea, finamente granulosa, de cartílago hialino.

2º.- Por debajo, una capa amarillenta, densa, transparente y de aspecto estriado, construida de cartílago degenerado y calcificado: es la zona de degeneración y calcificación.

3º.- En fin, en contacto con el hueso diafisario, una capa de coloración rojiza que contiene numerosos vasos sanguíneos: es la zona de osificación, a nivel de la cual aparece el depósito óseo (zona de osteogénesis).

Examinada la sección al microscopio, previa adecuada coloración, la zona de cartílago hialino revela la existencia de dos partes, completamente distintas: una, la zo

na de reserva, está formada por cartílago hialino; la otra - zona de proliferación - está constituida por cartílago seriado.

Las tres zonas del cartílago de conjunción corresponden a tres procesos histofisiológicos que se desarrollan sucesivamente, a saber:

- a), el crecimiento del cartílago está localizado en la zona de cartílago translúcido o de cartílago seriado.

- b), la degeneración del cartílago y su calcificación están situados en el estrato cartilaginoso opaco y amarillento, y,

- c), la elaboración de las laminillas óseas ocurre en el tercer estrato, rojizo y medular. (POLICARD).

Nada nuevo tenemos que recoger en este capítulo, -- acerca de las investigaciones realizadas en torno al -- problema timo-crecimiento óseo, porque los principales trabajos han sido recogidos en el capítulo primero.

En el presente capítulo recogeremos las observaciones más importantes que hemos hallado en la Literatura en relación con el proceso de la fijación de los isótopos radiactivos azufre, fósforo y estroncio en cartílago de conjunción y zonas óseas adyacentes. Y procedemos así, para que el lector pueda comparar nuestros hallaz-

gos a este respecto con la información bibliográfica -- existente.

El azufre forma parte de la molécula del ácido condroitinsulfúrico, componente esencial del cartílago de conjunción.

DZIEWIATKOWSKI (127), BENESCH y BENESCH (128) establecen en sus estudios que el radioazufre inyectado en el organismo se va a fijar en cantidad mucho mayor en el cartílago que en otros tejidos.

DZIEWIATKOWSKI (127) afirma que el radioazufre se incorpora a la sustancia fundamental para seguir la síntesis del sulfato de condroitina.

Por su lado, LAYTON (129) había demostrado que la fijación del radioazufre en los tejidos embrionarios variaba cuantitativamente según el ritmo del crecimiento, es decir, disminuyendo progresivamente a medida que éste era más intenso (LAYTON (129) y DENKO (130)).

BOSTROM (131) observa que la cantidad de azufre que se fija en el cartílago hialino aumenta durante las dos primeras horas después de la inyección para reducirse -- dos semanas después a la mitad del valor máximo. Estas experiencias están realizadas en ratas adultas.

ODEBLAD (133) y BOSTROM (131) confirman que el radioazufre se fija sobre todo en los tejidos en los que se-

produce la síntesis de mucopolisacáridos sulfúricos.

DIZIEWIATHOWSKI (127) demuestra autorradiográficamente que el metabolismo del sulfato de condroitina es diferente en las distintas regiones del mismo hueso, conforme había señalado LAYTON (129). En efecto, en las epífisis de los huesos largos de las ratas recién nacidas, el depósito máximo del sulfato inyectado tiene lugar en las zonas del cartílago de conjunción que están en trance de ser sustituidas por tejido óseo.

Por esta razón, el autor supone la existencia de una estrecha correlación entre la síntesis del sulfato de condroitina de estas regiones y la calcificación del tejido óseo. Esta idea iría apoyada por la tesis de SIFFERT (133), según la cual los componentes de la matriz cartilaginosa son utilizados en la formación de la matriz ósea.

En las autorradiografías de ratas normales encontramos un continuo cambio en la distribución del radiosulfato. Primeramente se concentra en las células del cartílago, luego se distribuye en la matriz y a los 4-7 días se confina en el cartílago calcificado y en las trabéculas óseas.

En ratas enfermas de latirismo esta secuencia de sucesos está retrasada y a los 4-7 días el radiosulfato -

está todavía en la matriz del cartílago. Estas observaciones, efectuadas por numerosos autores (YURIKA K. - SHINTANI (134) y TAYLOR (135), ENGFELDT (136), TEGNER (137) y BERGQUIST (138).

Ello refleja una disminución de la tasa de desarrollo endocondral de los animales latíricos, por alteración del mucopolisacárido ácido contenido en la matriz.

La hipofisectomía practicada en las ratas por DENKO (130) ha condicionado menores niveles de fijación o absorción de azufre en los tejidos.

El fósforo radiactivo se presenta bajo la forma de fosfato inorgánico. Su "turnover" en el organismo es el de un fosfato disódico.

Los estudios hechos con el fósforo radiactivo inyectado por vía intramuscular han permitido conocer la fijación ósea de este isótopo. BAUER (111), CARLSSON (139) y LINDQUIST (140), han estudiado la fijación del P 32 en el sujeto normal y en el sujeto osteoporótico, observando que el radiofósforo se deposita bien sobre el hueso y que esta fijación es menor en el curso de la osteoporosis.

LACROIX (141) ha estudiado mediante el procedimiento de la autoradiografía la suerte corrida por el CA45 administrado a animales en vías de crecimiento. El isótopo se fija y permanece fijado en el tejido óseo que se forma en el momento de la inyección, pero, en razón pre

cisamente del crecimiento, el tejido óseo radiactivo se destruye rápidamente y su Ca 45 se reparte, cada vez en menor cantidad, en el tejido óseo que se elabora ulteriormente. Resulta de todo ello una redistribución continua del Ca 45, fenómeno cuyo conocimiento es indispensable para interpretar correctamente las medidas de actividad específica en el tejido óseo.

Registrado el isótopo muy pronto, o sea diez horas - después de la administración, la autorradiografía al Ca45 del hueso compacto adulto es comparable esencialmente a una especie de instantánea fotográfica que sorprendiera el proceso de calcificación intensa que se está desarrollando en el tejido en el momento de la inyección.

Haciendo el registro más tardíamente (42 horas después de la inyección del isótopo) la autorradiografía es cualitativamente fuerte y comparable a la que resulta - cuando se hace a corto plazo. Todo ello puede interpretarse como expresión, aunque discreta, de la lenta renovación hawersiana ocurrida en el entretiempo, y, por tanto, de que ha ocurrido una cierta redistribución del Ca45 fijado inicialmente.-

- CAPITULO IV -
=====

- OBSERVACIONES PERSONALES -

-- CAPITULO IV --
=====

-- OBSERVACIONES PERSONALES --

El cartílago epífiso-diafisario del conejo normal -- ofrece una estructura uniforme en todas las preparaciones estudiadas, cualesquiera que sea la técnica micrográfica empleada en su confección.

Moviendo la preparación en forma progresiva de epífi- sis a diáfisis se reconocen en él los siguientes estratos:

1º.- Una zona de células aplanadas, muchas de ellas en división mitótica, superpuestas en pilas o series regulares: es el estrato seriado ó estrato en columnas.

Dentro de cada columna, las células están separadas -- unas de otras por delgadas cápsulas o tabiques transversales y las columnas adyacentes están separadas por anchas bandas paralelas de substancia intersticial.

Esta capa es un verdadero estrato germinal, dependiendo de ella el crecimiento en longitud del cartílago y, -- por tanto, del hueso correspondiente.

El aspecto en pilas se debe a la rapidísima multipli-

cación de las células, por lo cual se comprimen recípro-
camente.

La sustancia fundamental del cartílago seriado no -
está calcificada.

La capa de cartílago seriado se confunde gradualmen-
te hacia el lado epifisario con el cartílago hialino tí-
pico de la epífisis, existiendo entre ambos células dis-
puestas en nidos (agrupaciones semejantes a los grupos-
isógenos del cartílago adulto), que muchas veces no se
sabe si adscribir al cartílago hialino epifisario o al
propio cartílago de conjunción.

Las células más inferiores de las pilas o columnas -
sufren un proceso de vacuolización del citoplasma, y al
aumentar de tamaño las vacuolas, aumenta también el vo-
lumen del cuerpo de la célula.

En cuanto al núcleo de estas células inferiores de -
las pilas, unas veces hemos encontrado aumento de tama-
ño de los mismos y otras, por el contrario, una conser-
vación del tamaño, pero de todas formas la hipertrofia-
de estas células es expresión de un proceso de carácter
progresivo.

2º.- Una zona vesiculosa o hipertrófica constituida-
por células de gran tamaño o células hinchadas que se -
encuentran alojadas en cavidades muy amplias.

Los elementos celulares existentes dentro de una cavidad están separadas entre sí por trabéculas de matriz cartilaginosa de pequeño grosor, y las cavidades están separadas entre sí, a su vez, por tabiques longitudinales de sustancia fundamental calcificada.

La matriz cartilaginosa adyacente a las células hipertróficas o vesiculosas adquiere, merced a la influencia de estas células, la propiedad de la calcificación.

Caso de haber en el plasma sanguíneo una concentración adecuada de calcio y fosfato, dicha matriz se calcifica entonces, en especial a nivel de las anchas bandas que separan columnas adyacentes de células cartilaginosas. Tiene así lugar la calcificación provisional o preliminar que proporciona rigidez a la unión entre el cartílago hialino y el tejido óseo esponjoso subcondral, sirviendo de nexo de unión entre ambas formaciones.

En el sector más profundo del estrato vesiculoso las células están degeneradas y capilares sanguíneos, acompañados de tejido conjuntivo, penetran en el interior de los condroclastos (cavidades que contienen las células cartilaginosas), previa ruptura o perforación de sus paredes.

No se conoce aún con exactitud el proceso en virtud del cual se disuelve la sustancia fundamental que sepa

ra las distintas cavidades, así como las paredes propias de éstas, pero el hecho cierto es que, en virtud de este proceso desconocido, se vacían las cavidades y el tejido conjuntivo-vascular penetra en ellas.

De esta manera se constituyen conductos, cuyas paredes irregulares están constituidas por la matriz cartilaginosa calcificada; estos conductos se llenan de tejido conjuntivo laxo y de vasos, y se van alargando a medida que se abren nuevas cápsulas.

No se crea que todas las cápsulas se vacían de células al compás de la penetración del tejido conjuntivo-vascular; algunas de ellas conservan su contenido celular y entonces estas células supervivientes se convierten en osteoblastos.

Ahora bien, la mayoría de los osteoblastos se forman por transformación de las células mesenquimatosas que acompañan a los brotes conjuntivo-vasculares.

Una vez convertidos en osteoblastos, a consecuencia de una serie de fenómenos de los cuales el que mejor observamos en muestras preparaciones es el desplazamiento del núcleo a la periferia, la célula queda como revestida de vello, a consecuencia de la considerable retracción que sufren las largas prolongaciones de las células mesenquimatosas.

El proceso que hemos descrito, observado en nuestras preparaciones y conocido ya por los trabajos de los autores clásicos depende para ordenada, de la formación de la zona de calcificación provisional, que precede inmediatamente a su avance a la penetración de los capilares en el cartílago y la eliminación de células mesenquimatosas.

Si fracasa la calcificación de la matriz cartilaginosa, a causa de una falta de los materiales necesarios para el tejido óseo, queda interrumpida la eliminación de las células cartilaginosas, y si la multiplicación de estas células en columnas prosigue como habitualmente sucede, la placa epifisaria aumenta en espesor extraordinariamente.

El aumento de la cantidad de substancia intersticial por parte de las células del cartílago de conjunción y la calcificación simultánea de la misma, hace que los osteoblastos formados resulten rodeados por ella, quedando convertidos en osteocitos.

Por esta razón, el hueso encondral esponjoso está compuesto de trabéculas de diverso tamaño, cubiertas por osteoblastos, con unos pocos osteoblastos y con los restos de la matriz cartilaginosa en el interior.

En las preparaciones confeccionadas con la técnica del

PAS- azul Alcían se observa que los mucopolisacáridos neutros (teñidos en color rojo) están localizados únicamente en la capa profunda del cartílago epifisario, o sea, en esta región que tanto se puede adscribir este cartílago como al de conjunción propiamente dicho. (Figura nº 1).

Los estratos seriado e hipertrófico solamente poseen mucopolisacáridos ácidos, reconocibles por la coloración azul propia del alcían. (Figuras nºs. 2 y 3).

Ambos tipos de mucopolisacáridos se hallan presentes en las trabéculas del tejido óseo subcondral, aunque parecen ser más abundantes los de tipo ácido (Figuras nºs 4 y 5).

Y el tejido mieloide contenido en las aréolas del tejido óseo contiene también las dos clases de mucopolisacáridos (Figuras nºs. 4 y 5).

El tratamiento de las secciones de cartílago de conjunción con el Schiff-ácido periódico permite ver granulaciones oscuras de mucopolisacáridos neutros en el citoplasma de los condrocitos del estrato hipertrófico o vesiculoso. (Fig. nº 6). Las células de la zona seriada no poseen granulaciones de estas características (Fig. nº 7).

El tratamiento previo con amilasa de algunas seccio

nes que posteriormente sufrieron la coloración por el -
Pas, demuestra que estas granulaciones son en su mayo--
ría de glucógeno, pues desaparecen por la acción de - -
aquella enzima (Fig. nº 8).

Sabido es que el azul de toluidina confiere colora--
ción violeta a la substancia fundamental del cartílago,
en tanto que tiñe a los núcleos en color azul.

Esta reacción metacromática es general, afectando --
por igual a todos los estratos que integran en grosor -
el cartílago epífiso-diafisario. (Fig. nº 9).

La observación a mayores aumentos permite comprobar--
que la intensidad de la reacción es uniforme en todos -
los puntos de la matriz cartilaginosa. (Cápsulas celula
res como trabéculas de separación de las pilas celulares
o de los grupos de células vesiculosas). (Fig. nº 10).

Existen lípidos en el cartílago de conjunción, pero--
irregularmente distribuidos (fig. nº 11). La zona seria
da carece de ellos (figs. nºs. 12 y 13), y en cambio el
estrato hipertrófico los posee (figs. nºs. 14, 15 y 16).

Los lípidos aparecen bajo la forma de pequeñas granu
laciones oscuras irregularmente distribuidas por el ci-
toplasma de los condrocitos. La matriz cartilaginosa po
see escasísimas granulaciones.

La incubación en la mezcla de GOMORI de secciones car

tilaginosas procedentes de animales controles evidencia la existencia de actividad fosfatásica alcalina en la mitad diafisaria del cartílago de conjunción, o sea, en la mitad de éste que queda del lado de la diáfisis (Figs. nºs. 17 y 18).

También la zona subcondral posee una gran cantidad de enzima, localizada tanto a nivel de las trabéculas como en el tejido medular que ocupa las celdillas esponjosas (Fig. nº 19).

La inexistencia de fosfatasa en el cartílago seriado queda demostrada en la Fig. nº 20, y la gran abundancia de la misma en la zona hipertrófica en la Fig. nº 21.

Tras la incubación en la mezcla de GOMORI, el fermento es visualizado en forma de finos gránulos, visibles tanto a nivel de los condrocitos como en la matriz fundamental (Figs. nºs. 22, 23 y 24), y en aquéllos ocupan tanto los núcleos como los citoplasmas.

El cartílago de conjunción posee actividad 5-nucleotidásica, más no en todo su espesor.

Las capas más próximas al lado epifisario del estrato seriado carecen de ella, conforme demuestra la Fig. nº 25.

La actividad enzimática está traducida en las preparaciones tratadas por la metódica de McMANUS por peque-

ños gránulos negros de asiento en los condrocitos y en los tabiques de substancia fundamental (Figs. nºs. 26, 27 y 28).

La inyección de fósforo radiactivo a conejos controlados nos ha permitido observar, una hora después, que este elemento se deposita difusamente en todo el espesor del cartílago de conjunción, en el sector más profundo de la epífisis y en el tejido óseo subcondral del lado diafisario. (Fig. nº 29).

El depósito en el cartílago interesa exclusivamente a la matriz cartilaginosa (Fig. nº 30).

A las veinticuatro horas de la inyección, la fijación en las zonas indicadas se ha hecho más intensa (Figura nº 31), y por lo que respecta al cartílago se observan también granulaciones dispersas del material radiactivo en los condrocitos del estrato vesiculoso o hipertrófico. (Fig. nº 32).

El estroncio radiactivo al depositarse en todo el espesor del cartílago de conjunción permite la observación microscópica directa del mismo, sin necesidad de tener que recurrir a ninguna coloración. (Fig. nº 33).

El estroncio se fija desde el primer momento en matriz cartilaginosa y en los condrocitos, amén natural-

mente de hacerlo en el tejido óseo subcondral (Figs. --
n^{os}. 34, 35 y 36).

Los condrocitos del estrato hipertrófico aparecen de
limitados por un trazo negro muy nítido y muestran pe--
queñas expansiones que le confieren un aspecto irregu--
larmente denticulado, expresión clara de su transforma--
ción en osteoblastos (Fig. n^o 37). El depósito de peque--
ñas granulaciones en el protoplasma de los mismos es es--
caso y exige una detenida observación microscópica. --
(Fig. n^o 38).

El depósito de azufre radiactivo en el cartílago de--
conjunción es visible ya desde los 10 minutos siguientes
a la inyección (Fig. n^o 39), y aumenta progresivamente--
hasta siete días más tarde (Figs. n^{os}. 40, 41, 42 y 43).

El isótopo se fija en mayor cantidad en el tejido --
óseo subcondral que en el propio cartílago (Fig. n^o 40),
y en éste lo hace uniformemente al principio (Fig. n^o 40),
pero después se deposita más intensamente en la zona de
cartílago hipertrófico (Fig. n^o 42).

En los primeros momentos el azufre se fija en forma--
difusa, confiriendo al sector de cartílago correspon--
diente, el aspecto de una sombra más o menos amplia, pe--
ro en los últimos plazos horarios de muestras observa--
ciones, se deposita en forma de finísimas granulaciones

negras (Fig. nº 45), abundantísimas sobre todo en la región del cartílago hipertrófico o vesiculoso.

La ablación del timo produce las siguientes alteraciones orgánicas, observables ya a partir de los 15 días de la extirpación:

- Adelgazamiento, del orden del 20 %.
- Aumento del perímetro abdominal, quizás por distensión de las asas intestinales.

- Diarrea.

- Tristeza y disminución de la agilidad, con movimientos torpes.

- Los animales que superan los 15 días -fecha crítica en que ocurre una gran mortalidad-, recuperan parte del peso y mejoran su fuerza y agilidad, pero sin llegar a las características normales.

En la autopsia de los animales timentomizados que fueron sacrificados entre los 50 y 60 días después de la intervención nos encontramos con los siguientes hallazgos:

- Asas intestinales muy distendidas.

- Bazo reducido de tamaño.

- Hepatomegalia.

En las radiografías de los animales timentomizados -

(Figs. nºs. 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 y 53) hemos encontrado las siguientes alteraciones:

- Disminución de la longitud corporal.
- Disminución de la altura de los cuerpos vertebrales.
- Disminución de la longitud del iliaco y del fémur.
- Menor densidad ósea.
- Dilatación de la cavidad abdominal.
- Disminución de la amplitud de la cavidad torácica.

La eliminación del timo en animales jóvenes provoca las siguientes alteraciones de los test estudiados:

- Disminución considerable del grosor del cartílago de conjunción, como puede observarse en las preparaciones confeccionadas con las diversas técnicas (Fig. nº 54).

- Disminución de longitud de las columnas de células propias del cartílago seriado (Fig. nº 55) y disminución del tamaño e irregularidades morfológicas de los condrocitos del cartílago hipertrófico (Figs. nºs. 56 y 57).

- Desorganización de la ordenación celular de las columnas y el cartílago hipertrófico aparece constituido por grandes islotes de forma globulosa (Fig. nº 58).

- Conservación del cierre de los condrocitos de la zona hipertrófica, no observándose, por tanto, penetra-

ción de yemas conjuntivo-vasculares en el interior de los mismos.

- Vacuidad de muchos condroplastos (Fig. nº 59), aunque conservan intactas sus paredes.

- Las areolas del tejido óseo subcondral son amplias, pero apenas contienen tejido mieloide (Figs. nºs. 56, 60 y 61).

- Las paredes de estas areolas contienen mucopolisacáridos ácidos y no poseen mucopolisacáridos neutros, (Fig. nº 62).

En cambio, la zona epifisaria lindante con el cartílago de conjunción sigue conservando un cierto tenor de mucopolisacáridos de este último tipo (Fig. nº 56).

- El cartílago propiamente dicho, acusa una depleción enorme de mucopolisacáridos ácidos (Figs. nºs. 54 y 57); los mucopolisacáridos neutros disminuyen e incluso llegan a desaparecer en muchos condrocitos (Figs. nºs. 62, 64, 65 y 66).

- Disminución de la basofilia y disminución también de la reacción metacromática, (Figs. nºs. 67, 68, 69, 70 y 71).

- Los lípidos sudanófilos del cartílago seriado pueden disminuir o pueden permanecer inalterables, según los casos.

La disminución (Figs. n^{os}. 72, 73 y 74), afecta especialmente a los que tienen localización intracelular, - pues en la substancia fundamental siempre se encuentra alguno que otro gránulo disperso.

Las figuras 75, 76 y 77, corresponden a cartílagos - de animales timectomizados que no sufrieron depleción - en su contenido lipídico.

La actividad fosfatásica alcalina del cartílago de - conjunción sufre inicialmente en los animales timectomi - zados una disminución de actividad a nivel del estrato - hipertrófico, pero en cambio, aparece en las zonas media e inferior del estrato columnar o seriado (Figs. n^{os}. - 78, 79, 80, 81, 82 y 83).

Los gránulos negros que traducen esta actividad enzi - mática aparecen localizados en el citoplasma de los con - drocitos, no existiendo ni en los núcleos, ni tampoco - en la matriz cartilaginosa, (Fig. n^o 84).

Con el transcurso del tiempo (animal sacrificado 45 - días después de la timectomía) termina por desaparecer - la actividad enzimática en las regiones del cartílago - seriado que normalmente no la tienen y en que había apa - recido como consecuencia de la intervención, y en el - cartílago hipertrófico conserva el bajo nivel alcanzado tras la timectomía.

- La 5-nucleotidasa desaparece en el cartílago seriado y también en la matriz cartilaginosa del estrato hipertrófico o vesiculoso; en algunas células cartilaginosas de este último estrato se pueden visualizar alguno- que otro gránulos negros diseminados por los protoplasmas. (Figs. nºs. 85 y 86).

Las trabéculas óseas de la región subcondral y el contenido de las areólas de esta región (tejido mieloides) poseen en cambio un elevado nivel de actividad fermentativa (Figs. nºs. 85, 87 y 88).

- El fósforo radiactivo inyectado a animales timectomizados a la hora de la inyección apenas se ha depositado en la sustancia ósea de la región subcondral; en cambio, en la matriz del cartílago de conjunción existe en mayor cantidad que en los animales controles a la misma hora. Los condrocitos de la región hipertrófica y los osteoblastos de la zona subcondral poseen también mayor cantidad de granulaciones que en los animales controles. (Fig. nº 89).

A las 24 horas de la inyección, ha aumentado la fijación de material radiactivo en algunas de las trabéculas del tejido óseo subcondral, pero un gran número de trabéculas poseen menor cantidad de fósforo que en los animales controles, (Figs. nºs. 90, 91 y 92).

Coincidiendo con este hecho, algunos condrocitos de la zona cartilaginosa hipertrófica han perdido los gránulos de fósforo radiactivo, (Figs. nºs. 93 y 94).

El estroncio radiactivo se fija en menor cantidad en el cartílago de conjunción de los animales timentomizados (Figs. nºs. 95 y 96), llegando a la anulación del depósito en los animales que sobrevivieron 45 días. -- (Fig. nº 97).

La timentomía altera también el mecanismo de fijación normal del azufre radiactivo, determinando un menor depósito de éste, tanto en cartílago como en el tejido óseo subcondral (Figs. nºs. 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104 y 105).-

- CAPITULO V -

CONSIDERACIONES GENERALES Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

La alteración del tipo de hueso, evidentemente, altera
radicalmente aquellas reacciones radiográficas, y
a la vez que una disminución general del peso corporal
del animal. Para es conveniente que aquellas alteraciones
no sean generalizadas, sino que queden reducidas a vérte-
bras, fémur, clavícula, humero y fémur.

- CAPITULO V -

- CONSIDERACIONES GENERALES Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS -

En el presente estudio se ha tomado como material de estudio
el hueso de la mano, y se ha supuesto que al igual que
existe en éste las alteraciones en los cartílagos de
unión de las otras piezas óseas.

Como se ha indicado en el capítulo anterior, todos
los tejidos estudiados han sufrido una evidente
alteración en los animales timectomizados, y también ha
resultado perturbada la reacción autorradiográfica del
cartílago frente a los isotopos estroncio y azufre, sup-

- CAPITULO V -
=====

CONSIDERACIONES GENERALES Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

La extirpación del timo produce, evidentemente, alteraciones esqueléticas reconocibles radiográficamente, a la par que una disminución general del peso corporal del animal. Pero es sorprendente que aquellas alteraciones no sean generalizadas, sino que queden reducidas a vértebras, tórax, cinturón pelviano y fémur.

Y sorprende por cuanto microscópicamente se comprueban alteraciones estructurales e histoquímicas en el cartílago de conjunción de la extremidad superior de la tibia, que es el que hemos tomado como material de estudio en nuestro trabajo, y es de suponer que al igual que existen en éste las haya también en los cartílagos de conjunción de otras piezas esqueléticas.

Como se ha indicado en el capítulo anterior, todos los test de estudio empleados han sufrido una evidente alteración en los animales timentomizados, y también ha resultado perturbada la reacción autorradiográfica del cartílago frente a los isótopos estroncio y azufre, aun-

que no en el mismo sentido la correspondiente al fósforo 32.

La ablación del timo produce por de pronto una reducción considerable del grosor del cartílago de conjunción, una reducción de la longitud de las " pilas " del estrato seriado y una alteración morfológica considerable del estrato vesiculoso o hipertrófico del cartílago.

Dado que el estrato seriado es el responsable del crecimiento en longitud de la pieza esquelética, y dado también que el estrato hipertrófico o vesiculoso es el protagonista del proceso de osificación, parece lógico interpretar nuestras imágenes como expresión de una perturbación del crecimiento de índole retraso.

También los hallazgos de naturaleza histoquímica apuntan en el mismo sentido (o en la misma dirección).

En efecto, el glucógeno desaparece de las células del estrato vesiculoso, y sabido es, por los estudios de -- SCHAJOVICZ, FRITZ y CABRINI (110) que en el cartílago de conjunción en vías de crecimiento existe un aumento de la cantidad de este carbohidrato.

La disminución de glucógeno que encontramos vá pareja con una limitación del depósito de sulfato, hecho comprobado por algunos autores y ratificado por nuestras propias observaciones.

La disminución de glucógeno que registramos condiciona -siguiendo las ideas de HAM- (64), una deficiencia de producción de proteínas y mucoproteínas que luego utilizan los osteoblastos para la producción de la matriz osteoide, y por tanto, una deficiente producción también de esta matriz.

Los condrocitos de los animales timectomizados elaboran menor cantidad de mucopolisacáridos ácidos y, por - tanto, la matriz cartilaginosa resulta defectuosa.

He aquí la razón de que la basofilia y la reacción - metacromática del cartílago de conjunción se alteren y - lleguen a desaparecer.

Si se tiene en cuenta que los trabajos de WILLIAN y - GAINESVILLE (68) demuestran que la reacción metacromática esquelética solamente es dada la matriz pobremente - mineralizada, habría que estimar nuestros hallazgos como trasunto de aumento de mineralización en la zona vesiculosa del cartílago.

Pero si se consideran las opiniones de DZIEWIATROWSKI (127) según la cual existe una estrecha relación entre la síntesis del sulfato de condroitina y la calcificación del tejido óseo, que se neoforma paralelamente a la destrucción del cartílago, y la de SIFFERT (133) según la cual los componentes de la matriz cartilaginosa serían utiliza--

dos en la formación de la matriz ósea, resulta insostenible la tesis sostenida por WILLIAN y GAINESVILLE (68).

Nosotros podríamos lanzar una tesis intermedia, considerando nuestros hallazgos relativos a la fijación de fósforo y estroncio radiactivos. Esta tesis sería elástica, es decir, apoyaría la opinión de estos últimos autores, respecto al fósforo, y en cambio, estaría más en consonancia con la idea de DZIEWIATROWSKI (127) y SIFFERT (133), respecto a calcio y azufre.

Los lípidos del cartílago de conjunción sufren cambios indiscriminados, ora disminuyen, ora se conservan aparentemente invariables, ora aumentan. Decimos aparentemente, porque al lector se le alcanzará lo difícil que es valorar en la imagen histológica la cantidad de una substancia, y que esta valoración puede estar sujeta a error.

La tesis defendida por ROTHFIELD y TAKESHITA (74) de que los lípidos están implicados en la síntesis intracelular de los polisacáridos complejos, no puede ser admitida más que en los casos en que parecen estar disminuidos, por que en tales casos el glucógeno está ausente.

La timectomía produce una reducción considerable del mecanismo de calcificación del esqueleto, al anular la producción de fosfatasa alcalina por parte de las célu-

las hipertrofiadas del estrato vesiculoso del cartílagos. Recuérdese que esta enzima es la responsable de la calcificación de las trabéculas cartilaginosas de -- aquel estrato.

Apaga también la actividad 5-nucleotidásica del cartílago, con lo cual se perturba el metabolismo de los prótidos y la difusión del agua y de los iones desde -- los vasos del estrato subcondral. Todo ello es expresión de una disminución de la actividad vital del cartílago de conjunción.

Nuestro estudio autorradiográfico de la absorción -- de azufre radiactivo en el cartílago de conjunción demuestra que la timectomía produce una disminución de -- azufre radiactivo en aquél, debido a una interferencia primaria del metabolismo o síntesis de los mucopolisacáridos ácidos, en particular del sulfato de condroitina.

Nuestras observaciones son paralelas, por tanto, a las realizadas por DUPUIS, GRAF y BESCOL-LIVERSAC (142) en 1967: una elevación correlativa de la fijación del sulfato (azufre) y del calcio en los tejidos metafisarios (cartílago de conjunción y hueso de neoformación) acompaña al impulso de crecimiento que se observa en -- ratas raquíticas cuando son tratadas por la vitamina D.

También CHARLES W. DENKO (143) encuentra en el cartí-
lago atrofiado de ratas hipofisectomizadas menores nive-
les de absorción de azufre en los tejidos.

La disminución de la absorción de estroncio por el -
cartílago de conjunción es otro índice del retraso del-
crecimiento esquelético.

Por el contrario, el comportamiento del "turnover" -
del ion fósforo era de distinto signo en nuestros anima-
les experimentales, asistiéndose a un aumento de la fi-
jación del mismo en los tejidos metafisarios.

Estas observaciones no van de acuerdo, por otra parte,
con las de PARHON, POTOP y NICOLESCOU-ZINCA (38) en ani-
males sanos y cancerosos, pues nosotros hallamos un de-
pósito muy alto del ion en los tejidos metafisarios, y-
en cambio los autores rumanos encuentran que la adminis-
tración de extractos tímicos aumenta la incorporación -
del P32 en los diversos órganos de los animales testi-
gos y también en los animales portadores de tumores, --
significando que el extracto tímico estimula la veloci-
dad del metabolismo fosforado.

Tampoco va de acuerdo con nuestras observaciones en-
otros terrenos, porque demostrada que la timectomía con-
diciona una deficiente creación de la sustancia funda-
mental, lógicamente el fósforo radiactivo debería de---

positarse en pequeñísima cantidad.

La correlación entre la presencia de mucopolisacáridos sulfatados y la mineralización de las matrices calcioafines es un hecho bien evidente. DUPUIS, GRAF y BESCOLLIVERSAC (142) demuestran que la hipofisectomía y el raquitismo tienen una lesión bioquímica común, cuál es el empobrecimiento en mucopolisacáridos sulfatados y el efecto de mineralización que es subsidiario a aquel empobrecimiento. Sin embargo, los cuadros morfológicos en ambas enfermedades son opuestos.

El depósito exagerado de fósforo no explicaría la menor densidad radiográfica que presentan los huesos de los animales timentomizados en nuestras radiografías.

¿A qué se debe el comportamiento tan diferente que tiene el turnover óseo del fósforo con relación a los ciclos de calcio y azufre?

Honradamente no podemos contestar a esta pregunta.

Llegados a este punto, debemos preguntarnos sobre el mecanismo patogénico de los cambios estructurales e histoquímicos determinados en el cartílago de conjunción por la extirpación o exéresis del timo. ¿A qué se debe el que la ablación de este órgano produce alteraciones en el cartílago?

En principio, podría atribuirse al fallo de un "Factor

humoral tímico" estimulante de la secreción de las células adenohipofisarias que elaboran la somatotrofina, habida cuenta de que tras hipofisectomías, DUPUIS, GRAF y BESCOT-LIVERSAC (142) han encontrado alteraciones similares a las que hallamos nosotros por extirpación del timo, a saber: atrofia, desaparición más o menos completa de la capa hipertrófica y desaparición de los mucopolisacáridos sulfatados que esta capa elabora.

Pero para confirmar esta idea, es necesario repetir las experiencias, administrando hormona somatotrofa a los animales timectomizados. Solamente el hallazgo de cartílagos normales en estos animales permitiría el establecimiento del mecanismo patogénico que acabamos de apuntar-apriorísticamente.

Los autores clásicos lo atribuirían, sin duda, a la carencia del glutatión o de una fracción parecida a ésta, pues tanto en los extractos utilizados por ASHER (26) como en los de HANSON (27) se aprecia gran cantidad de azufre, y el grupo de ROWNTREE (27) ha descubierto que usando solamente la cisteína y el glutatión pueden lograrse semejantes a los que se consiguen con el extracto del timo.

La arginina, lisina y cistina son estimulantes del crecimiento, siendo el más poderoso la cistina con su derivado, la cisteína. Excita también el crecimiento además

del glutatión la vitamina C. Según GUDERNATSCH (144), hay una enzima específica del timo que está destinada a formar el glutatión a base de la cisteína, ácido glutámico y glicina, y ceder posteriormente este compuesto a los otros tejidos una vez terminada la elaboración.-

CONCLUSIONES

1. Se ha observado en el cartilago de la nariz una actividad enzimática que produce la degradación de la matriz cartilaginosa.

2. La actividad enzimática es mayor en el cartilago de la nariz que en el cartilago de la rodilla.

3. La actividad enzimática es mayor en el cartilago de la nariz que en el cartilago de la rodilla.

CONCLUSIONES

1. Se ha observado en el cartilago de la nariz una actividad enzimática que produce la degradación de la matriz cartilaginosa.

2. La actividad enzimática es mayor en el cartilago de la nariz que en el cartilago de la rodilla.

3. La actividad enzimática es mayor en el cartilago de la nariz que en el cartilago de la rodilla.

4. La actividad enzimática es mayor en el cartilago de la nariz que en el cartilago de la rodilla.

5. La actividad enzimática es mayor en el cartilago de la nariz que en el cartilago de la rodilla.

- CONCLUSIONES -

Del estudio de nuestras series de radiografías y de preparaciones micrográficas, obtenidas de conejos controles y de conejos timentomizados, se coligen las siguientes observaciones:

1ª. - La timentomía produce una atrofia del cartílago de conjunción.

2ª. - La timentomía hace desaparecer el glucógeno del citoplasma de las células del estrato hipertrófico o vesiculoso.

3ª. - La timentomía condiciona la producción de una matriz cartilaginosa pobre en mucopolisacáridos ácidos (ácido condroitinsulfúrico).

4ª. - La timentomía anula la actividad fosfatásica alcalina del cartílago epífiso-diafisario.

5ª. - La timentomía destruye la actividad 5-nucleotidásica del cartílago de conjunción.

La pérdida de esta actividad significa una alteración del metabolismo de los prótidos que interviene en la elaboración de la matriz cartilaginosa y también el fallo del trasiego de agua y de iones desde el estrato subcon-

dral vascularizado.

6ª. - La fijación del azufre radiactivo está perturbada, porque al haber menor cantidad de matriz existe - consecuentemente una inhibición de la incorporación de aquel elemento radiactivo dentro del sulfato de condroitina.

7ª. - El cartílago de conjunción normalmente fija -- una cantidad apreciable de estroncio.

La extirpación del timo, reduce a niveles muy bajos - esta fijación, así como la que normalmente ocurre en -- las trabéculas de tejido endocondral del estrato subyacente al cartílago.

8ª. - El fósforo radiactivo se fija en mayor cantidad en los tejidos metafisarios de los animales timectomizados que en los mismos tejidos de los animales controlados.

9ª. - Radiográficamente, se aprecia en el esqueleto de los animales timectomizados una menor longitud de -- las piezas esqueléticas y una menor densidad del contraste radiológico.

10ª. - Es evidente que la extirpación del timo produce alteraciones del desarrollo corporal y esquelético.

Se sugiere una hipótesis para explicar la patogenia de los cambios estructurales e histoquímicos hallados - en el cartílago de conjunción de los animales timectomizados.

- BIBLIOGRAFIA -

- 1.- GRANT, H.- The practice of Endocrinology.- Ed. by Spottiswoode, London, 1932.
- 2.- HAYES, J.- Endocrinología quirúrgica.- Cirugía del sistema endocrino.- Tomo IV.- Diana, Artes Gráficas, Madrid, 1939.
- 3.- HAYES, J.- Hayes, J.; McLaughlin, J.A.- En vivo studies in immunobiology.- Cold. Harbor, N.Y. N.4 - - 1934, pag. 114.
- 4.- WILLIAMS, G. - BIBLIOGRAFIA - Nature, 153, 403, 1959.
- 5.- JAMES WOOD, M.- La fisiología del tiro. - Colección de Monografías Médicas. 1951.
- 6.- WINTER, R. de.- Etude Physiques des Thyroïdes: et des glandes voisines.- G.R. N. A., 23, 57, 9, 1911.
- 7.- ANKERT, Anat. Record, 11, 209, 1929.
- 8.- PEARCE, Proc. Soc. exp. Biol. and Med.- 24, 319, 1927.
- 9.- KLOSE, G. Beitr. z. Klin. Chir.- 76, 1, 1919.
- 10.- ARZAKI, Anat. Record.- 47, 318, 1938.
- 11.- GONZA, G.R. Soc. 127, 962, 1938.
- 12.- L. de.- Arch. Scienc., 15, 183, 1934.

- BIBLIOGRAFIA -

- 1.- GREENE, R.- The practice of Endocrinology.- Eyre Spottiswoode, Londres, 1948.
- 2.- ESTELLA, J.- Endocrinología quirúrgica.- Cirugía del sistema endocrino.- Tomo I.- Diana, Artes Gráficas. Madrid, 1939.
- 3.- SZENT GYORGY, A.- Hegyeli, A; Mc Laughlum, J.A.- En the Thymus in immunobiology.- Good. Hoeber. Ed.; N.4 - - 1964, pág. 114.
- 4.- WILLIAMS, C.M.- Moorhead, L.V.; Pulis, J.F.- Nature, 183, 405, 1959.
- 5.- ALVAREZ COCA, M.- La patología del timo.- Colección española de Monografías Médicas. 1951.
- 6.- WINIWARTER, H. de.- Ilots thymiques des thyroïdes et parathyroïdes.- C.R. A. A., 28, 57, 9, 1932.
- 7.- ACKERT.- Anat. Record, 44, 209. 1929.
- 8.- PEARCE.- Proc. Soc. exp. Biol. and Med.- 24, 319, 1924.
- 9.- KLOSE y VOGT.- Beitr. z. Klin. Chir.- 79, 1, 1910.
- 10.- AHEARN y JOB.- Anat. Record.- 45, 118, 1930.
- 11.- COMSIA.- C.R. Soc. Biol., 127, 903, 1938.
- 12.- LEITES.- Bioch. Zeitschr., 150, 183, 1924.

- 13.- LINDBERG.- Fol. Neuropath. Estoniana.- 2, 42, 1924.
- 14.- MATSUNO.- Bioch. Zeitschr., 123, 27, 1921.
- 15.- MORRIS.- Anat. Record, 44, 209, 1929.
- 16.- ROWNTREE.- The Jour. of the Amer. Med. Assoc., 103, 1425
1430, 1934.
- 17.- CHIADI.- 1938.- Citado por ALVAREZ COCA.
- 18.- PARK.- Citado por ALVAREZ COCA.
- 19.- McCLURE.- 1939.- Citado por ALVAREZ COCA.
- 20.- RICHTER y JAFFE.- The Journ. of Exper. Med., 47, 981, -
1928.
- 21.- JOLLY y LIEURRE.- C.R. Soc. de Biol., 102, 762, 1929.
- 22.- GOTTESMAN y JAFFE.- The Jour. of. esp. Med., 48, 403, -
1926.
- 23.- GODARD, H.- Arch. d'Anat. micr. 40, 1951, 223.
- 24.- SKLOWER, A.- Zsch. f. vergl. Phusiol. 2, 6, 1925.
- 25.- ROMEIS, B.- Biochem, Zsch. 135, 85, 1926.
- 26.- ASHER.- Endocrinology.- 7, 321, 1930.
- 27.- ROWNTREE, L.G.; CLARK, J.H., y HANSON, A.M.- J.A.M.A. -
103, 1425, 1934.
- 28.- ARIYOSKI.- Nagasaki Igakkroi Zassi.- 10, 606-621, 1932.
- 29.- MEITENLEITER.- The Amer. Journ. of Surg.- 17, 177-182,
1932.
- 30.- ENRIQUES, P.- Hiperfunción del timo en los animales que
presentan un hueso fracturado.- C.R. A.A., 20, 423,
1925.

- 31.- NITSCKE.- Monatschr. für Kinderh.- 47, 531, 1930.
- 32.- REISS.- Die Hormonforschung und ihre Methoden.- pág. 60
64.- Urban und Schwarzenberg, 1934.
- 33.- GEBEL, D.- D. Zeitschr. F. Chirg.- 215, 186, 1929.
- 34.- COMSA, J.- C. R. Acad. Sce.- 228, 2061, 1949.
- 35.- SANCHEZ MARTIN, J.A.; LINAZASORO, J.M.- Acción del timo
sobre la utilización periférica de la tiroxina (T-4).
Simposio sobre aplicaciones de los radioisótopos. -
Junio 1967.- Junta de Energía Nuclear.- Madrid.
- 36.- SMELLIE, R.M.S.- ^{32}P . incorporation in nucleic acids of
different rabbit tissues.- Biochem, J. 60, No 2, --
1955.
- 37.- ARAK, M.- Investigation of phosphorus metabolisme of as
cites hepatome with the acid of ^{32}P .- Excerpta Med.
Sect. V. 8, 1955, 476.
- 38.- C.I. PARHON; I. POTOP; D. NICOLESCOU-ZINCA.- Contribu--
tion a létude biochimique des Processus tumoraux --
línfluence du thymus sur l'incorporation du Phospho
re-32.- Conference internationale sur les radioiso-
topes dans la recherche scientifique.- Unesco/ NS/-
Ric/ 153.
- 39.- RUBIN.- Citado por LEFEBVRE y col. en comunicación pre-
sentada al Primer Congreso de la Asociación Europea
de Radiología.- Septre 1967.

- 40.- PETERSEN, H.- Die Gelenke.- In "Die Gewebe". Handb. - -
mikrosk. Anat. Menschen, Springer Verlag, Berlin, -
Vol. II /2, 648-678, 1930.-
- 41.- FANUCCI, A; y LOASSES, A.- Comunicación al Primer Con--
greso de la Asociación Europea de Radiología.- Sep--
bre 1967.
- 42.- ROBINSON, R.- The possible significance of hexophospho--
ric esters in ossification.- Biochemical J., 17,286
293, 1923.
- 43.- BEVELANDER, G, y JOHNSON, P.L.- The histochemical loca--
lization of alkaline phosphatase in the developing--
tooth.- J. Cell and Comp. Physiol, 26, 25-33,1945.
- 44.- MOOG, F.- Localization of alkaline and acid phosphatase
in the early embryogenesis of the chick.- Biol.Bull.
85, 51-80, 1944.
- 45.- FREEMAN, S, y MC LEAN, F.C.- Experimental rickets and -
tissues changes in puppies receiving a diet very --
low in phosphorus with and without vitamin D.-Arch.
Path. 32, 387-408, 1941.
- 46.- KABAT, F.A., y FURTH, H.- A histochemical study on the--
distribution of alkaline phosphatase in various nor--
mal and neoplastic tissues.- Ann. J. Pathol. 17, --
303-318, 1941.
- 47.- HOROWITZ, N.H.- Histochemical study of phosphatase and--
glycogen in fetal heads.- J. Dent. Res., 21, 527, -
1942.

- 48.- GOMORI, G.- Calcification and phosphatase.- Ann. J. - -
Pathol., 19, 197-209, 1943.
- 49.- BOURNE, G.- The distribution of alkaline phosphatase in
various tissues.- Guast. J. Exper. Physiol., 32, --
1-20, 1944.
- 50.- FOLLIS, R.H., y BERTHRONG, M.- Histochemical Studies on
cartilage and bone.- The normal Pattern Bull.-Johns
Hopkins Hosp., 85, 221-297, 1949.
- 51.- PRITCHARD, J.J.- The osteoblasts in the biochemistry --
and Physiology of bone.- Edited by G.H. Bourne, New-
York.- Academic Press Inc. 1956.
- 52.- LORCH, I.J.- Alkaline phosphatase and the mecanism of -
ossification.- J. Bone and Joint Surg., 31-B, 94-99,
1949.
- 53.- CHEVREMONT, M. y FREDERICQ, J.- Une nouvelle méthode de
mise en evidence histochimique des substances a - -
fonction sulfhydrile.- Arch. Biologie, 54, 589-605,
1943.
- 54.- FELL y ROBISON.- Citado por CHEVREMONT en "Citologie et
Histologie", página 698, Editions Desoer, Liège, --
1967.
- 55.- BOURNE, ZORZOLI y NADEL.- Citado por CHEVREMONT en "Ci-
tologie e Histologie", página 698, Editions Desoer,
Liège, 1967.

- 56.- GRIER y colaboradores.- Citado por CHEVREMONT en "Citologie et Histologie", página 698, Editions Desoer, Liége, 1967.
- 57.- KLEMPERER y colaboradores.- Citado por CHEVREMONT en "Citologie et Histologie", página 698, Editions Desoer, Liége, 1967.
- 58.- DUBOIS y colaboradores.- Citado por CHEVREMONT en "Citologie et Histologie", página 698, Editions Desoer, Liége, 1967.
- 59.- ROCHE y colaboradores.- Citado por CHEVREMONT en "Citologie et Histologie", página 698, Editions Desoer, Liége, 1967.
- 60.- BASSLEER y colaboradores.- Citado por CHEVREMONT en "Citologie et Histologie", página 698, Editions Desoer, Liége, 1967.
- 61.- HARVEY.- Bull. N.Y. Acad. Med., 24, 505, 1948.
- 62.- AMPRINO, R.- Etude autoradiographique par le radiosoufre de la diferenciación du cartilage.- Comptes Rendus de Association des Anatomistes.- Sepbre 1955- Núm.86, pág. 633.
- 63.- SCAHJOWICZ, F.; ROMULO, L., y CABRINI.- Histochemical studies on glycogen in normal ossification and calcification.- J. of Bone and J. Burg., Buenos Aires. 40/A, nº 5, 1958.

- 64.- HAM, A.W., y LEESON, T.S.- Histology, 4 edition, London: Pitman Medical, 1961.
- 65.- CARLOSTELLA, F.- Glycogen concentration in the metaphyseal cartilage during vitamin C. deficiency.- Atti Accad. Med. Lombarda, 15/3, 232-234, 1960.
- 66.- PALEARI, C.L.- Comportamento della concentrazione di glicogeno nella cartilagine metafisaria di ratti ipofisectomizzati.- Biol. Lat. (Milano) 13/4, 515-519, 1960.
- 67.- LISON, L.- Histochemie et Cytochemie animals.- Gauthier & Villars, Paris, 1960.
- 68.- WILLIAN y GAINESVILLE.- Citado por CHEVREMONT en: "Cytologie et Histologie", Editorial Desoer, 1967.
- 69.- LEIDY, J.- On the intimate structure and history of the articular cartilages.- Amer. J. Med. Sci., N.S., - 17, 277-294, 1849.
- 70.- SACERDOTTI, C.- Ueber das Knorpelfett.- Virchows Arch.- path. Anat. Physiol., 159, 152-172, 1900.
- 71.- PUTSCHAR, W.- Ueber Fett im Knorpel unter normalen und pathologischen Verhältnissen.- Beitr. path. Anat., 87, 526-539, 1931.
- 72.- SCHOTT, H.J.- Verkommen und Verteilung gebundener Lipide in der Grundsubstanz des hyalinen Knorpels.-Verh. Anat. Ges. 57, 363-371, 1963.

- 73.- STOCKWELL, R.A.- The lipid and glycogen content of - - rabbit articular hyaline and non-articular hyaline cartilage.- J. Anat. 1967, 102, 1, pp. 87-94.
- 74.- ROTHFIELD, L. y TAKESHITA, M.- The role of cell envelope phospholipid in the enzymatic synthesis of bacterial lipopolysaccharides: binding of transferase-enzymes to a lipopolysaccharide-lipid complex.- Biochem, biophys. Comms 20, 521-527, 1965.
- 75.- LEVI, G.- Tratado de Histología.- Segunda edición, Editorial Labor, 1941.
- 76.- DZIEWIATKOWSKI, D.D.- Isolation of. chondroitin sulfate-³⁵S. from articular cartilage of rats.- J. Biol. Chem. 189, 1951, 187.
- 77.- SIFFERT, R.S.- J. Exp. Med. 93, 1951, 415.
- 78.- PAPILLON, M.F.- Recherches experimentales sur les modifications de la composition immediate des os.- C.R. Acad. Sci. (Paris), 1870, 71, 372.
- 79.- KONIG, J.- Substitution des Kalkes in dem Knochen.- Z.- Biol. 1874, 10.69.
- 80.- GREENBERG, D.M.- Tracer experiments with radioactive calcium and strontium on the mechanism of vitamin D-action in rachitis rats.- J. Biol. Chem. 1945, 157, 99.

- 81.- WEISSBERGER, L.H.; y HARRIS, P.L.- A possible vitamin-D. assay technique with radioactive strontium.- J.- Biol. Chem. Rev. 1953, 53, 1.
- 82.- ELIAS, C. DOW and JOHN B. STANBURY.- Strontium and Calcium metabolism in metabolic bone diseases.- The Journal of Clinical Investigation, Vol, 39, nº 6, - 1960, pág. 885-903.
- 83.- GERSH y CATCHPOLE.- Citado por CHEVREMONT en: "Cytologie et Histologie". Editorial Descor, 1967.
- 84.- BELANGER, F. LEONARD.- Autoradiographic studies of sulfated Mucopolysaccharide metabolism in cartilage of osteoarthritic and chicks.- Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1958 (V.99).
- 85.- PEARSE, A.G.- Histochemistry Theoretical and Applied. - Churchill, Lda. London, 1961.
- 86.- CIACCIO, C.- Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. nº 6, p. 301, 1931.
- 87.- LISON, L.- Protop. 24, 1935, p. 453.- C.R. Soc. Biol.- 118, 1935, p. 821.- Bull. Acad. Roy. Belg. Cl. Sc.- 20, 1935, p 1167.- Bull. Soc. Chim. Biol. 18, 1936, p 225.
- 87.- LISON, L.- Arch. Biol. 46, 1935, p 599.
- 88.- ROBINSON, R.- The possible significance of Hexosphosphoric esters in ossification.- Biochemical, J. 17, 286 293, 1923.

- 89.- GOMORI, G.- Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue.- Sections. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.- 42, 43, 1939.
- 90.- TAKAMATSU.- Citado por Anita Solano.
- 91.- DANIELLI, J.F.- J. Exper. Biol. 22, 110, 1946.
- 92.- BRACHET, J.- Embryologie chimique.- Masson, edit. Paris, 1947.
- 93.- NOVIKOFF, A.- Exp. Cell. Rev. nº 3, p. 617-618, 1952.
- 94.- CORI.- Citado por A.R. Andrés Muñoz.
- 95.- BRACHET, J.- Embryologie chimique.- Masson edit. Paris. 1947.
- 96.- RUNNSTROM.- Citado por M. Casado González.
- 97.- BERG y KARCZMAN.- Citados por Andrés Muñoz.
- 98.- BRADFIELD.- Citado por A.R. Andrés Muñoz.
- 99.- ROBERTSON.- Citado por A.R. Andrés Muñoz.
- 100.- OSAWA.- Citado por A.R. Andrés Muñoz.
- 101.- WILLMER.- Citado por A.R. Andrés Muñoz.
- 102.- WILLMER.- Citado por A.R. Andrés Muñoz.
- 103.- HARVEY.- Bull. N.Y. Acad. Med., 24, 505, 1948.
- 104.- GOMORI, G.- Calcification and phosphatase.- Am. J. - - Pathol. 19, 197-209, 1943.
- 105.- MC MANUS, J.F.A.- The demonstration of certain fatty substance in paraffin sections.- J. Path. & Bact. - 58-93, 1964 A.

- 106.- LUPTON y HARDEN.- Citado por M. González Casado.
- 107.- PEARSE, A., G. EVERSON.- Histochemistry Theoretical and Applied.- Little Brown & Co, Boston, 1953.
- 108.- BEVELANDER, G. and JOHNSON, P.L.- A histochemical study of development of membrane bone.- The anatomical record, vol 108, núm. 1, 1950, p. 1 - 11.
- 109.- JAKSON, S.F, and SMITH, R.H.S.- Fibrogenesis of connective and skeletal tissues in the embryonic fune.- Simp. of the Society for experimental Biology 9. -- 89-95, 1955.
- 110.- SCAHJOWICZ, F; ROMULO, L. y CABRINI.- Histochemical studies on glycogen in normal ossification and calcification.- Buenos Aires, Arg, The J. of. Bone and J. Surg.- October 1958, A. v. Vol. 40/ A, núm. 5.
- 111.- BAUER, H.- Z. mikv. Anato. Forsch.- 33-, 1933, p. 413.
- 112.- LISON, L.- Histochemie et Cytochemie animals.- Gauthier Villars, París, 1960.
- 113.- MARCHESSE, S.- Atti. Soc. Lombarda. Sci. Med. biol., - 2, 1.- Citado por Mc. Manus, 1948. b. 1947.
- 114.- WISLOKI, G.B.; RHEINGOLD, J.J., y DEMPSEY, E.W.- Blood, 4.562, 1949.
- 115.- MC MANUS, J.F.A., and FINDLEY, L.- Surg. Gynec. Obst.- 89, 616, 1949.-

- 116.- STEEDMAN, H.G.- Quart, J. Micros. Soc. nº 91, p. 477, -
1950.
- 117.- RIZZOLI, C.- Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., nº 31, p. --
422, 1955.
- 118.- EHRLICH.- Citado por Anita Solano.
- 119.- SYLVEN, B.- Quart. J. mikr. Sci.- 95, 1954, p. 327.
- 120.- PEARSE, A.G.- Histochemistry theoretical an applied.--
Little Brown, Co. 1953.
- 121.- KRAMER, C. F.- In vivo measurement of radiophosphorus-
and radiostrontium absortions in rats.- Preceedings
of the Society for Experimental Biology and Medicine.-
Vol nº 2, 1959, pág. 364 - 367.
- 122.- RONGTEN y BECQUEREL.- Citado por Abad.- Acta Oncológica.
- 123.- LACCASAGNE y LATTES.- Citado por Abad.- Acta Oncológica.
- 124.- HEVESY.- Citado por Daria Rebollo.- Radiología.
- 125.- CURIE Y DOLOOT.- Citado por Abad.- Acta Oncológica.
- 126.- BOGOMOLOV.- Citado por Abad.- Acta Oncológica.
- 127.- DZIEWIATKOWSKY, D.D.- Etude autoradiographique par le -
radiosoufre de la diferenciation du cartilage.- - -
Comptes Rendus de Asociation des Anatomistes.-Sepbre
1955. Núm. 86, pág. 633.
- 128.- BENESCH y BENESCH.- Citado por Rodolfo Amprino en Etude
autoradiographique par le radiosoufre de la diferen
ciation du cartilage.- Comptes Rendus de Asociation
des Anatomistes.-Sepbre 1955.-Núm. 86, pág. 633.

- 129.- LAYTON, L.L.- Cancer, 3, 1950, 725.
- 130.- DENKO, C.W.- Cancer, 5, 1952, 405.
- 131.- BOSTROM, H.- J. Biol. Chem., 196, 1952, 477.
- 132.- ODEBLAD, E.- Anat. Rec., 115, 1953, 505.
- 133.- SIFFERT, R.S.- J. Exp. Med., 93, 1951, 415.
- 134.- YURIKA K. SHINTANI.- Radioautographic study of $^{35}\text{SO}_4$ --
uptake by epiphyseal cartilage in experimental lathy-
rism.- Canadian J. of Bioch, and Physil.- Vol. 40, -
1962, 565-570.
- 135.- TAYLOR, H.E.- Radioautograpfic study of $^{35}\text{S O}_4$ uptake-
by epiphyseal cartilage in experimental lathyrisim.--
Canadian J. of Bioch, and Physiol.- Vol. 40-1962, --
565-570.
- 136.- ENGFELDT, B.- Acta Pathol. Microbiol. Scand., 49, 39, -
1960.
- 137.- TEGNER, B.- Acta Pathol. Microbiol. Scand., 49-39,1960.
- 138.- BERGQUIST, E.- Acta Pathol. Microbiol. Scand., 49, 39,-
1960.
- 139.- CARLSSON, A.- Acta Pathol. Microbiol. Scand., 37, 407,-
1955.
- 140.- LINDQUIST, B.- Acta Pathol. Microbiol. Scand., 37, 407,
1955.
- 141.- LACROIX, P. et PONLOT, R.- Láutoradiographie dans les -

recherches de physio-pathologie des os.- A/ conf. 15/
P /117.- Belgique. Juin 1968.

- 142.- DUPUIS, Y.; GRAF, B.; y BESCOT-LVERSAC, J.- Fixation de ^{35}S y ^{45}Ca dans le tissus metaphysaires chez le rat hypophisectomie traité ou non par l'hormone somatotrope.- C.R.A.A. n° 138, pág. 442-453, 1967.
- 143.- DENKO, C.W., and BERGENSTAL, D.M.- The effect of hypophysectomy and growth hormone on S^{35} fixation in cartilage.- Endocrinology; 57: 76, 1955.
- 144.- GUDERNATSCH.- Handbuch der Innere Secretion.- 35, 457, --
1912-1913.-
-

Terminada la lectura y contestada por el alumno
las objeciones formuladas por los señores constituyentes
del Tribunal, este es elipico, por unanimidad, al
presente trabajo con la nota de sobresaliente "cum laude"

Valladolid 19 de enero de 1968

El presidente

J. L. de M.

el vocal

J. Bosque

el vocal.

Pedro Amat

el secretario

[Signature]

el vocal

A. Piver Casas



