

**ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DE LAS ALTERACIONES OSEAS EN RATAS  
CARENCIADAS EN VITAMINA D Y RATAS INTOXICADAS CON  
SOLANUM MALACOXYLON. (\*) (\*\*)**

GIMENO, EDUARDO JUAN (\*\*\*)

**RESUMEN**

Se estudian las alteraciones óseas producidas por una dieta carente de vitamina D en ratas, a las cuales luego se administra por vía oral un extracto acuoso de Solanum malacoxylon.

No se encontraron lesiones histopatológicas en los huesos de ratas alimentadas por largos períodos con una dieta carente en vitamina D y con una relación Ca/P de 1,3/1,2. La intoxicación con Solanum malacoxylon origina incremento de la osteolisis osteocítica, degeneración y necrosis osteocítica, osteopetrosis y osteonecrosis.

**SUMMARY**

**HISTOPATHOLOGICAL STUDY OF BONE ALTERATIONS IN RAT  
WITH LACK OF VITAMIN D AND RATS FEED  
WITH SOLANUM MALACOXYLON.**

GIMENO, EDUARDO JUAN

Bone alterations produced through the administration of a vitamin D deficient diet in rat to which it was administrated later a watery extract of Solanum malacoxylon, were studied.

Histopathologic lesions were not found in bones of rats feed by long periods with a vitamin D deficient diet and with a Ca/P relation 1,3/1,2. Repeated oral administration of Solanum malacoxylon produced an increased osteocytic osteolysis, osteocytic degeneration and necrosis, osteopetrosis and osteonecrosis.

---

\* Una parte de este trabajo fue desarrollada en la Segunda Clínica Médica de la Universidad Ludwig-Maximilians en Munich, mediante una beca de la Fundación Alemana para el Desarrollo Internacional. Para los estudios realizados en nuestra Facultad, se contó con el apoyo financiero de CAFPTA (Plan Nro. 321 de 1977).

\*\* Trabajo de Adscripción presentado como requisito de la Carrera Docente Universitaria, bajo la Dirección del Dr. Jorge Ruager, Prof. Tit. de Patología Gral. y Prof. Adj. de Anatomía y Fisiología Patológicas.

\*\*\* Doctor en Ciencias Veterinarias, Jefe de Trabajos Prácticos de las Cátedras de Patología General y de Anatomía y Fisiología Patológicas, F.C.V., U.N.L.P.

## INTRODUCCION

La ingestión repetida de la solanácea conocida en nuestro medio como "duraznillo blanco" (*Solanum glaucophyllum*, Desf. 1829; *Solanum malacoxylon*, Sendtner 1846 o *Solanum glaucum*, Dunal 1852), llamada también "I-byra-né" o "Palo-né" en la Provincia de Corrientes (24) ha sido propuesta (41) (42) y demostrada (36) (200) como agente causal del "Enteque Seco". Dicha calcinosis causa grandes pérdidas económicas en el ganado vacuno, pudiendo afectar también a ovinos (130) (131) (132) (178), equinos y caprinos (178). Resulta muy difícil evaluar el perjuicio económico ocasionado por la afección en la Argentina; Gallo y col. (82) estiman en aproximadamente 1.500.000 los bovinos afectados anualmente en la cuenca del Río Salado, sobre una población total de 7.000.000 de cabezas. Otros autores calculan en 3.000.000 los bovinos afectados cada año en nuestro país, de los cuales 300.000 son enviados al matadero por esa causa (62) (118). Esa cifra es seguramente mayor, ya que esta enfermedad está presente en otras provincias: Entre Ríos (183), Chaco (176), Santa Fe (187), Corrientes (24) y Formosa (32).

La incidencia en la Provincia de Buenos Aires es del 10 % según Carrillo y Worker (36), y del 20 % según Paoli y col. (156). En la Provincia de Santa Fe se estima en un 8,2 % y el perjuicio a nivel nacional superaba los 20 millones de dólares anuales según cálculos realizados en 1977 (187).

La enfermedad ha sido intensamente estudiada desde el siglo pasado en sus distintos aspectos y mucho es lo que se ha avanzado, especialmente en los últimos años, desde que se probara fehacientemente su etiología. Los efectos biológicos del *Solanum malacoxylon* han sido intensamente estudiados dentro y fuera de la Argentina y en consecuencia la patogenia del "Enteque Seco" se puede explicar hoy sobre sólidas bases experimentales. Una larga serie de complejas investigaciones bioquímicas, llevó a Haussler y col. en 1976, a identificar como "1,25-dihidroxicólecalciferol-glicósido" al principio activo del *Solanum malacoxylon* (S.M.) (100). Otras afecciones similares han sido descritas en diversas partes del mundo, conociéndose en algunas de ellas a los vegetales calcinogénicos responsables. Una amplia revisión de todo lo dicho fue realizada en nuestro instituto en 1977 (85).

El empleo del S.M. en terapéutica ha sido considerado por varios autores (67) (100) (102) (194); a esta potencial utilidad en medicina humana y veterinaria, y también en producción animal, se refería recientemente un conocido matutino capitalino (4). Incluso ya se han realizado ensayos terapéuticos en seres humanos para el tratamiento de la osteopatía secundaria a insuficiencia renal (102) (141) o del hipoparatiroidismo (37).

Si bien es mucho lo que se sabe sobre el "Enteque Seco", se necesitan aún nuevos aportes referidos a su fisiopatología y que se reflejen en el futuro en medidas

efectivas de control. Los tratamientos ensayados no han demostrado ser efectivos y la única profilaxis posible por el momento consiste en erradicar el vegetal, lo cual es ciertamente muy difícil debido a las características del S.M. (152) (153).

Existen grandes discrepancias sobre los efectos del S.M. a nivel óseo; los resultados de distintos autores difieren en muchos aspectos y dan lugar a la polémica. En el presente trabajo se estudian hallazgos histopatológicos en huesos de ratas alimentadas con una dieta carente en vitamina D y en animales intoxicados con un extracto acuoso de S.M. Como introducción al tema hemos considerado oportuno realizar una actualización sobre las hormonas directamente involucradas con el metabolismo fosfo-cálcico, brindar algunos conceptos tradicionales y otros novedosos referidos al metabolismo óseo y a su repercusión histológica, y revisar los hallazgos de otros autores respecto a las alteraciones óseas presentes en el "Enteque Seco" y en otras calcinosis similares.

### *I. Regulación endocrina de la homeostasia cálcica.*

#### *a) Introducción.*

La cantidad de iones  $Ca^{++}$  en sangre es minuciosamente regulada por el organismo, ya que incluso pequeñas variaciones de concentración pueden ejercer profundos efectos nocivos.

La calcemia normal en los mamíferos oscila de 9,0 a 10,5 mg/100 ml, encontrándose un 40 % del Ca ligado a sustancias proteicas, 5 % unido a ácidos orgánicos y un 55 % en forma iónica (91).

Niveles plasmáticos de calcio inferiores a 4-5 mg/100 ml ocasionan convulsiones tetaniformes y muerte, mientras que la hipercalcemia puede ocasionar disturbios circulatorios y calcificaciones patológicas, incluyendo nefrocalcinosis que llega a ser fatal (50).

Además de ser un componente del esqueleto, el calcio es esencial en múltiples procesos vitales que incluyen: contracción muscular, excitabilidad neuromuscular, permeabilidad de membrana, actividad de múltiples sistemas enzimáticos (49), coagulación sanguínea y secreción de diversas hormonas (128) (145), entre otros.

#### *b) Factores involucrados en la regulación del calcio.*

La absorción intestinal depende del contenido de calcio de los alimentos y de un normal aporte y activación biológica de la vitamina D; puede ser modificada igualmente por los fosfatos presentes en la dieta. La relación calcio: fósforo óptima se considera de 1,2 a 1,5: 1 (119).

La excreción de calcio se realiza por las glándulas del intestino, orina, sudor y secreción mamaria.

El fino mecanismo de regulación del calcio sérico depende de la movilización y deposición a nivel óseo, absorción intestinal y excreción renal; procesos controlados por la interacción de la hormona paratiroidea (PTH), calcitonina (CT) y vitamina D.

#### *c) Hormona paratiroidea.*

Desde 1909 se sabe que la ablación de las paratiroides provoca hipocalcemia y tetania (136); algunos años después se demostró que extractos de tejido paratiroideo ocasionan aumento del calcio circulante en perros normales o paratiroidectomizados (44) (95). Un cuarto de siglo más tarde Aur-

bach (7) y Rasmussen & Craig (170) consiguen casi simultáneamente purificar la PTH; a partir de entonces los conocimientos sobre dicha hormona aumentaron con vertiginosa rapidez.

La PTH es un polipéptido con 84 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 9600 (163); en 1969 comenzaron a obtenerse pruebas de la existencia de una prohormona (pro-PTH) en las células principales de la paratiroides (93), constituida por 105 aminoácidos y con un peso molecular de 12000 (39); y más recientemente se demostró un precursor de esta última, al que se denominó preproparatohormona (prepro-PTH) (113).

Las células activas de la paratiroides cuentan con abundante retículo endoplásmico rugoso y gránulos secretorios; resulta evidente que luego de sintetizada, la PTH es almacenada en dichos gránulos y liberada según los requerimientos orgánicos.

El hallazgo de la pro-PTH y la prepro-PTH indican que esa síntesis y acumulación de la PTH comprende una compleja serie de eventos intracelulares, los que se iniciarían con la síntesis de prepro-PTH en los ribosomas. Al llegar a 25 aminoácidos, se produce la separación de esa secuencia que serviría de "señal" y continúa la síntesis hasta completar la molécula de pro-PTH; la cual una vez separada de los ribosomas, es movilizada hacia el aparato de Golgi. Allí un complejo enzimático proteolítico corta ambos extremos de la cadena para originar la PTH nativa. Todo este proceso requiere alrededor de 15 minutos; luego comienza el "empaquetamiento" de la PTH en los gránulos secretorios (39).

Es bien conocido que niveles bajos de calcio circulante indu-

cen la secreción de PTH al torrente circulatorio; recientes estudios parecen indicar que la calcemia regula igualmente su formación en un proceso independiente del anterior. Chu y colaboradores encuentran que en ratas normales solamente un 20 % de la pro-PTH formada se transforma en PTH; en animales mantenidos con una dieta libre de calcio, el porcentaje sube a 40. Interpretan que pro-PTH, PTH o ambas son degradadas dentro de la célula en cantidades que dependen de la concentración de calcio (57). Coincidentemente, otros autores habían encontrado una peptidasa en extractos paratiroides, cuya actividad resulta modificada por el tenor de calcio (76).

Los estudios de Patt y Luckhardt (157) establecieron que la hipocalcemia es el principal estímulo para la liberación de PTH. Los detalles finos del proceso, y la forma en que la glándula detecta la concentración de  $Ca^{++}$ , no se conocen. Otros factores, entre ellos el ion magnesio afectan esa liberación; altas concentraciones de  $Mg^{++}$  inhiben la secreción y bajas concentraciones ejercen un efecto opuesto tanto in vivo como in vitro (23). En los estudios in vivo no obstante, existen discrepancias; algunos autores detectaron niveles normales o incluso bajos de PTH en sujetos con hipomagnesemia (3) (53).

Datos recientes sugieren que el  $Ca^{++}$  interacciona con adenilciclase localizada a nivel de la membrana plasmática, afectando la producción intracelular de adenosin 3':5'-monofosfato (AMP cíclico); este mediador hormona ocasionaría una mayor producción y secreción de PTH (1).

También se ha comprobado que la epinefrina estimula la secreción de PTH (77). Es posible

en consecuencia que las células paratiroides contengan receptores adrenérgicos como control adicional de la secreción hormonal (30).

La secreción de PTH resulta inhibida por el 1,25 dihidroxicolecalciferol (55); y considerando que PTH estimula la formación de 1,25 dihidroxicolecalciferol a nivel renal, se ha postulado un feedback negativo entre ambas sustancias (22) (64).

Recientes investigaciones indican que la somatostatina inhibe la secreción de PTH y CT, tanto in vivo como in vitro (96). Recordemos que la somatostatina inhibe la secreción de PTH y CT, tanto in vivo como in vitro (96). Recordemos que la somatostatina fue descubierta en el hipotálamo y caracterizada por su efecto inhibitorio sobre la secreción de hormona de crecimiento a nivel hipofisario. Posteriormente se demostraron efectos inhibitorios en la secreción de varias hormonas pituitarias y no pituitarias, que incluyen glucagon, insulina y gastrina (89). Su posible significación fisiológica en el metabolismo cálcico, no ha sido aún explicada.

La acción hipercalcemiente de la PTH debe ser considerada como el factor más relevante en el control de la homeostasis cálcica. La mencionada hormona ejerce sus efectos biológicos bien conocidos a nivel óseo, renal e intestinal.

Es un hecho perfectamente demostrado que la PTH ocasiona movilización del calcio esquelético (50) (91) (119). En la última década se han realizado aportes muy significativos sobre la fisiología ósea, y consecuentemente, en lo que se refiere a mecanismos de acción de la PTH. A nivel de la membrana plasmática, la hormona paratiroidea produce la entrada de  $Ca^{++}$  al citoplasma y la

activación de la adenil ciclasa (169); la consiguiente transformación de ATP en AMP cíclico promueve la liberación y síntesis de las enzimas lisosomales involucradas en la resorción de calcio (50).

Hasta no hace mucho se creía que la movilización de calcio óseo era función exclusiva de los osteoclastos; hoy se sabe también que los osteocitos son responsables de la resorción ósea. Esa osteolisis periosteocitaria resulta igualmente estimulada por la PTH (18). No sólo la actividad de las células óseas es regulada por esta hormona, sino también su número. Según Rasmussen (169), la PTH ocasiona: 1) aumento de la actividad osteoclástica individual; 2) incremento del número de osteoclastos; 3) disminución de la actividad osteoblástica y 4) reducción de la cantidad de osteoblastos.

El bien conocido efecto fosfórico de la PTH (2) (45) es ejercido a nivel de los túbulos distales del riñón (149); en este mismo órgano blanco, la PTH actúa favoreciendo la retención de  $Ca^{++}$  por aumento de su resorción en los túbulos (115). Aquí también hay activación de adenil ciclasa y en consecuencia participación del AMP cíclico como "segundo mensajero" (169).

La absorción intestinal de calcio resulta favorecida por la PTH (52) (91) (167), aunque esta función no parece ser de especial importancia.

El calcio es un estímulo bien conocido de la secreción de gastrina y ácido gástrico. La PTH por sí misma aumenta la secreción de gastrina, aún sin alteraciones en la calcemia (17).

#### d) Calcitonina.

Hasta 1960 se consideraba que la regulación de la calcemia

dependía únicamente de la PTH; la hipocalcemia actuaba estimulando su liberación, condicionando así una mayor afluencia de calcio hacia la sangre desde hueso, intestino y túbulos renales. La hipercalcemia, al inhibir la secreción de hormona paratiroidea permitía una mayor excreción de calcio, y de esa forma los valores volvían a caer dentro del rango fisiológico. Este concepto cambió a consecuencia de las investigaciones de Copp, Davidson y Cheney, quienes observaron que la perfusión tiroparatiroidea con plasma hipercémico en el perro producía una caída mucho más rápida y manifiesta de la calcemia que la extirpación de las paratiroides (51). Esto les llevó a postular la existencia de una hormona hipocalcemiante a la que llamaron calcitonina (CT) y cuya secreción se producía en respuesta a la hipercalcemia. Consideraron que la CT era elaborada en las glándulas paratiroides.

Hirsch, Gauthier y Munson comprobaron que en realidad la glándula tiroidea era el origen de esa hormona hipocalcemiante, denominándola tirocalcitonina (TCT) (103). Estos trabajos precursores marcaron la senda a centenares de investigadores en el mundo entero que realizaron rápidos y asombrosos aportes referidos a la CT.

Por inmunofluorescencia se logró determinar que las células parafoliculares de la tiroidea (también llamadas células C), constituyen el origen de la CT en los mamíferos (25). Dichas células proceden del cuerpo ultimobranquial (114) (160) que durante el desarrollo se fusiona con la tiroidea, localizándose en la periferia de los folículos tiroideos dentro de la membrana basal y en pequeños grupos situados entre los folícu-

los (12). En aves, peces y reptiles la glándula ultimobranquial permanece separada de la tiroidea, siendo la encargada de la producción de CT.

La molécula de CT tiene un peso molecular de 3600 (202), y está constituida por 32 aminoácidos, variando la secuencia en las distintas especies (137).

Las células parafoliculares presentan abundantes gránulos de secreción que almacenan la CT elaborada hasta que se estimula su liberación (12).

La hipercalcemia se considera el principal estímulo para la secreción de CT (51), y actúa mediante la activación del sistema adenil ciclasa (14) (29). El consiguiente aumento intracelular de AMP cíclico es requerido no sólo para la síntesis proteica (87) sino también para activar el sistema contractil de microtúbulos que movilizan los gránulos secretorios hacia la superficie celular (168).

Experiencias realizadas mediante perfusión de la glándula ultimobranquial de la gallina, demostraron que la CT es estimulada por el agregado de bajas concentraciones de AMP cíclico durante hipercalcemia, y por altas concentraciones con normocalcemia; la presencia de teofilina (inhibidor de la fosfodiesterasa), aumenta ese efecto (204).

Puede parecer contradictorio el hecho de que mientras la hipercalcemia activa la adenil ciclasa de las células C, reduce la liberación de PTH; sin embargo, y según las investigaciones de Dufresne y Gitelman (72), la adenil ciclasa paratiroidea es la única que resulta inhibida por el ion calcio y se activa cuando baja la calcemia. Existiría en consecuencia una sensibilidad diferencial del sistema adenil ciclasa de las célu-

Las productoras de PTH y CT frente al  $\text{Ca}^{++}$  (31).

Además de la hipercalcemia, otros factores promueven la liberación de CT, no conociéndose con exactitud la importancia fisiológica de la mayoría de ellos en relación con el metabolismo del calcio. Se ha comprobado por ejemplo, que la administración oral de calcio en cerdos, provoca un marcado aumento de la CT circulante sin un incremento detectable del calcio sérico (46); sugiriéndose que algunas hormonas gastrointestinales actuarían sinérgicamente con el calcio estimulando a las células C. En ese sentido se ha comprobado que gastrina (46), pancreozimina-colecistoquinina y glucagon (14) (31) estimulan la liberación de CT; existiría en consecuencia un eje tracto gastrointestinal-células C (202).

La tiroides de cerdo responde a la hipermagnesemia aumentando la liberación de CT (15); la glándula ultimobranquial de las aves, por el contrario, no responde a ese estímulo (203). Un efecto secretogogo del  $\text{Mg}^{++}$ , no está claramente demostrado en consecuencia.

La estimulación del nervio vago incrementa la secreción de CT en la glándula ultimobranquial; en este sentido se ha visto que los compuestos  $\beta$ -adrenérgicos (fentolamina e isoproterenol) activan la adenil ciclasa de las células C avia-rias; mientras que noradrenalina y propanol poseen efecto inhibitorio (29) (202) (204). Esto ha llevado a postular que la secreción de CT en las aves depende más de estimulación nerviosa que humoral (31).

Al igual que otras células endocrinas que sintetizan hormonas polipeptídicas, las células parafo-liculares tienen la capacidad de e-

laborar y almacenar ciertas monoaminas, como dopamina y 5-hidroxitriptamina (159), no conociéndose por el momento que papel juegan esas sustancias en el fenómeno secretorio.

La CT produce una rápida caída de la calcemia y fosfatemia (104); la respuesta hipocalcemiante es marcada en animales en crecimiento y muy reducida en adultos (28). No obstante haberse demostrado gran cantidad de efectos biológicos de dicha hormona, su significación fisiológica no ha sido aún claramente explicada. Existen evidencias que indicarían su importancia en el control de la hipercalcemia postprandial en mamíferos (88) (143). Los elevados niveles de CT en animales recién nacidos (81) y en crecimiento, permiten suponer una participación favorecedora de la absorción del calcio en la etapa del desarrollo; la lactación provoca un marcado aumento de la hormona, bajando sensiblemente su concentración en los lactantes tras 8 a 12 horas de ayuno (47).

Diversos autores han demostrado un claro efecto inhibitorio de la resorción ósea administrando CT (78) (116) (138). Esa acción opuesta a la PTH, es ejercida por la CT inhibiendo la actividad osteoclástica, aumentando la formación de osteoblastos (169), y anulando el efecto positivo en la osteolisis osteocítica de la PTH (18).

Según Wells y Lloyd (-199), la PTH activaría el sistema adenil ciclasa de las células óseas; el aumento intracelular de AMP cíclico ocasionaría la liberación de enzimas lisosomales encargadas de la movilización del calcio. La CT actuaría estimulando a la fosfodiesterasa, y esta a su vez aceleraría la inactivación del AMPc,

disminuyendo así la liberación enzimática y la resorción ósea.

A nivel renal, la CT presenta efectos diuréticos (155) (181), y aumenta la excreción de electrolitos: sodio, cloro, magnesio, calcio (181) y fósforo (174) (181).

Así como diversas hormonas gastrointestinales, según ya vimos, pueden estimular la secreción de CT, esta última afecta al tracto gastrointestinal. Por ejemplo, produce una inhibición de la secreción de gastrina y ácido gástrico (74) (105) y de la motilidad de la vesícula biliar (108), no afecta al parecer la absorción intestinal de calcio (50). La secreción pancreática exócrina resulta disminuida por la administración de CT (106); la función endocrina es igualmente afectada; el estímulo de la glucosa sobre la liberación de insulina es contrarrestado por la CT (205).

#### e) Vitamina D.

Desde hace más de medio siglo se demostró que la vitamina D es necesaria para la cura y prevención del raquitismo (110) (142). Ergocalciferol (Vitamina D<sub>2</sub>), colecalciferol (Vitamina D<sub>3</sub>) y sus metabolitos, son los compuestos fisiológicamente importantes del grupo. La vitamina D<sub>2</sub> se origina a partir de la ergosterina (provitamina) presente en hongos y levaduras por irradiación ultravioleta. El aceite de hígado de pescado y diversos tejidos adiposos, son ricos en vitamina D<sub>3</sub>; también se forma en organismos animales por radiación solar a partir del 7-dehidrocolesterol a nivel cutáneo. Las propiedades antirraquíticas de las vitaminas D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> son equivalentes en mamíferos; en las aves el colecalciferol es 10 á 15 veces más efectivo (150).

La importancia de la vitamina D en la absorción intestinal del

calcio fue demostrada por Nicolaysen y Eeg-Larsen (148). A fines de la pasada década, numerosos investigadores dedicaron su atención a esta vitamina liposoluble y comenzó a tomar cuerpo el concepto de que el colecalciferol debe ser considerado una prohormona. Este esteroide es transformado en el organismo en diversos metabolitos, el más potente de los cuales (1,25 dihidroxicolecalciferol) formado exclusivamente a nivel renal, actúa en los órganos blanco mediante el mecanismo de acción característico de las hormonas esteroideas (150).

Está perfectamente demostrado que la vitamina D debe ser metabólicamente activada para ejercer sus efectos biológicos (66). El primer paso ocurre en la fracción microsomal del hígado, en donde la vitamina D<sub>3</sub> es transformada en 25 hidroxicolecalciferol (25-OH-D<sub>3</sub>). Esta reacción es catalizada por la enzima D<sub>3</sub>-25-hidroxilasa, presente en todas las especies estudiadas (16). La misma enzima se ha detectado en intestino y riñón de pollo pero no en mamíferos (189) (66); esa 25-hidroxilación extra-hepática es no obstante muy pequeña, y posiblemente ausente en condiciones fisiológicas (66). Por otra parte, el colecalciferol es rápidamente captado por el hígado y no circula en altas concentraciones (162) en ese órgano es transformado en productos inactivos de excreción o en 25-OH-D<sub>3</sub> (193).

La 25-hidroxilación resulta marcadamente disminuida por administración previa de vitamina D<sub>3</sub> (16), y obedece al parecer, al nivel hepático de 25-OH-D<sub>3</sub> (66). Este mecanismo de regulación se observa solamente con dosis fisiológicas de vitamina D<sub>3</sub>; grandes dosis de vitamina pueden incrementar los niveles de 25-OH-

D<sub>3</sub> (63). Otros hallazgos, por el contrario, restan importancia al mencionado feedback, aduciendo que ni el calcio ni el fósforo influyen la actividad de la 25-hidroxilasa (189). En ese sentido, ratas intoxicadas con vitamina D mostraron una concentración plasmática de 25-OH-D<sub>3</sub> muy por encima de los valores fisiológicos, con niveles normales de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (109). La formación de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> según las necesidades del organismo, sería regulada en consecuencia, a nivel renal. El hecho de que la concentración de 25-OH-D<sub>3</sub> esté en relación directa al aporte de vitamina D o a la exposición solar (109) aporta igualmente pruebas en este sentido.

La transformación crucial, catalizada por la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hidroxilasa; ocurre en el riñón, produciéndose 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> a partir de 25-OH-D<sub>3</sub> (98). La 1 $\alpha$ -hidroxilasa se encuentra exclusivamente en las mitocondrias del tejido renal (79).

Otra enzima capaz de metabolizar 25-OH-D<sub>3</sub>, es la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>-24-hidroxilasa presente también en las mitocondrias de las células renales (66). Por esa vía se produce 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de muy baja actividad biológica y de significación no conocida (98).

Uno de los aspectos más estudiados en relación a la vitamina D, es la síntesis de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y los factores que la regulan.

Un nivel bajo de calcio en la dieta favorece la conversión de 25-OH-D<sub>3</sub> en 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (65), mientras que disminuye si la alimentación es rica en calcio. Cuando se suprime la síntesis de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, se estimula la formación de 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (66).

La hipocalcemia estimularía la síntesis de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en for-

ma indirecta aumentando la liberación de PTH; esta última hormona ejerce un efecto positivo sobre la 1 $\alpha$ -hidroxilasa (101).

La hipofosfatemia estimula igualmente a la 1 $\alpha$ -hidroxilasa, independientemente de la presencia de PTH (98).

Otras sustancias que afectan la síntesis de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> son calcitonina, prolactina, hormona de crecimiento, cortisol y estrógenos (98).

Un derivado trihidroxilado ha sido aislado e identificado como 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>; se trata al parecer de un producto de inactivación de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (38).

Los efectos biológicos del 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> se han estudiado intensamente en intestino y hueso, y menos en riñón, paratiroides y otros órganos.

Gran cantidad de evidencias indican que el 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> actúa de la misma manera que las hormonas esteroideas (98), y que básicamente consiste en: combinación del esteroide con receptores citoplásmicos de alta afinidad, migración del complejo hormona-receptor hacia el núcleo, donde hay asociación con el genoma, activación de genes específicos, y biosíntesis de RNA mensajero que codifica proteínas capaces de cambiar la actividad celular.

En células entéricas se han identificado receptores citosólicos para 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, con posterior migración del complejo hacia la fracción cromática (21). La biosíntesis de RNA a nivel nuclear resulta incrementada por efecto de este esteroide (201).

Sabiendo que por efecto de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> se incrementa la producción de RNA en las células intestinales, es de esperar que en consecuencia se elaboren sustancias proteicas que posibiliten los

efectos biológicos de la vitamina D en intestino; es decir, la absorción de calcio y fósforo. Dos han sido las proteínas específicas identificadas; la primera de ellas, una fosfatasa alcalina o calcio-ATPasa (99) Como la aparición de esta enzima es más lenta que el incremento de la absorción del calcio (151), se considera que no participa en el transporte del mismo, lo que no descarta su participación en otros procesos, como puede ser la absorción de fósforo (98).

Sobre la otra sustancia, conocida como proteína de Wasserman o proteína de conjugación del calcio (calcium binding protein, CaBP) existen más datos. Ha sido encontrada en intestino de diversas especies, y su peso molecular es de 24000 en las aves y oscila de 8000 á 12000 en mamíferos; prácticamente ausente en pollos raquíuticos, reaparece en altas concentraciones por efecto del  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . De la misma forma varía la capacidad de captación del calcio por parte del intestino (195).

Estudios con inmunofluorescencia sugieren que la CaBP se produce en las células caliciformes, disponiéndose luego en la superficie de absorción de las células intestinales (195).

A nivel del tejido óseo, el  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aumenta la resorción de calcio; requiriendo in vivo la presencia de PTH, y actuando in vitro con independencia de esta última hormona. Esa diferencia no ha podido ser explicada (66).

Se postula que el  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  actúa en hueso por un meca-

nismo similar que en intestino, ya que para ejercer sus efectos necesita la síntesis de RNA y hay evidencias de la presencia de receptores específicos en las células óseas (98). No obstante, no ha podido revelarse la existencia de CaBP en hueso (195).

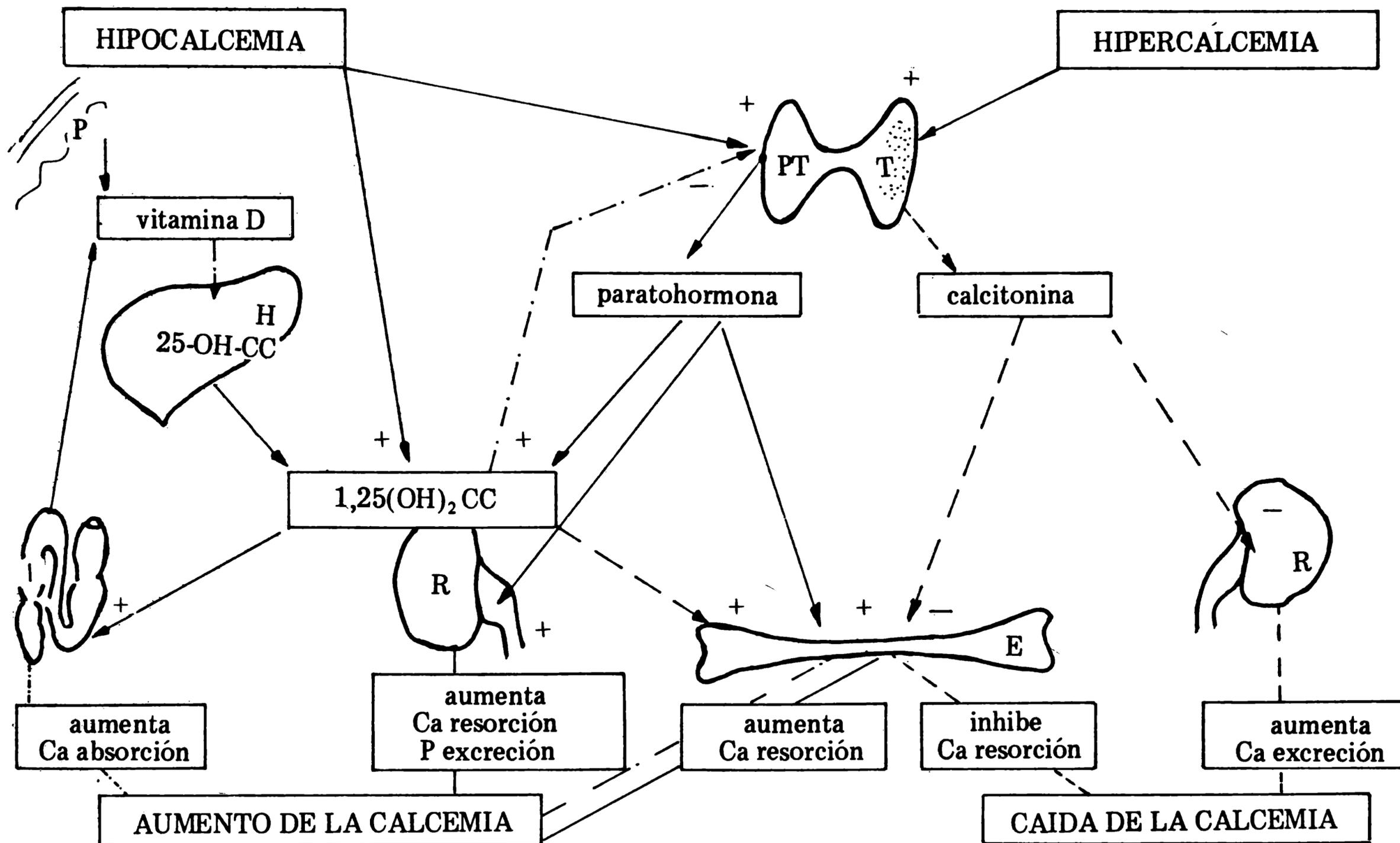
El riñón se considera igualmente un órgano blanco de la vitamina D. Por efecto del  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hay una estimulación en la síntesis de RNA (54) y posterior producción de CaBP (195). Con todo, la resorción renal de calcio es muy alta aún en ausencia de vitamina D; no parece ser en consecuencia una función cuantitativamente importante (66).

La CaBP está presente igualmente en el útero de la gallina ponedora, un órgano en el que hay transporte de grandes cantidades de calcio (195).

Anteriormente hemos considerado la relación entre el  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y la PTH.

Otros posibles órganos blanco de la vitamina D son músculo esquelético (117) (182) y cerebro (188).

Resumiendo, la calcemia es finamente regulada en el organismo por diversos factores, especialmente por efectos hormonales de paratohormona, calcitonina y vitamina D. Los conocimientos sobre esos efectos están cambiando a ritmo acelerado, como se desprende de la somera revisión presentada. El esquema adjunto pretende graficar los principales factores involucrados en la homeostasis cálcica.



Esquema de la regulación endocrina de la calcemia

+ , - , efectos hormonales que aumentan o disminuyen respectivamente el calcio circulante, + , - , efectos positivos o negativos sobre la síntesis y secreción de una determinada hormona. → Acción en órganos blanco. P: piel, H: hígado, I: intestino, R: riñón, PT: paratiroides, T: tiroides (células C), E: esqueleto (86).

## *II. Aspectos histológicos del metabolismo óseo.*

Tal como lo manifestamos en la introducción, no pretendemos realizar aquí una consideración profunda y exhaustiva de un tema tan complicado y sobre el que existe abundante información. Intentamos solamente poner a disposición del lector algunos conceptos que estimamos necesarios para una mejor comprensión de este trabajo.

En primer lugar, debe tenerse presente que "el hueso es un tejido; los huesos son órganos" (84) (122), según expresión textual de Weinmann y Sicher (197) que recogen varios autores. Los huesos son estructuras dinámicas que crecen y se remodelan constantemente a lo largo de la vida, el estudio de las afecciones esqueléticas es en consecuencia, un estudio de tejidos y órganos dinámicos. La función principal de los huesos es de tipo mecánico, proporcionando estabilidad, protección y movimiento, "fuerza máxima con volumen y peso mínimos" (84) en virtud a su compleja y admirable conformación. Fundamental es también el rol del tejido óseo como depósito mineral, almacenando elementos tan importantes como calcio y fósforo, además de magnesio, sodio, potasio y otros (91).

### *a) Unidades metabólicas del tejido óseo.*

El tejido óseo maduro está compuesto por unidades metabólicas (80). Cuando se trata de hueso compacto, esas unidades se conocen como sistemas de Havers. En el hueso esponjoso hay una correspondencia, y las laminillas óseas están superpuestas y no ordenadas concéntricamente a un vaso sanguíneo.

Una unidad metabólica comprende un número variable de osteocitos relacionados entre sí por abundantes prolongaciones citoplasmáticas alojadas en finos canalículos del tejido óseo. Gracias a esas prolongaciones existe una gran superficie de intercambio entre el tejido y el compartimiento intracelular (18). Los osteocitos de cada unidad, unidos en sincitio son los principales responsables del intercambio iónico (91), en la forma que veremos más adelante.

Entre membrana plasmática osteocitaria y sustancia osteoide, queda un espacio de volumen variable por el que circula el líquido óseo extracelular (18).

Cada unidad metabólica es autónoma en sus funciones; los osteocitos de una unidad no tienen relación directa con aquellos de las unidades vecinas. El límite está representado por una capa monocelular de células del tipo endotelial compuesto al parecer por células mesenquimáticas (osteoprogenitoras) que cierra el compartimiento óseo extracelular. No obstante presenta poros por los que se produce una corriente iónica y que permite la llegada de las hormonas y vitaminas que serán transportadas por el líquido extracelular hasta las células óseas (18).

### *b) Formación y resorción del tejido óseo.*

La constante remodelación que acontece en todos los huesos del organismo implica la existencia de mecanismos de formación y destrucción del tejido óseo. Los osteoblastos son los encargados de formar la matriz orgánica destinada a calcificarse. La resorción del hueso se hace por dos mecanismos: osteoclasia y osteolisis (20). Tradicionalmente, y según los hallazgos de Kölliker en 1873

(120), se consideraba que la resorción ósea obedecía a la acción de los osteoclastos (92) actuando en superficies del tejido óseo; es decir, sobre las trabéculas, debajo del periosteo o en los canales de Havers y Volkmann (20). La osteolisis por el contrario, ocurre en profundidad del tejido óseo y depende de la actividad de los osteocitos maduros. Esa posibilidad había sido ya considerada en 1910 por von Recklinghausen (173) y hoy está perfectamente demostrada (20) (18) (122) (169).

El mecanismo de osteolisis osteocítica es el más importante en la resorción ósea, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas; la osteoclasia afecta al hueso previamente alterado (122).

El concepto de que el tejido óseo fluye constantemente desde las superficies de aposición hasta las zonas de osteolisis había sido planteado por Havers en 1691 y vigorosamente negado durante casi 300 años (122). Recientes avances en los conocimientos del metabolismo óseo han reimplantado ese concepto (13) (123).

El hueso esponjoso es formado en superficie y progresa hasta la profundidad de la trabécula donde se resorbe por osteolisis. El hueso compacto se origina en el interior de los sistemas de Havers y se moviliza hacia la periferia donde ocurre la osteolisis (122).

Los principales factores hormonales que regulan estos procesos fueron considerados anteriormente (*B.I. : Regulación endocrina de la homeostasis cálcica*).

### *III. Alteraciones óseas en diversas calcinosis.*

#### *a) Hipervitaminosis D.*

**Caninos:** Los cambios esqueléticos producidos por hipervitaminosis D

en caninos y en otras especies suelen ser contradictorios. En algunos casos se observa una clara rarefacción de las estructuras óseas debido a excesiva resorción (179) y sin trastornos en la mineralización, correspondiendo a un cuadro de osteoporosis (58). En una segunda forma de presentación se observa un aumento en la formación de tejido óseo que conduce a una osteoesclerosis (58). En la interpretación de estas formas de presentación Dämmrich considera fundamentalmente el factor tiempo, mientras que Jubb y Kennedy hablan de una relación tiempo/dosis (111). Se considera que la alta o continuada administración de vitamina D conduce rápidamente a una rarefacción ósea; mientras que dosis intermitentes distribuidas en un período largo, originan osteoesclerosis (179).

**Bovinos:** Frecuentemente se producen intoxicaciones iatrogénicas por sobredosis de vitamina D<sub>3</sub> administrada como profilaxis de la hipocalcemia del parto (27) (40) (158) (186). La susceptibilidad a la hipervitaminosis D varía con múltiples factores; así por ejemplo, los animales jóvenes son más sensibles que los adultos, la administración oral produce intoxicación más rápidamente que la aplicación parenteral, vacas preñadas muestran lesiones más severas que vacas secas por efecto de una sobredosis (27), etc. La tolerancia a la vitamina D varía igualmente con el contenido en minerales de la alimentación (94).

Administrando 30 millones de unidades U.S.P. diarias durante 21 días, Capen y colaboradores (27), encuentran huesos muy duros al corte, bien mineralizados y con las trabéculas de la esponjosa algo engrosadas. No observaron aumento de la resorción ósea. Las

observaciones macroscópicas de Lindt (1968) pueden reducirse a dureza aumentada de los huesos ("duros como vidrio") y a evidente engrosamiento de la compacta (133).

Rowland (175) comprueba un aumento de la movilización mineral ósea e hipercalcemia, administrando altas dosis de vitamina D a vacas que recibían cantidades "normales" de calcio y fósforo con la alimentación. Por técnicas microradiográficas demuestra una notable porosidad del hueso compacto.

*Cerdos:* Trabajando experimentalmente en lechones Dämmrich (58) observó los grados del proceso: en principio aumenta la resorción por actividad osteoclástica, en un segundo período se incrementa la formación de tejido óseo. A este período puede sucederle una nueva fase de resorción. Ambos estadios pueden, en consecuencia presentarse alternadamente (59).

Según otros autores (56) (97) la vitamina D<sub>3</sub> ejerce un efecto tóxico directo sobre osteocitos, condrocitos y osteoblastos. Con dosis moderadamente altas, observan disminución de la osteolisis osteocítica y osteopetrosis; si aumenta la dosis hay cambios regresivos y muerte de osteocitos y osteonecrosis con posterior osteoclasia y osteopenia. Los efectos inhibitorios de la vitamina D<sub>3</sub> son igualmente marcados en los osteoblastos y células cartilaginosas. Los osteoblastos se atrofian y cesa la aposición ósea; paralelamente, cesa la proliferación celular cartilaginosa (56).

*Cobayos:* La intoxicación crónica -15000 U.I. semanales de vitamina D<sub>3</sub> durante 16 semanas ocasiona calcificaciones en el cartílago articular, adelgazamiento

del cartílago epifisario con células desordenadas, porosidad en la compacta de los huesos largos por aumento de resorción, así como engrosamiento de las trabéculas de la esponjosa epifisaria (154).

*Ratas:* Al igual que en otras especies, las observaciones de distintos autores no son uniformes. Dosis bajas de vitamina D aumentan la resorción y altas dosis aplicadas durante un lapso prolongado, ocasionan esclerosis del tejido óseo (90). Otros autores, por el contrario, encuentran aumento de sustancia osteoide tras cortos períodos de intoxicación. Mediante administración repetida observan aumento de la resorción y adelgazamiento de la compacta en los huesos largos (112).

#### *b) Calcinosis espontáneas en ruminantes.*

Los estudios de Arnold y Brass (5) en Jamaica no evidenciaron trastornos macro o microscópicos en huesos de bovinos afectados por la "Manchester Wasting Disease".

Lynd y col. observaron erosiones irregulares en los cartílagos articulares en casos de "Naalehu Disease" (Hawaii); los huesos parecían más duros que lo normal y sin alteraciones histológicas evidenciables (135).

En bovinos afectados de Enquete Seco "los huesos no presentaban lesiones aparentes, pero al intentar cortar con la sierra para observar la médula ósea roja y amarilla, notamos una extraordinaria dureza sobre todo de los huesos largos, metacarpo y húmero"; según observaciones de Eckell y col. en 1960 (73).

En la misma afección, que en Brasil recibe la denominación de Espichamento o Espichaço; Dö-

bereiner y Dämmrich (61) (70) observan también osteoesclerosis, con neoformación de tejido óseo fuertemente mineralizado.

Un proceso muy similar, ocurre en la intoxicación por *Cestrum diurnum* en Florida (Krook y col.) (124).

Muy parecido también es el cuadro que presentan los vacunos afectados de Calcinosis Enzoótica en Alemania y Austria. Los huesos no evidencian alteraciones macroscópicas, pero aparecen endurecidos y engrosados al corte (68) (118) (184). Los estudios histológicos revelaron marcada osteoesclerosis con neoformación de tejido óseo y estrechamiento del espacio medular. Por microradiografías se comprobó que el hueso laminar interno neoformado se mineralizaba en mayor grado que el externo, por lo cual hablan de una osteomieloesclerosis generalizada (hiperostosis endosteal) (60) (69). Las lesiones de los cartílagos articulares estaban igualmente presentes (60) (69) (118), considerándose las como secundarias a los trastornos locomotores (69).

No se han estudiado los cambios óseos en la calcinosis de los bovinos de Nueva Guinea (48), ni en las calcinosis en ovinos de la India (83), Sud Africa (190), sur de Brasil (8) e Israel (146) (147).

*c) Estudios experimentales sobre los efectos óseos del Solanum malacoxylon.*

La comprobación fehaciente de que el Enteque Seco es ocasionado por la ingestión del *Solanum malacoxylon* (36), brindó la posibilidad de estudiar experimentalmente los diversos aspectos de esa entidad nosológica. Los efectos biológicos del S.M. sobre

el metabolismo fosfo-cálcico han sido y siguen siendo motivo de estudio en docenas de laboratorios del mundo entero. Como ya se dijo en la introducción, existen grandes discrepancias sobre los efectos del S.M. a nivel óseo; y los resultados contrapuestos de distintos autores dan lugar a la polémica.

Los estudios experimentales desarrollados por Carrillo en ratas, cobayos y ovinos demuestran un claro aumento de la densidad ósea. Las técnicas utilizadas (microradiografía y microscopía de fluorescencia) le permitieron detectar un aumento de la formación ósea. Para la visualización por microscopía de fluorescencia recurre a la inyección de oxitetraciclina, la cual tiene la propiedad de unirse a las superficies óseas de reciente formación, produciendo luego una coloración amarilla fluorescente al ser expuesta a la luz ultravioleta (33) (35).

En la reproducción experimental en bovinos, encuentra cambios similares (33).

Ousavaplangchai (154) realiza una investigación en cobayos, administrando a un lote de animales 3.000 U.I. diarias de vitamina D<sub>3</sub> durante 16 semanas; y dosificando a otro grupo con el equivalente a 400 mg. diarios de S.M., por un lapso de 4 semanas. En lo que a hueso se refiere, encontró cambios similares en ambos grupos y que básicamente consistieron en aumentar la resorción y porosidad en el hueso compacto, calcificaciones en los cartílagos articulares, engrosamiento del cartílago de crecimiento con disposición desordenada de los condrocitos y formación ósea incrementada sobre las trabéculas epifisarias con estrechamiento del espacio medular.

Las lesiones esqueléticas de bovinos experimentalmente into-

xicados con duraznillo blanco, consistieron según Dämrich, Döbereiner, Done y Tokarnia (61) (70), en: fibrosis medular, hiperostosis endóstica y perióstica, formación alterada de la sustancia fundamental de los osteoblastos y fibroblastos.

En 1976, Dos Santos y colaboradores (71) administraron S.M. (20 g. de hojas secas en 200 ml de agua) a conejos que recibían una dieta con alto (0,57 %) o bajo (0,24 %) contenido de calcio. La administración intragástrica se realizó a las 0, 12 y 36 horas. Distintos animales se necropsiaron a las 0, 12, 36, 60, 84 y 108 horas; observando un claro efecto negativo sobre la osteolisis osteocítica, originando en principio osteopetrosis. Los osteocitos sufren cambios regresivos que terminan en osteonecrosis; esto, unido a una menor aposición, se traduce luego en osteopenia. Estos autores interpretan que dosis moderadamente altas de S.M. o vitamina D, reducen la osteolisis osteocítica ocasionando osteopetrosis; dosis muy altas o repetidas, terminan por ocasionar necrosis de osteocitos.

De acuerdo con las observaciones radiológicas de la placa epifisaria realizadas por Ladizesky y col. (129), la administración diaria de 300 mg. de S.M. durante 14 días, fue capaz de iniciar la curación de las alteraciones óseas en ratas raquílicas; este efecto anti-raquílico fue menor que el obtenido con 200 U.I. de vitamina D<sub>3</sub>. Efectos antirraquílicos similares fueron encontrados por Kraft y colaboradores (121) en ratas; y estiman que la actividad del extracto acuoso de 50 mg. de S.M., equivale a una dosis de 0,35 U.I. de vitamina D<sub>3</sub>; el proveniente de 100 mg. a 0,69 U.I. de vitamina D<sub>3</sub> y el extracto de 200 mg. equivale a 0,99 U.I.

Los estudios de Mautalén en 1971 y 1972, demostraron que el S.M. aumenta la resorción ósea in vivo (139) (140). Trabajando en conejos, les administró <sup>45</sup>Ca, valorando 30 días después la eliminación del referido isótopo en controles y animales que recibieron 400 mg. de S.M.. Interpreta que el rápido incremento de la resorción, se debe a un efecto directo del S.M. sobre el tejido óseo, no requiriendo variaciones hormonales ni transformaciones metabólicas.

En 1973, Campos y colaboradores (26) confirman la capacidad osteolítica del S.M. trabajando en ratas tiroparatiroidectomizadas y en animales normales. Concluyen también que el S.M. actúa sobre el metabolismo fosfocálcico sin mediación de calcitonina, paratohormona o vitamina D.

Otros autores han demostrado igualmente, que el S.M. causa resorción ósea en animales de laboratorio (11) (102).

Uribe, Holick, Jorgensen y De Luca (191) confirman la capacidad del S.M. de estimular el transporte intestinal de calcio en ratas carenciadas en vitamina D. En contraposición con lo anteriormente expuesto, informan que el S.M. es incapaz de movilizar calcio del tejido óseo.

Al igual conclusión llegaron Basudde y Humphreys trabajando en conejos alimentados con concentraciones adecuadas de calcio y fósforo (10). Los mismos autores, en base a nuevas experiencias reconsideran su posición y se inclinan por un efecto positivo del S.M. en la resorción ósea (11).

Puche y Locatto (164) comunican que el S.M. ocasiona movilización de calcio y formación de citrato e hidroxiprolina in vitro, de acuerdo a sus experiencias con cultivos de hueso de embrión de

pollo. En ratas intactas encuentran que el contenido de ATP hepático y renal resulta reducido por efecto del S.M. Ese fenómeno lo consideran relacionado con la activación de la ATPasa mitocondrial a pH 9,4 que se produce por el agregado de S.M. a mitocondrias hepáticas aisladas. Sugieren que el S.M. influencia el metabolismo del calcio y del fósforo afectando el movimiento de iones hacia y desde el interior de la mitocondria.

Posteriores estudios confirman que la adición de S.M. a cultivos de tejido óseo in vitro, ocasiona un aumento de calcio e hidroxiprolina en el medio (134) (180) (192).

En discrepancia con lo anterior, en las experiencias de Moorhead y colaboradores, el S.M. resultó incapaz de movilizar calcio in vitro (144).

Una experiencia altamente significativa fue realizada por Puche y colaboradores en 1976 (165), con la finalidad de investigar los efectos de la administración prolongada de S.M. sobre el metabolismo de Ca, Mg, P y hueso en ratas en crecimiento. Un grupo de animales fue mantenido con una dieta baja en calcio (0,035 0/o, P = 0,40 0/o) por 5 semanas, y otro lote recibió alimentación con un normal contenido de calcio (1,56 0/o; P = 0,74 0/o) durante 8 semanas. En ambas dietas se mezclaron 50 gramos de hojas de S.M. por Kg de alimento.

Adicionado a la dieta normal en calcio, el S.M. incrementó la excreción urinaria de Ca, Mg y P, y redujo la excreción de hidroxiprolina y pirofosfato. A nivel histológico incrementó la formación ósea en las superficies trabeculares y endosteales. El contenido en citrato e hidroxiprolina del tejido óseo resultó significativamente aumentado.

Agregado a la alimentación con calcio bajo, el S.M. incrementó la severidad del hiperparatiroidismo producido por la dieta. La excreción urinaria de hidroxiprolina resultó aumentada y el cuadro histológico reveló un incremento de la resorción osteoclástica, trabéculas y cortical más delgadas que en los animales testigos.

En 1978 se estudió la composición química y cristalina del mineral depositado en las osificaciones pulmonares y aórticas de bovinos, el cual demostró ser apatita pobremente cristalizada, más rica en magnesio que el tejido óseo (166).

En una actualización del año 1978, De Vernejoul y colaboradores (67), consideran que la administración de S.M. durante un corto período, incrementa drásticamente la resorción ósea. Si por el contrario, se administra en forma crónica, hay aumento en la formación de hueso y osteoesclerosis radiológicamente detectable.

Stern, Ness y De Luca (185), probaron la acción de un extracto parcialmente purificado de S.M. sobre tejido óseo fetal de rata in vitro, aportando elementos que permitirían explicar anteriores resultados contradictorios. El extracto mostró un efecto bifásico sobre la resorción ósea, estimulándola a bajas concentraciones (0,03-0,3 mg/ml) e inhibiéndola a concentraciones de 1 mg y superiores. Esa curva dosis-respuesta difiere sustancialmente con la correspondiente al  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

Además del complejo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glucósido ya demostrado, existiría en el S.M. una sustancia inhibitoria de la resorción ósea capaz incluso de antagonizar los efectos de la paratohormona. El efecto estimulante de la resorción a las concentraciones citadas, puede bloquearse por el agregado de

calcitonina o glucagon al medio de incubado. Finalmente plantean como interrogante la posibilidad de que el complejo glicosídico actúe directamente o que por el contrario requiera una hidrólisis previa en las células óseas, con liberación de pequeñas concentraciones de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ; para aclarar este interrogante, manifiestan la necesidad de buscar sistemas de mayor sensibilidad.

#### *IV. Alteraciones óseas en ratas carenciadas en vitamina D.*

La falta de vitamina D ha sido considerada responsable de la pobre mineralización del tejido osteoide, con la consiguiente aparición de raquitismo en el individuo en crecimiento; y osteomalacia en el adulto. Tradicionalmente el raquitismo se desarrolla cuando hay poca o ninguna exposición a la luz del sol y en niños con consumo insuficiente de vitamina D (84).

Hace más de medio siglo se consideraba que la matriz cartilaginosa y ósea no se calcificaba debido a una baja concentración de calcio y fósforo en suero, expresado como producto  $\text{Ca} \times \text{P}$  (107). La hipovitaminosis D, al no permitir una normal absorción intestinal de calcio y fósforo, sería un factor importante.

Más adelante se consideró que en la patogénesis del raquitismo, interviene una falta de vitamina D y una baja concentración iónica de P (161).

El raquitismo producido experimentalmente en ratas carenciadas en vitamina D y fósforo es un modelo muy utilizado en el estudio de los mecanismos de calcificación (19).

Las investigaciones de Rasmussen en 1969 (171) demostraron que una depleción en vitamina D en ratas con aporte adecuado de

Ca y P, raramente causa alteraciones óseas o cartilaginosas. El producto  $\text{Ca} \times \text{P}$  se mantuvo por encima del valor mínimo. El espesor del disco epifisario femoral fue normal en todos los casos, apareciendo claramente ensanchado solamente en la tibia; la morfología ósea macro y microscópica no reveló otras diferencias con los animales controles. Microradiográficamente no pudieron detectarse sensibles diferencias en la mineralización ósea o cartilaginosa; osteoblastos y osteoclastos ofrecieron una disposición y morfología normal, y no se detectaron acúmulos de sustancia osteoide. Interpretan que el ensanchamiento del cartílago epifisario de la tibia, es un efecto directo de la hipovitaminosis D y que no guarda relación con variaciones en la concentración de Ca o P.

La administración de dosis farmacológicas de vitamina  $\text{D}_3$  a ratas tiroparatiroidectomizadas con dieta baja en calcio, ocasionaron un aumento de la resorción osteoclástica, pronunciada hiperplasia osteoblástica y proliferación de condrocitos en la placa epifisaria. Niveles fisiológicos de vitamina D no ocasionaron cambios de ese tipo comparándolas con ratas carenciadas en vitamina D (198).

Según Bordier (18), la carencia de vitamina D se acompaña frecuentemente de osteolisis osteocítica, que no se debería al hiperparatiroidismo secundario que se establece concomitantemente, sino a la demora en la mineralización.

En la revisión bibliográfica anterior (III, c) se podrá apreciar cuanto es lo que aún resta por conocer, demostrar y valorar con referencia al S.M. y sus efectos directos y/o indirectos sobre el tejido óseo. Igualmente queda en

evidencia, a pesar de la brevedad de tal síntesis, la complejidad creciente de los estudios morfológicos y especialmente bioquímicos.

El presente trabajo es complementario de otro anterior (85), y se ha limitado a técnicas histológicas corrientes. No obstante permite extraer algunas conclusio-

nes novedosas, constituyendo un nuevo aporte al tema.

El objetivo del presente trabajo consiste en estudiar mediante la microscopía óptica y en forma comparativa, huesos de ratas carenciadas en vitamina D y de animales dosificados con Solanum malacoxylon (S.M.) por largos períodos.

### MATERIALES Y METODOS.

En los animales utilizados en esta experiencia, ya se estudiaron las manifestaciones clínicas y lesiones macroscópicas e histológicas a nivel de los tejidos blandos (85). Se utilizaron 29 ratas Sprague-Dawley (SPF), provenientes de la casa Wiga, 8741 Sulzfeld, Estado de Baviera, República Federal de Alemania.

Durante toda la experiencia recibieron una dieta especial carente de vitamina D (Altromin-sonderdiäten C 1017; Fabricante Altromin GmbH, 4937 Lage Lippe República Federal de Alemania) con la siguiente composición:

#### Composición (0/o en la dieta)

Grano de soja, extr.	35,0
Concentrado, DAB 6	42,0
Sacarosa	10,0
Aceite de oliva, ref.	3,0
Polvo de celulosa	2,0
Miner +oligoelementos	6,0
Mezcla vitamínica	2,0

#### Sustancias alimenticias básicas (0/o en la dieta).

Proteínas	15,8
Lípidos	3,0
Fibra	4,0
Cenizas	8,5
Agua	12,0
Acido linoleico	0,015
Energía (Kcal/g)	3,2

#### Aminoácidos (0/o en proteína bruta)

Lisina	5,8
Metionina + cisteína	3,9
Fenilalanina + tirosina	7,2
Arginina	6,8
Histidina	2,2
Triptofano	1,2
Treonina	3,4
Isoleucina	5,0
Leucina	6,8
Valina	4,8

#### Vitaminas (suplemento en 1000 g/dieta)

Vitamina A	15.000 U.I.
Vitamina E	150 mg

Vitamina K <sub>3</sub>	10 mg
Vitamina B <sub>1</sub>	20 mg
Vitamina B <sub>2</sub>	20 mg
Vitamina B <sub>6</sub>	15 mg
Vitamina B <sub>12</sub>	30 mg
Acido nicotínico	50 mg
Acido pantoténico	50 mg
Acido fólico	10 mg
Biotina	200 mcg
Colina	1000 mg
Acido p-aminobenzoico	100 mg
Inositol	100 mg
Vitamina C	20 mg
DL-metionina	3500 mg

Yodo	0,4
Molibdeno	0,25
Fluor	4,5

La misma dieta especial fue usada por von Herrath, Kraft, Offermann y Schäfer en 1974(102)

Los períodos de privación de vitamina D previos a la administración del extracto acuoso de S.M. fueron variables en los distintos animales, según se indica en la siguiente tabla:

*Sustancias minerales (suplemento en 1000 g/dieta)*

CO <sub>3</sub> Ca	30 g
Acetato de potasio	10 g
Cl Na	8 g
CO <sub>3</sub> HNa	6 g
SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O	5 g

*Sustancias minerales (‰ en la dieta)*

Calcio	1,3
Fósforo	1,2
Magnesio	0,15
Sodio	0,35
Potasio	0,23
Cloro	0,48

*Oligoelementos (suplemento en 1000 g/dieta)*

Fe(II)Gluconat.2H <sub>2</sub> O	1480 mg
SO <sub>4</sub> Mn.4H <sub>2</sub> O	450 mg
CO <sub>3</sub> Zn	40 mg
SO <sub>4</sub> Cu.5H <sub>2</sub> O	20 mg
IK	0,5 mg
MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,5 mg
FNa	10 mg

*Oligoelementos (mg en 1000 g/dieta)*

Hierro	170
Manganeso	90
Zinc	20
Cobre	5

<i>Rata N°</i>	<i>Días sin vit. D</i>	<i>Dosis de S.M.</i>
4	14	7
2 y 3	14	14
1	14	21
5 y 6	14	28
9	28	7
21, 22 y 24	61	7
15, 17 y 23	61	14
14, 18, 19 y 20	61	21
12, 13 y 16	61	28
7	35	—
8, 10 y 11	48	—
27 y 29	67	—
28	74	—
26	78	—
25	88	—

Cada dosis de extracto acuoso de Solanum malacoxylon conteniendo una cantidad equivalente a 500 mg. de hojas secas con un volumen variable entre 2 y 2,5 ml, fue administrada diariamente por vía intraestomacal con sonda esofágica rígida de acero inoxidable. Veinte animales recibieron 7 dosis semanales. Todos permanecieron con la dieta descripta, según se expresa en la tabla anterior.

Preparación del extracto acuoso: El Solanum malacoxylon fue recogido en el Partido de Berisso (Provincia de Buenos Aires), en marzo de 1975 y secado a temperatura ambiente al abri-

go de la luz solar. Manualmente se separaron los tallos de las hojas, utilizando sólo éstas. Ese material fue finamente molido y tamizado por el Dr. Wolfgang Kunz (2<sup>da</sup> Clínica Médica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Munich) y utilizado en parte en una experiencia realizada en bovinos (126) (127).

El extracto acuoso se preparaba cada día mezclando 500 mg. de material pulverulento por animal en experimentación, con agua bidestilada. Después de permanecer 24 horas a temperatura ambiente, era centrifugado a 4.000 r.p.m. durante 10 min. y extraído el sobrenadante con una pipeta Pasteur.

Los animales fueron sacrificados por inhalación de cloroformo

(Chloroform-Merk, Darmstadt).

Las necropsias se realizaron según técnicas convencionales parcialmente adaptadas, tal como se detalló en un trabajo anterior (85).

Los huesos recogidos para observación microscópica (femur derecho y costillas) fueron fijados en formol neutro (Formaldehydlösung min 37 0/o säurefrei für die Histologie-Merk, Darmstadt) diluido en agua corriente en proporción 1:7.

El material fue descalcificado con EDTA (EDTA DISODICO - Anedra, Ind. Argent.), incluido en parafina y coloreado con hematoxilina y eosina y azul de toluidina. Se realizaron cortes longitudinales de la cabeza y transversales de diáfisis en femur; y longitudinales de la unión condro-costal.

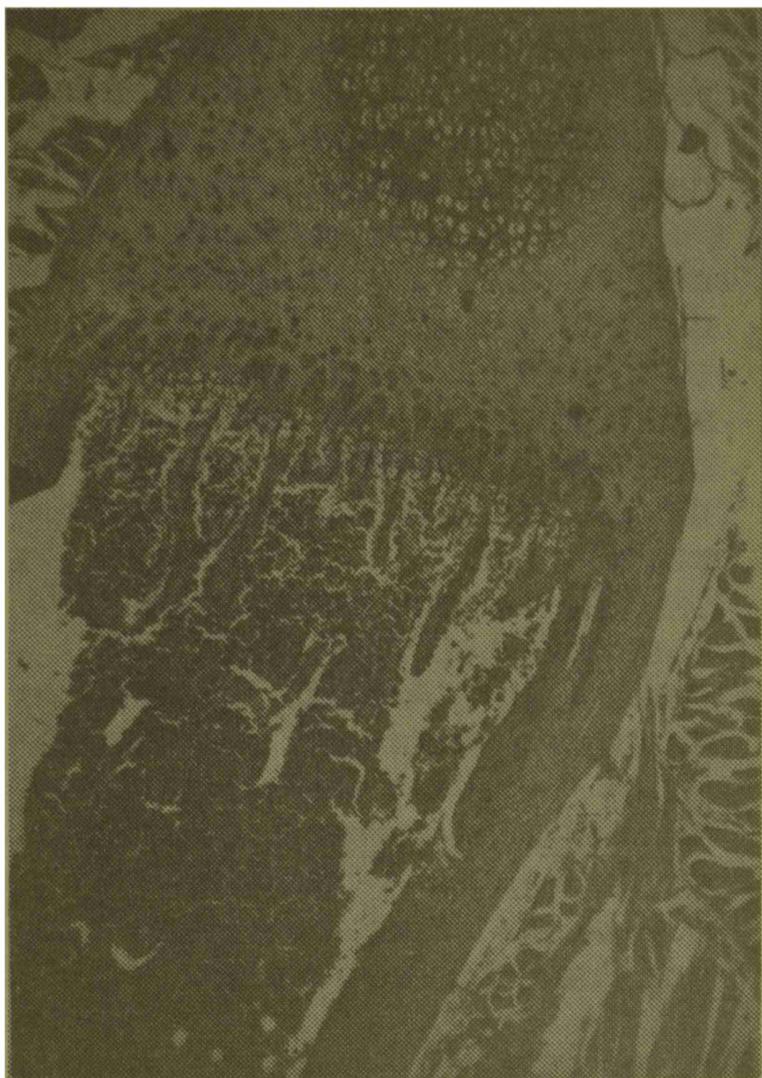
## RESULTADOS

### *a) Unión condrocostal.*

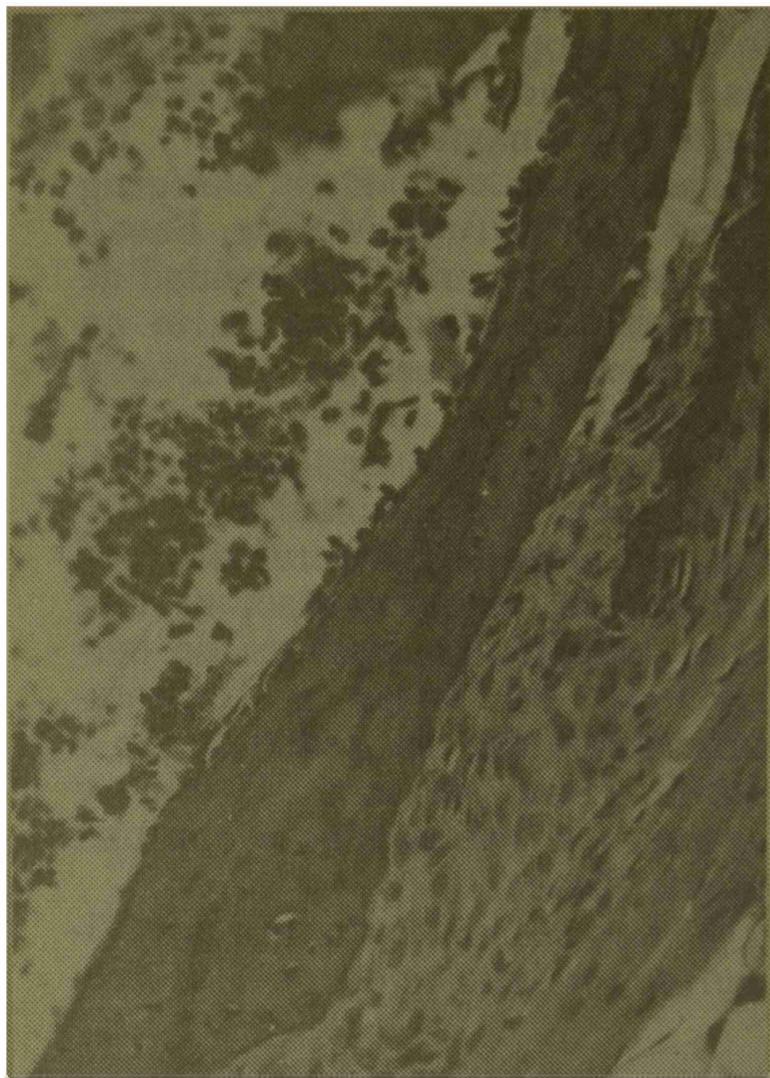
En cortes longitudinales de la unión condrocostal de los animales sometidos a carencia de vitamina D, no se observan lesiones de gran relevancia. La línea de erosión o metáfisis es regular y los condrocitos hipertróficos se disponen en la forma normal (foto N° 1, rata N° 7, 35 días sin vitamina D). Las trabéculas son escasas y el hueso compacto delgado, mientras que la presencia de osteoblastos y osteoclastos es reducida. Las células osteocitárias se encuentran alojadas en cavidades estrechas y solamente una pequeña cantidad muestra cavidades más amplias que podrían indicar un proceso de resorción periosteocitaria (flecha, foto N° 2).

Aumentando el período de carencia en vitamina D, se observa un claro incremento en el número de osteoclastos (fotos N° 3 y 4 rata N° 8), se altera la disposición del cartilago hipertrófico, y la línea de erosión se presenta levemente irregular (fotos N° 5 y 6, ratas N° 26 y 27, con 78 y 67 días sin vitamina D, respectivamente).

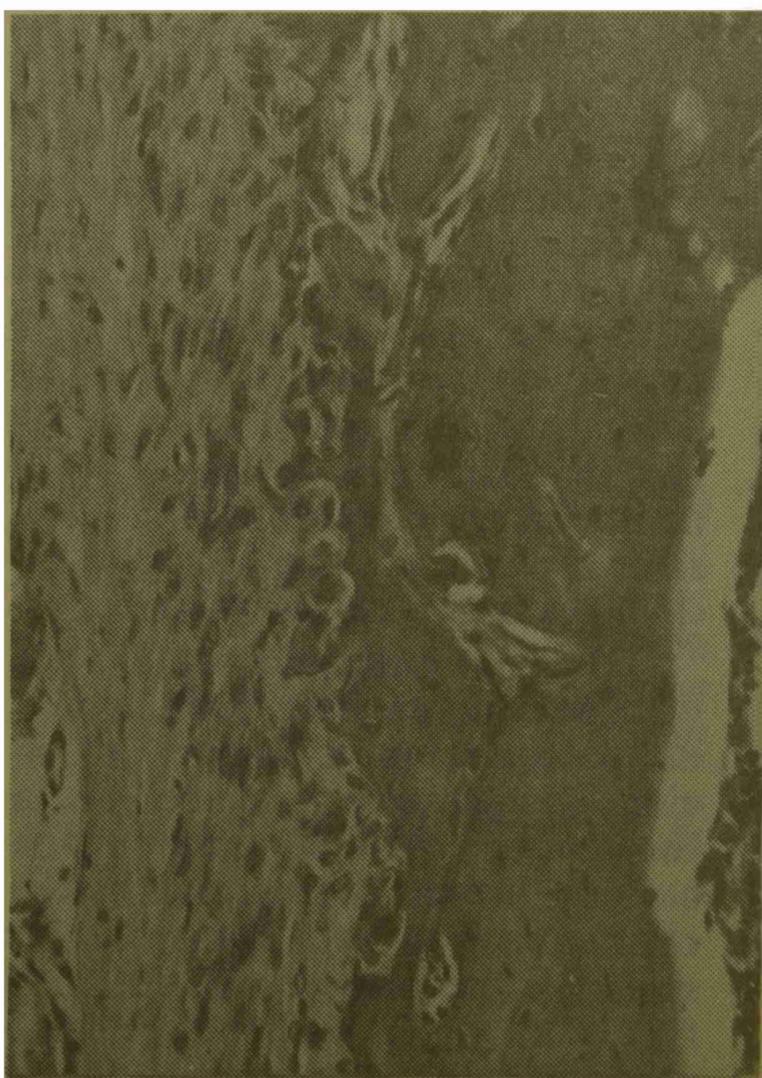
La administración de 7 dosis de S.M. originó neta disminución de osteoclastos y mayor aposición de sustancia osteoide. En la fotografía N° 7 se observa una cavidad previa de resorción osteoclástica que se está llenando con sustancia osteoide. En las fotografías N° 7 y 8 (ratas N° 9 y 21 respectivamente), nótese los osteocitos sin alteraciones aparentes; las



**F. 1 - Rata N<sup>o</sup> 7 - 35 días sin vitamina D: Línea metafisaria regular con escasas trabéculas y hueso compacto delgado . H.E. 70 X.**



**F 2 - Rata N<sup>o</sup> 7 - 35 días sin vitamina D: Re-sorción periosteocitaria (flecha) H.E. 250 X.**



**F. 3 - Rata N<sup>o</sup> 8 - 48 días sin vitamina D: In-cremento del número de osteoclastos. H.E. 250 X.**



**F. 4 - Rata N<sup>o</sup> 8 - 48 días sin vitamina D: In-cremento del número de osteoclastos H.E. 800 X.**

flechas verticales indican osteolisis osteocítica.

Con 14 o más dosis, comienzan a aparecer severas alteraciones regresivas en los osteocitos: núcleos picnóticos y lagunas osteocíticas vacías y de contorno mal definido (foto N° 9, rata N° 3). Las trabéculas son más numerosas y gruesas que en el grupo anterior, y la cortical aumenta de espesor (foto N° 10, rata N° 1); compárese con las fotografías N° 1, 5 y 6.

La osteonecrosis (flecha horizontal) resulta ya muy severa con 21 dosis de S.M. y especialmente en las abundantes trabéculas (foto N° 11, rata N° 1). Los osteocitos que conservan sus características (flechas verticales) son escasos y se encuentran alojados en grandes lagunas (fotos N° 11 y 12, ratas N° 1 y 18 respectivamente).

Con 28 dosis de S.M., las trabéculas son muy abundantes y de gran espesor (foto N° 13, rata N° 6). Algunas lagunas osteocíticas son amplias, de bordes denticulados y en muchos casos están rodeadas por un anillo basófilo, características de osteolisis; pero en su mayoría, se presentan desdibujadas y vacías o con restos de osteocitos (fotos N° 14, 15 y 16, rata N° 13). La presencia de osteoblastos es discreta y los osteoclastos están prácticamente ausentes, a pesar que las áreas de osteonecrosis abundan tanto en la cortical como en las trabéculas.

#### *b) Extremidad proximal del femur.*

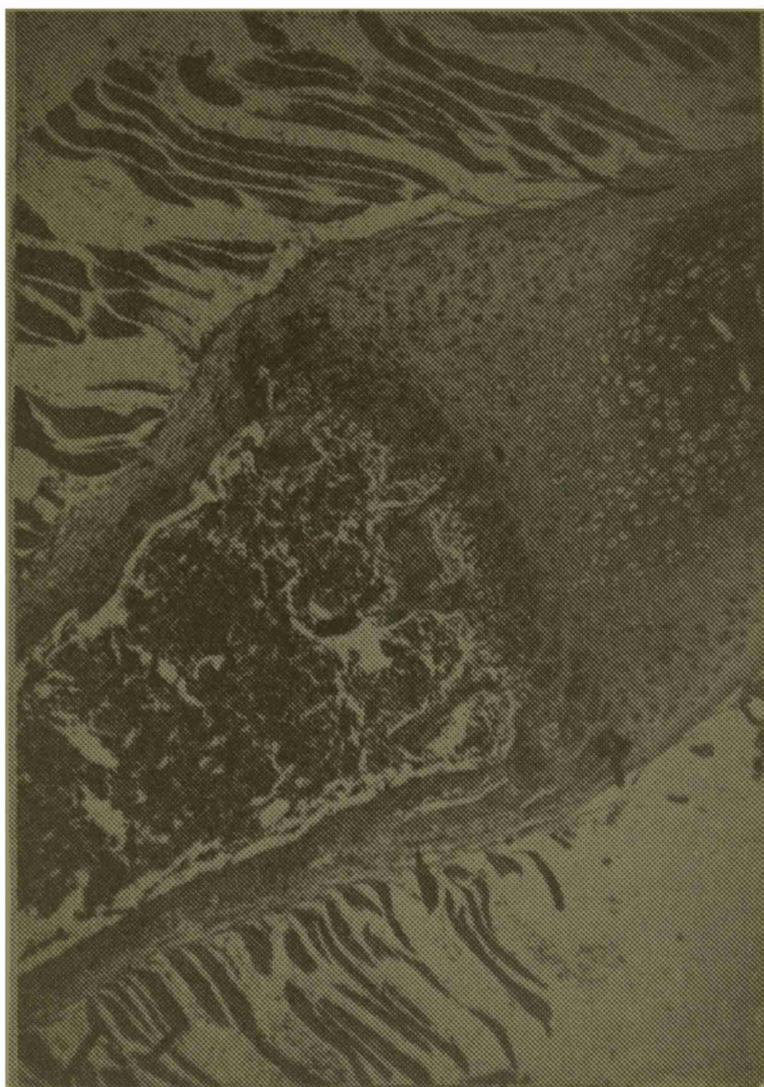
La carencia de vitamina D por períodos variables no originó lesiones evidentes en epífisis (E), disco epifisario (D) o metáfisis (M) (foto N° 17, rata N° 11). La actividad de osteoblastos y osteoclastos es moderada, mientras

que los osteocitos aparecen normales y solamente unos pocos en función osteolítica (flechas verticales; fotos N° 18 y 19, rata N° 28, 74 días sin vitamina D). La existencia de líneas de cementación (flecha oblicua) y de abundante matriz cartilaginosa (en negro), se interpreta como consecuencia de reducida osteolisis osteocítica.

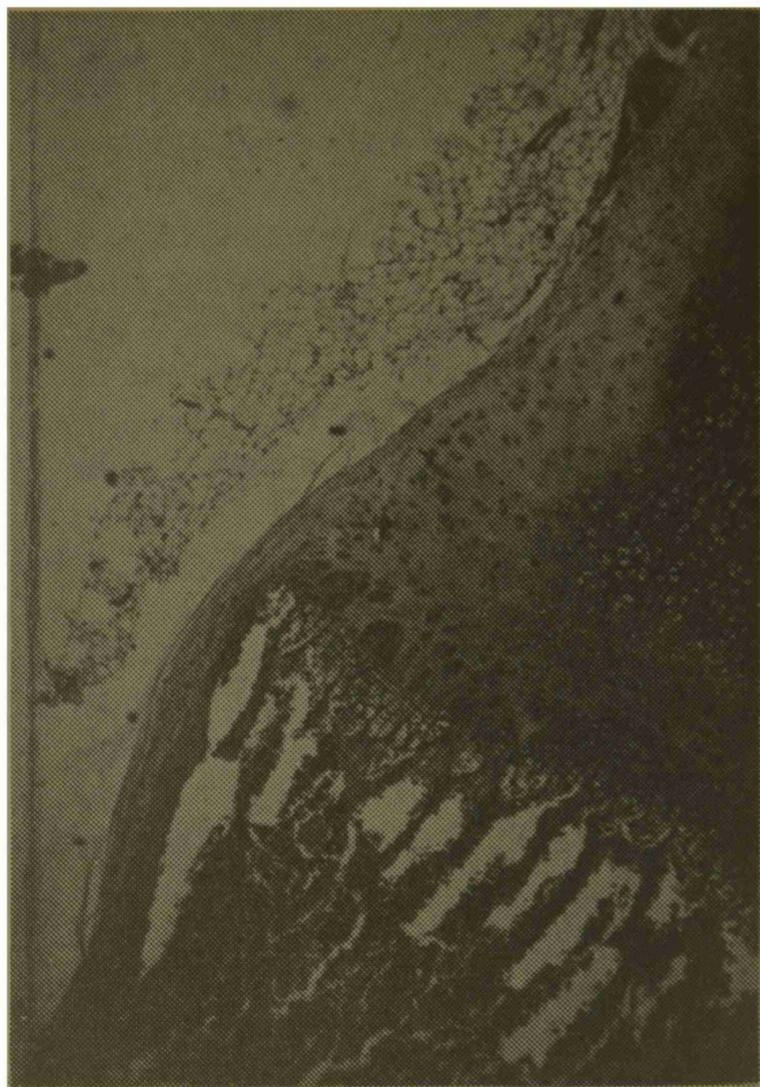
Con 7 dosis de S.M. se incrementa levemente la aposición de sustancia osteoide, los osteoblastos son manifiestos aunque no numerosos (foto N° 20, rata N° 24). Hay un aumento notable de la osteolisis osteocítica en algunos animales del grupo (flechas verticales en las fotos N° 21, 22, 23 y 24); aparecen también lagunas vacías o con osteocitos alterados (flechas horizontales en las fotos N° 22 y 24).

Con 14 dosis de S.M. resulta ya notable el aumento en número y espesor de las trabéculas óseas (foto N° 25, rata N° 17); no sólo se incrementa el hueso trabecular metafisario (M), sino también el epifisario (E). La magnitud de esa osteopetrosis puede apreciarse fácilmente comparando la fotografía N° 25 con la N° 17. Los osteocitos necrosados o severamente afectados constituyen la mayoría (flechas horizontales, fotos N° 26 y 27), en algunos pocos casos habría osteolisis (flechas verticales). La reducida osteolisis periosteocitaria se refleja igualmente, en la presencia de material condroide y notorias líneas de cementación en epífisis y metáfisis.

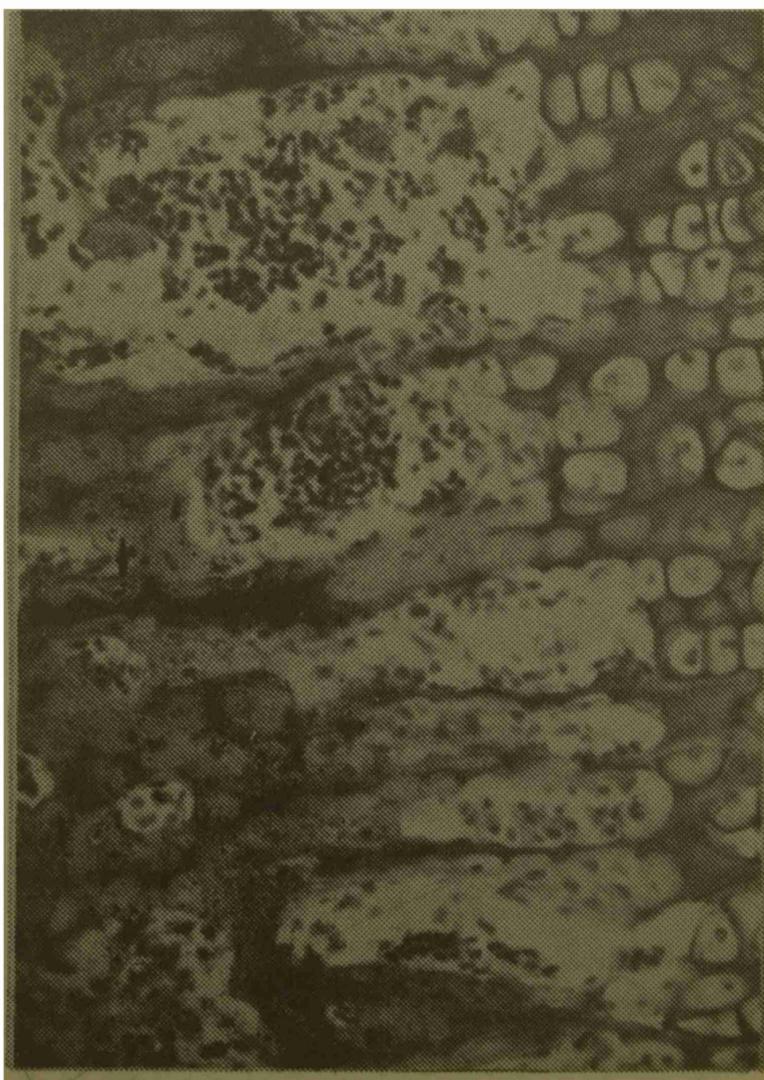
Los osteoblastos son muy activos en el endostio con formación de hueso nuevo laminar. En correspondencia con esas áreas y siempre en el hueso compacto, se presentan abundantes lagunas de resorción osteoclástica; en las trabéculas, la actividad osteoblástica



**F. 5 - Rata N° 26 - 78 días sin vitamina D: Línea de erosión levemente irregular. H.E. 70 X.**



**F. 6 - Rata N° 27 - 67 días sin vitamina D: Línea de erosión irregular y trabéculas adelgazadas H.E. 70 X.**



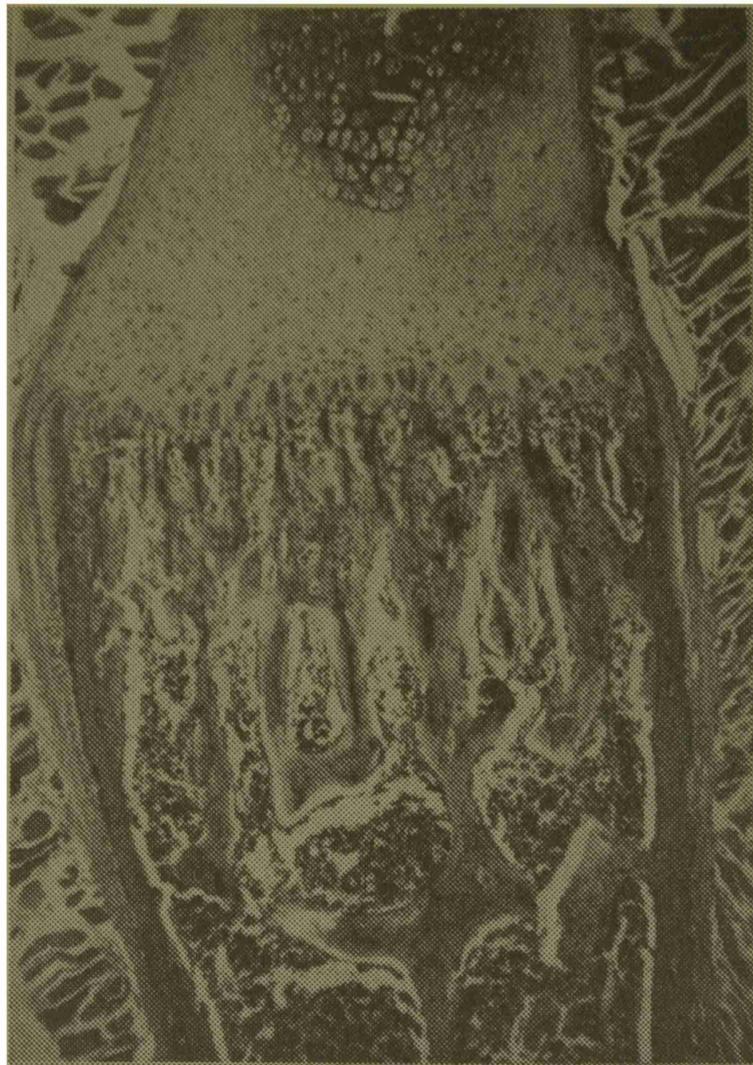
**F. 7 - Rata N° 9 - 7 dosis S.M.: Desaparición de osteoclastos con deposición de sustancia osteoide. H.E. 250 X.**



**F. 8 - Rata N° 21 - 7 dosis S.M.: Osteólisis osteocítica (flecha) H.E. 250 X.**



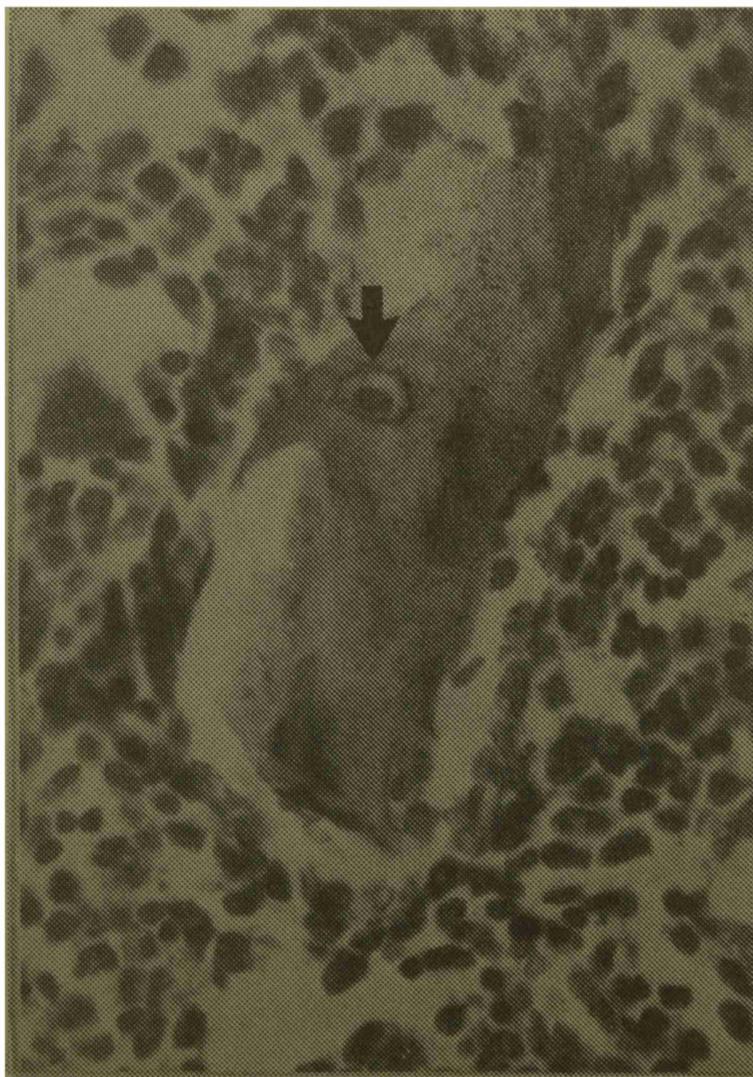
F. 9 - Rata N° 3 - 14 dosis S.M.: Osteocitos con núcleos picnóticos, lagunas vacías y de contorno mal definido. H.E. 800 X.



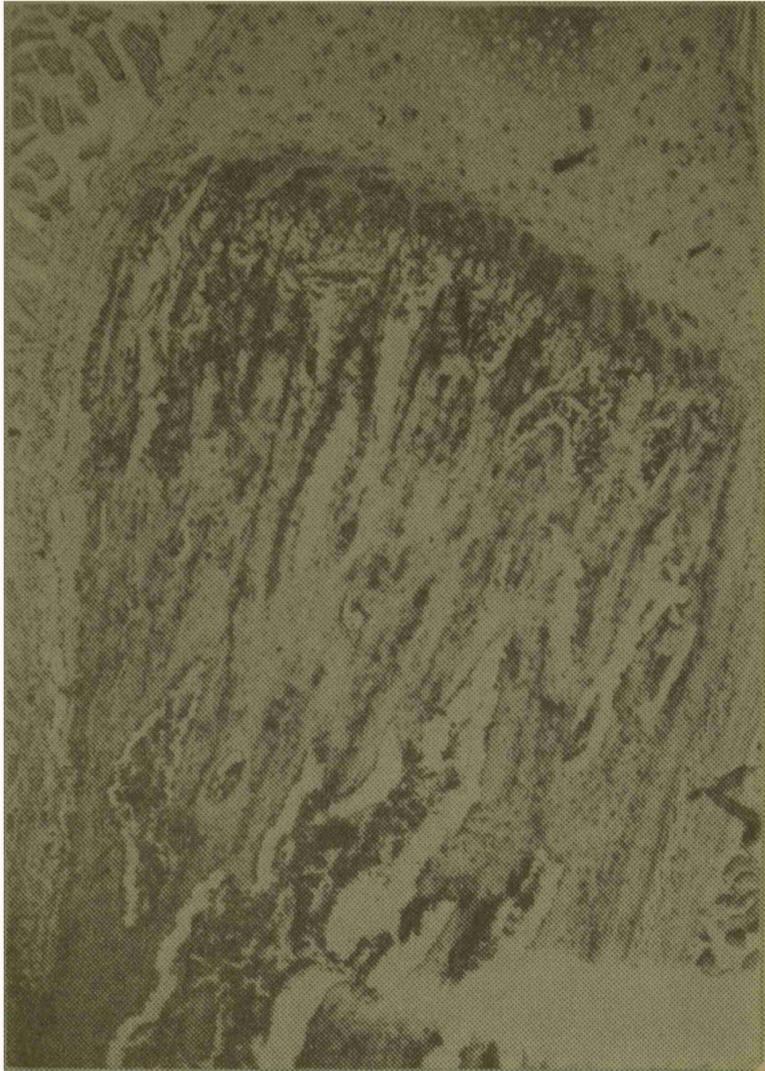
F. 10 - Rata N° 1 - 21 dosis S.M.: Trabéculas engrosadas (compárese con F. 1, 5 y 6). H.E. 70 X.



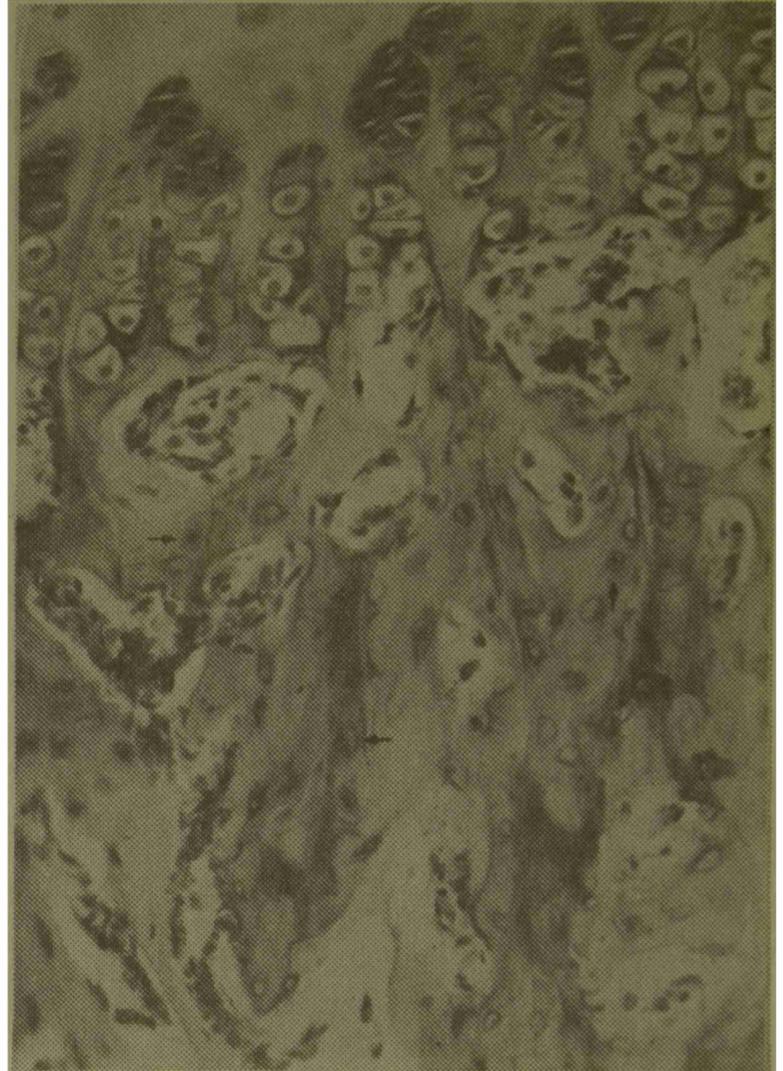
F. 11 - Rata N° 1 - 21 dosis de S.M.: Osteonecrosis (flecha horizontal) y osteocitos normales (flecha vert.) en grandes lagunas H.E. 250 X.



F. 12 - Rata N° 18 - 21 dosis S.M.: Osteolisis osteocítica (flecha) H.E. 800 X.



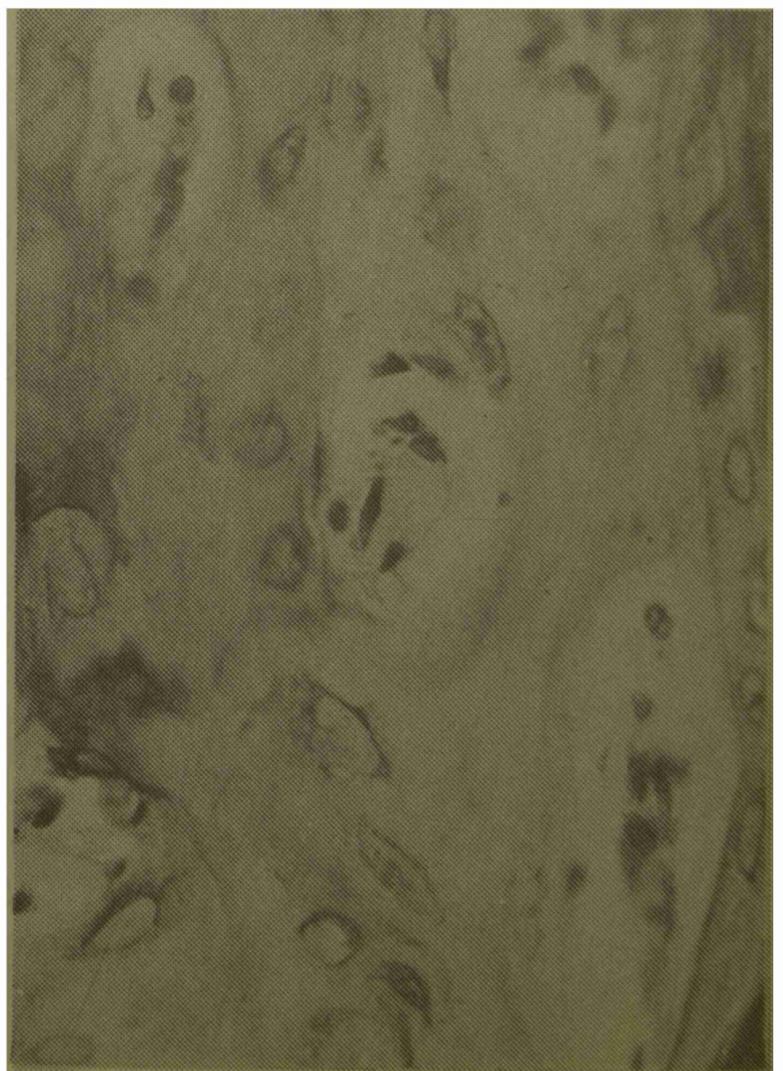
**F. 13 - Rata N° 6 - 28 dosis S.M.: Trabéculas abundantes y de gran espesor. H.E. 70 X.**



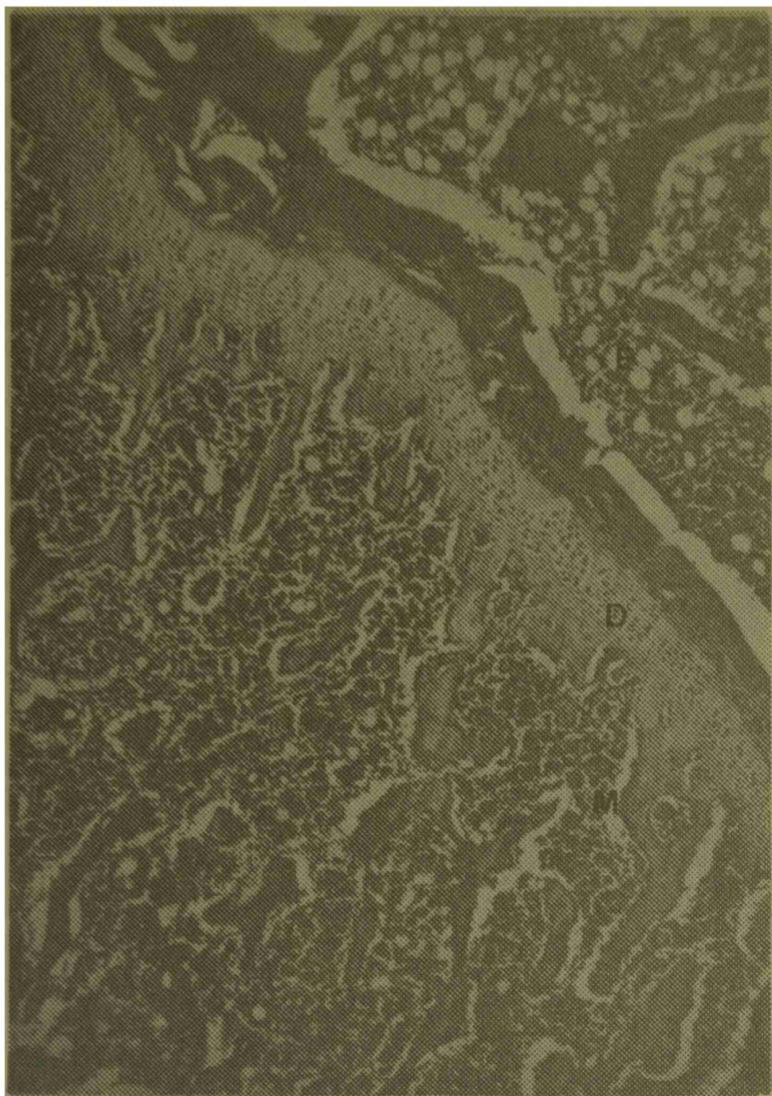
**F. 14 - Rata N° 13 - 28 dosis S.M.: Intensa necrosis osteocítica (flecha hor.) y discreta osteolisis (flecha vert.). H.E. 250 X.**



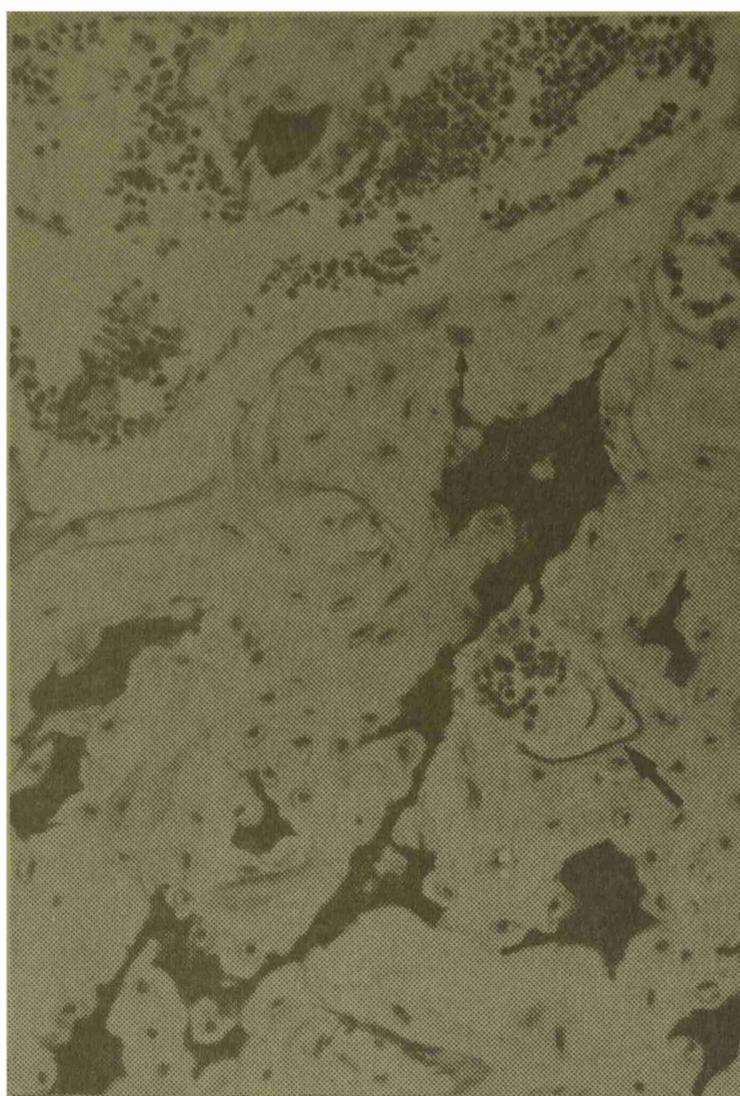
**F. 15 - Rata N° 13 - 28 dosis S.M.: Otra zona de intensa necrosis osteocítica H.E. 250 X.**



**F. 16 - Rata N° 13 - 28 dosis S.M.: Osteocitos necrosados a mayor aumento H.E. 800 X.**



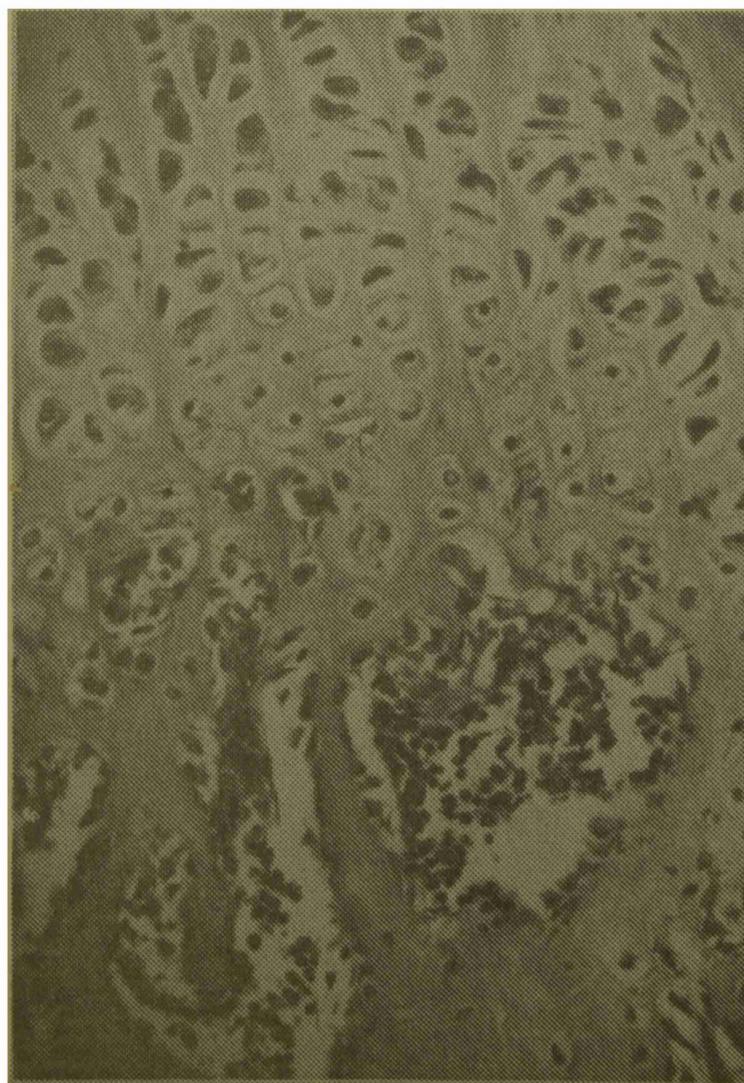
F. 17 - Rata N<sup>o</sup> 1 - 48 días sin vitamina D: Sin lesiones evidentes en epífisis (E), disco epifisario (D) y metáfisis (m). H.E. 70 X



F. 18 - Rata N<sup>o</sup> 28 - 74 días sin vitamina D. Reducida osteolisis (flecha vert.), líneas de cementación (flecha obl.) sustancia condroide (en negro). Azul Tol. 250 X.



F. 19 - Rata N<sup>o</sup> 28 - 74 días sin vitamina D: Abundantes osteocitos en reposo y escase osteólisis (flecha). Azul Tol. 800 X.



F 20 - Rata N<sup>o</sup> 24 - 7 dosis de S.M.: Moderada actividad osteoblástica H.E. 250 X.

y osteoclástica es por el contrario, muy reducida.

En la fotografía N° 25 puede comprobarse la desaparición parcial del cartílago de crecimiento y pérdida de basofilia en algunas porciones del cartílago articular.

Las fotografías N° 28 y 29 permiten comprobar un aumento del tejido óseo trabecular, y el confinamiento de la médula a pequeños islotes tanto en epífisis como en metáfisis (compárese con la foto N° 17). Ambos cortes corresponden a animales dosificados con 21 dosis de S.M. En las trabéculas metafisarias se observa severa necrosis osteocitaria (flechas horizontales), osteonecrosis (N), osteolisis y condrolisis osteocítica (flechas verticales, fotos N° 31, 32, 33 y 34); la presencia de osteoblastos a ese nivel es discreta pero evidente, y las líneas de cementación son abundantes (flecha oblicua, foto N° 34). En el hueso esponjoso epifisario, la actividad osteoblástica es muy intensa, con formación de osteonas y osteocitos que conservan su integridad aparente; no obstante hay escasa osteolisis y las líneas de cementación resultan muy abundantes y notorias (foto N° 30, rata N° 19).

En el hueso compacto se observa un cuadro similar al grupo anterior: intensa aposición de sustancia osteoide a partir de muy activos osteoblastos endosteales, y grandes cavidades con algunos osteoclastos.

El cartílago de crecimiento (fotos N° 28 y 29, ratas N° 14 y 19, 21 dosis de S.M.), aparece adelgazado y poco activo; el cartílago articular muestra igualmente alteraciones: pérdida de basofilia, espesor disminuido y superficie irregular (foto N° 30).

En el grupo de animales que recibieron 28 dosis de S.M.

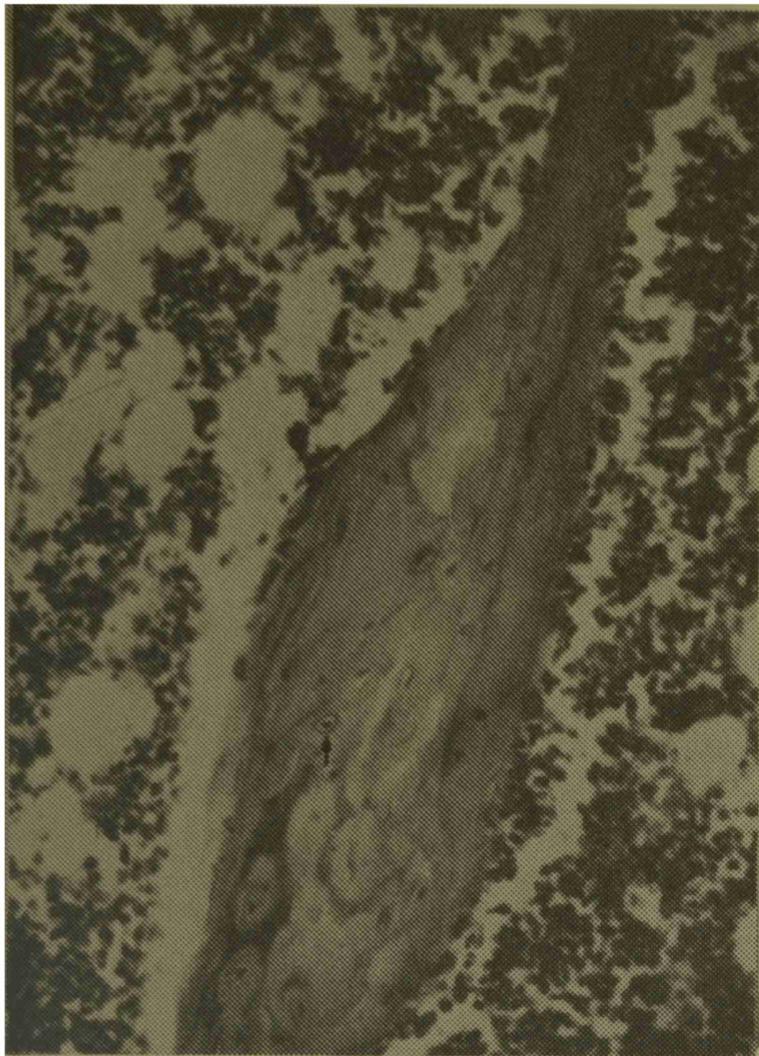
(fotos N° 35 y 36, rata N° 12), la epífisis (E), metáfisis (M) y cartílago de crecimiento, no presentan diferencias notorias con el grupo anterior. Los osteocitos aparecen necróticos en su casi totalidad (flechas horizontales, fotos N° 37, 38, 39 y 40); presentándose mucho menos afectados en las trabéculas epifisarias. En ambos lados de la placa epifisaria se observan netas líneas de cementación y osteoblastos en actividad (flecha oblicua, foto N° 37); las trabéculas metafisarias presentan abundante material condroide fácilmente demostrable en los cortes coloreados con azul de toluidina (áreas de color negro en las fotos N° 37 y 38), pero de basofilia reducida con hematoxilina y eosina. El hueso compacto cortical, el cartílago articular y el de crecimiento presentan una histomorfología equiparable a los animales que recibieron 21 dosis de S.M. y que ya fuera descripta.

### c) *Diáfisis del femur*

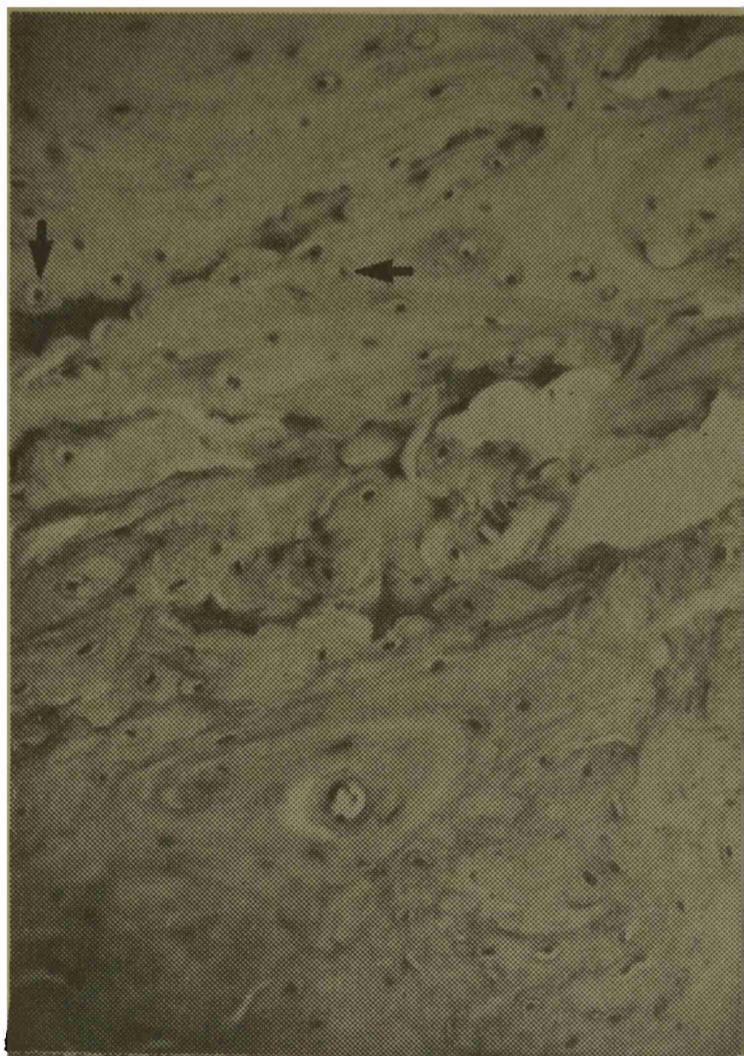
En cortes transversales de la mitad de la diáfisis del femur derecho, no se comprueban alteraciones en los animales carenciados con vitamina D (foto N° 41, rata N° 11).

Después de recibir 7 dosis de S.M., comienzan a observarse osteocitos necróticos (flechas horizontales), otros en osteolisis (flechas verticales) y líneas de cementación muy evidentes (fotos N° 42 y 43, rata N° 22). En las superficies periosteales y endosteales se revela un activo proceso de aposición ósea.

Las áreas de osteonecrosis resultan evidentes (N) (fotos N° 42 y 44). A las dos semanas de tratamiento, aparecen abundantes lagunas de resorción (fotos N° 44 y 45) con presencia de osteoclastos (flechas oblicuas), las líneas de



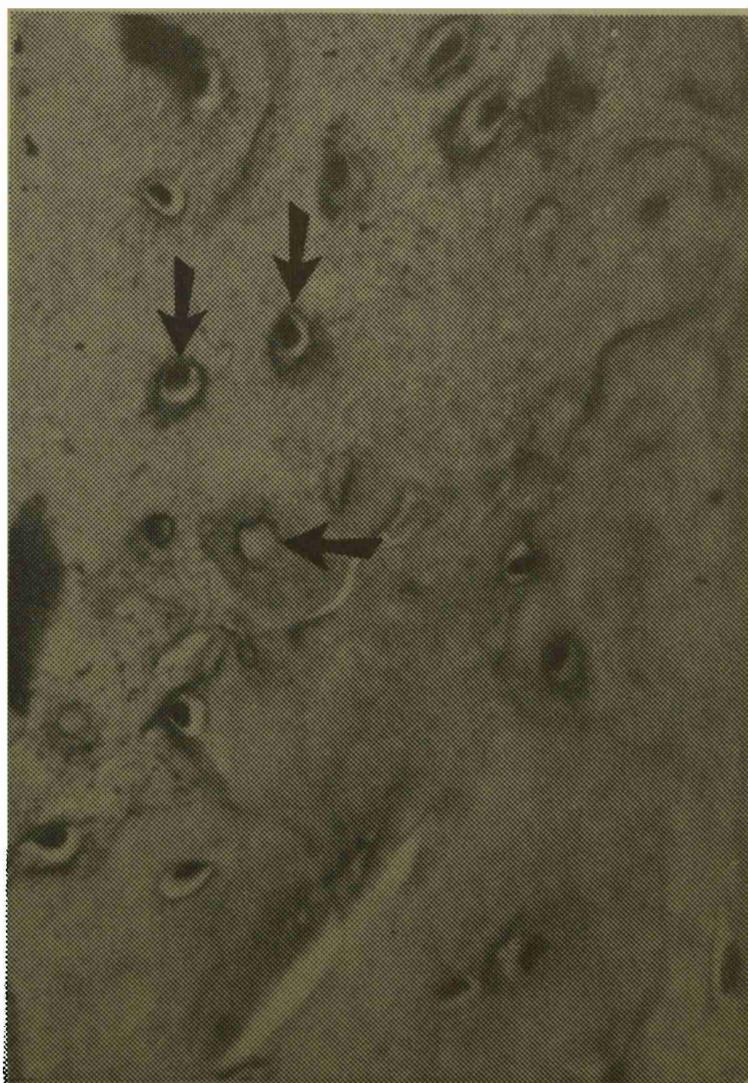
F. 21 - Rata N° 21 - 7 dosis S.M.: Osteolisis osteolítica (flecha) H.E. 250 X.



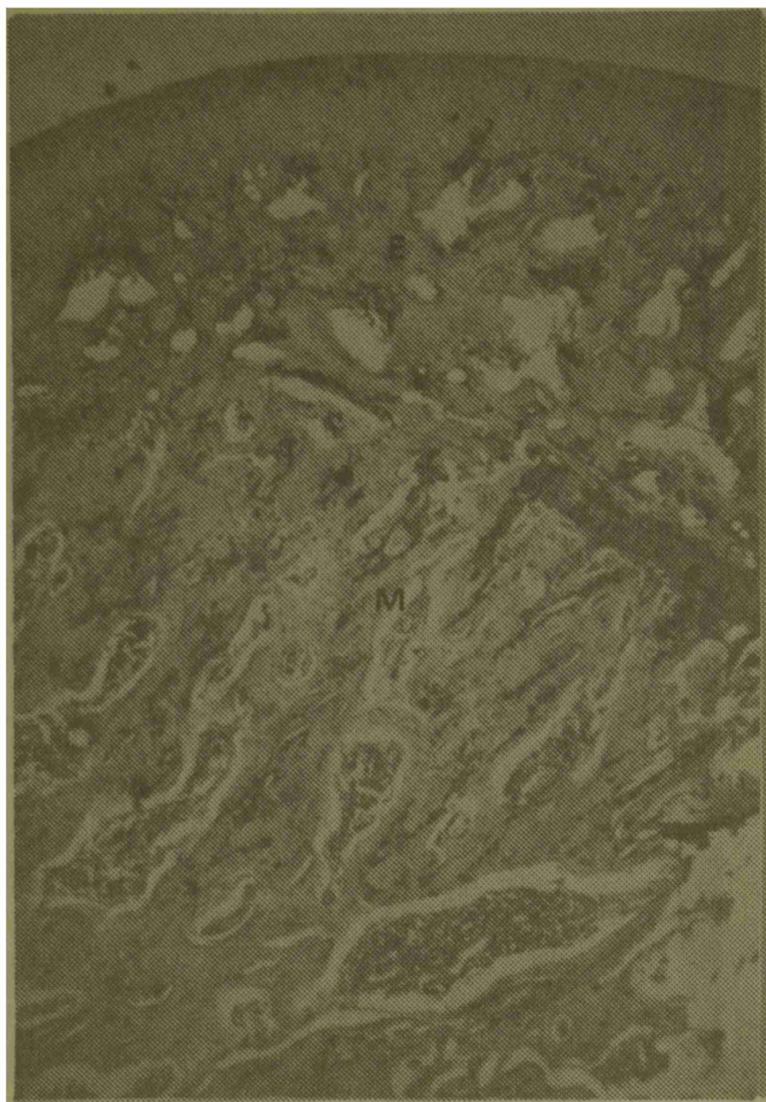
F. 22 - Rata N° 21 - 7 dosis S.M.: Osteolisis osteocítica (flecha vert). y osteocitos necrosados (flecha hor.) H.E. 250 X.



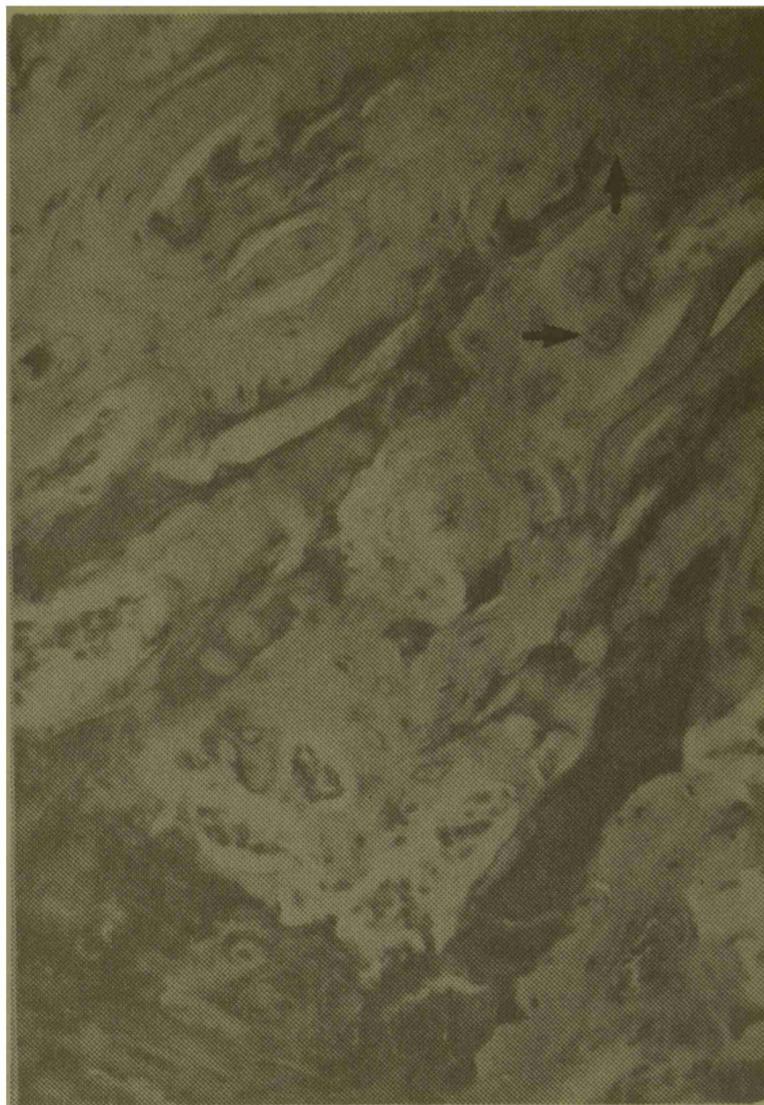
F. 23 - Rata N° 21 - 7 dosis S.M.: Engrosamiento de una trabécula por aposición de sustancia osteoide. Azul Tol. 800 X.



F. 24 - Rata N° 24 - 7 dosis S.M.: Osteocitos en osteólisis (flecha vert) o necróticos (flecha hor). H.E. 800 X.



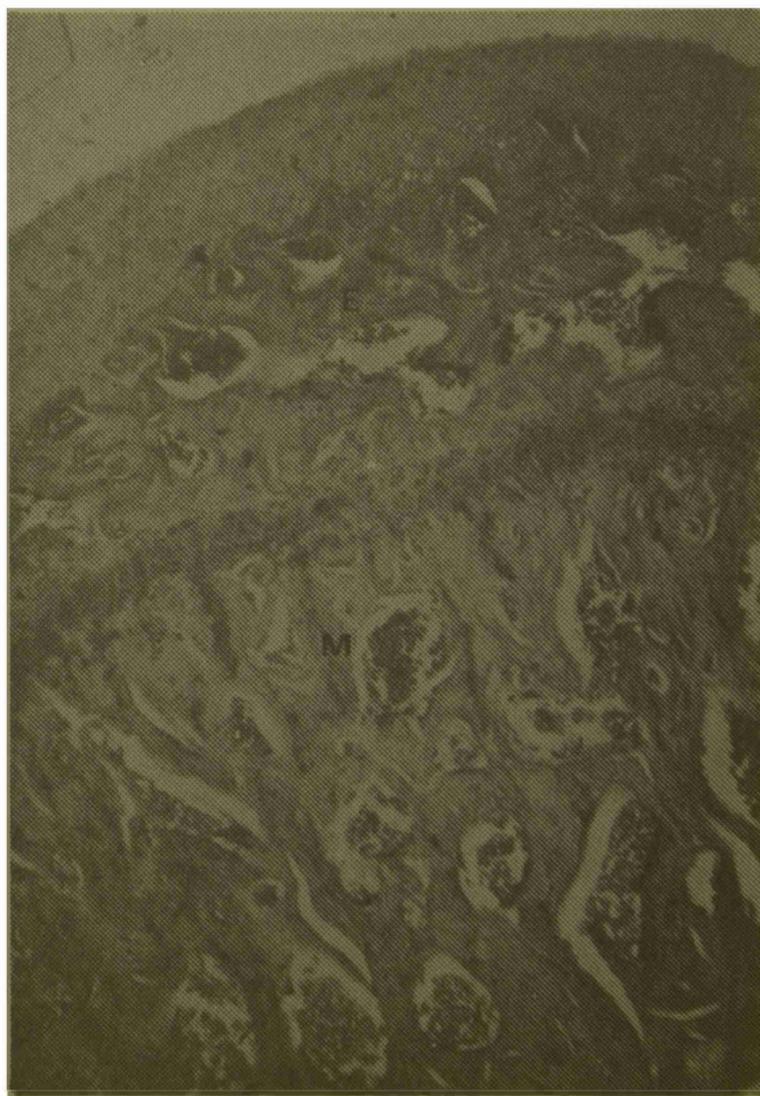
**F. 25 - Rata N° 17 - 14 dosis S.M. : Trabéculas gruesas y abundantes en epífisis (E) y metáfisis (M) (compárese con F. 17) H.E. 70 X.**



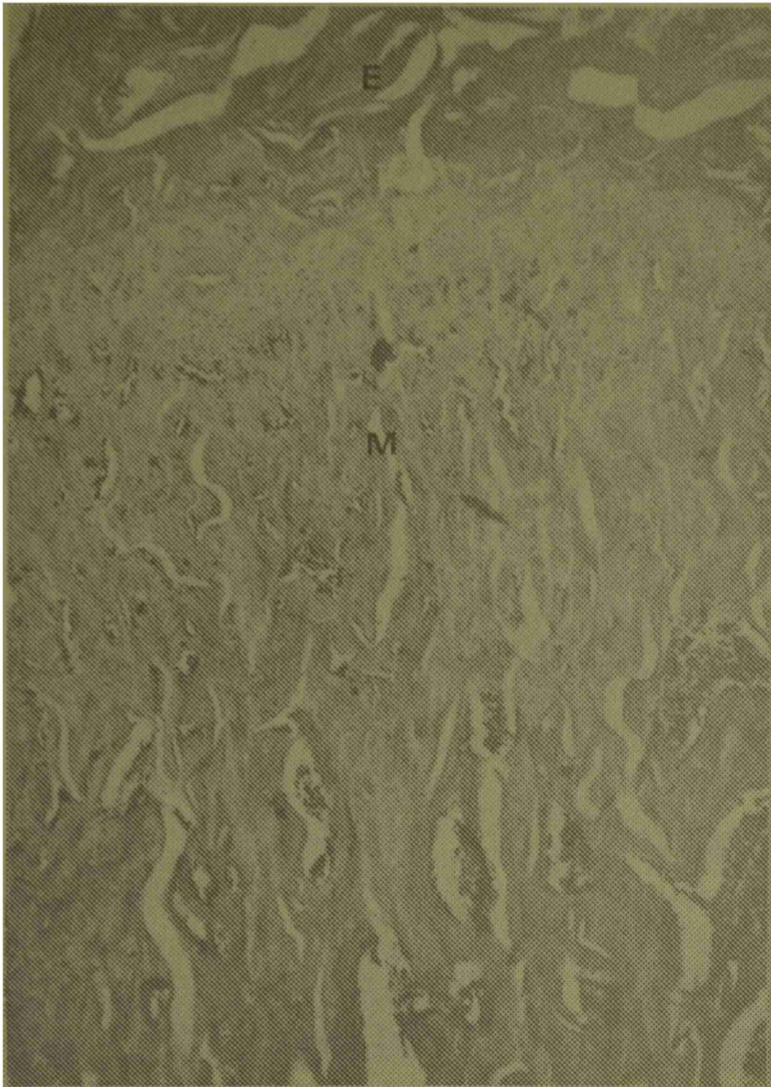
**F. 26 - Rata N° 17 - 14 dosis S.M. : Severa necrosis osteocítica en la metáfisis (flecha) H.E. 250 X.**



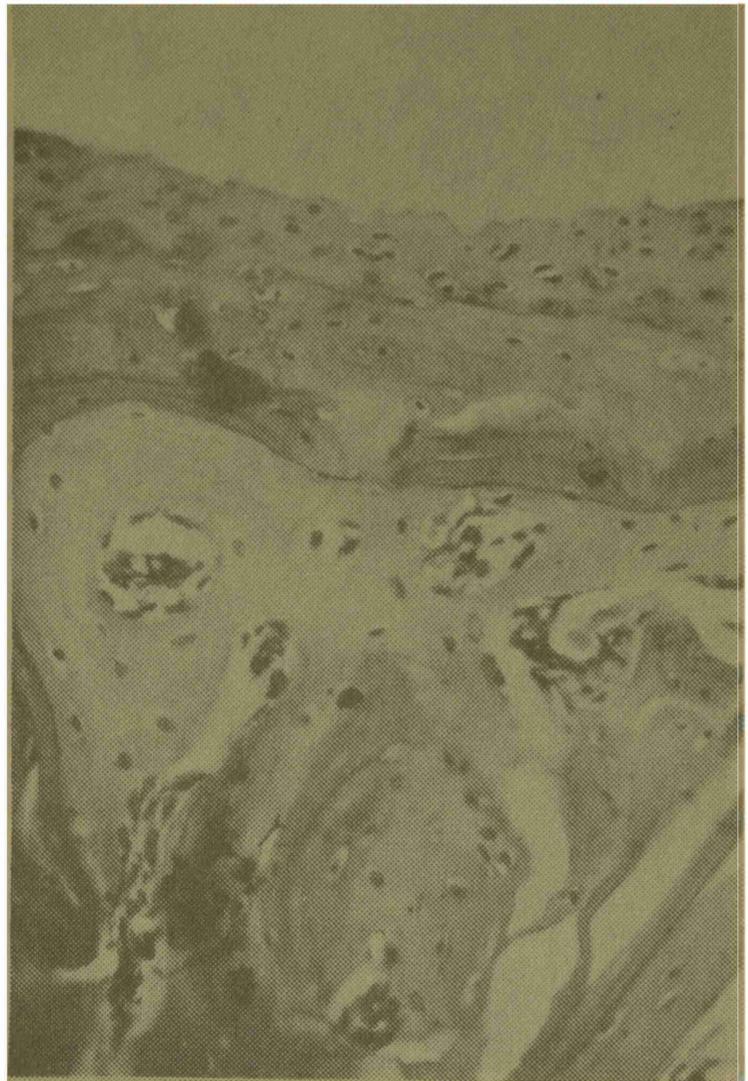
**F. 27 - Rata N° 17 - 14 dosis S.M. : Intensa osteólisis (flecha vert.) y necrosis osteocítica (flecha hor.) H.E. 800 X.**



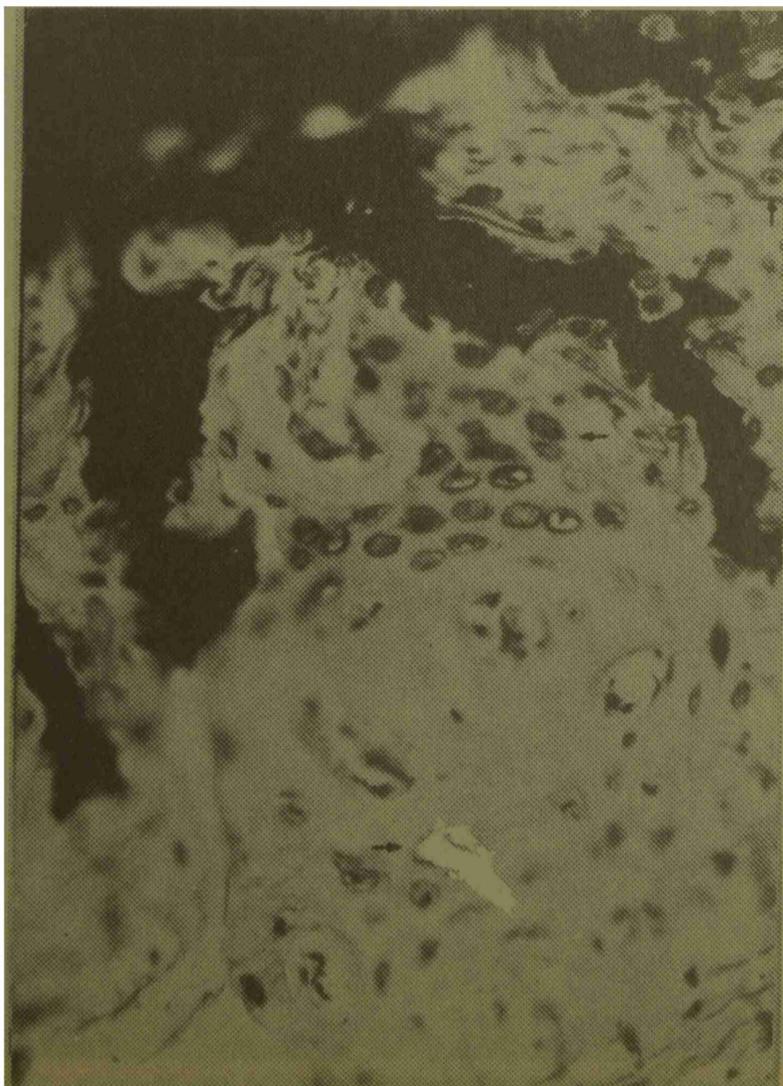
**F. 28 - Rata N° 14 - 21 dosis S.M. : Aumento del tejido trabecular en epífisis (E) y metáfisis (M) H.E. 70 X.**



F. 29 - Rata N° 19 - 21 dosis S.M. : Epífisis (E) metáfisis (M) (compárese con F. 17, 25 y 28). H.E. 70 X.



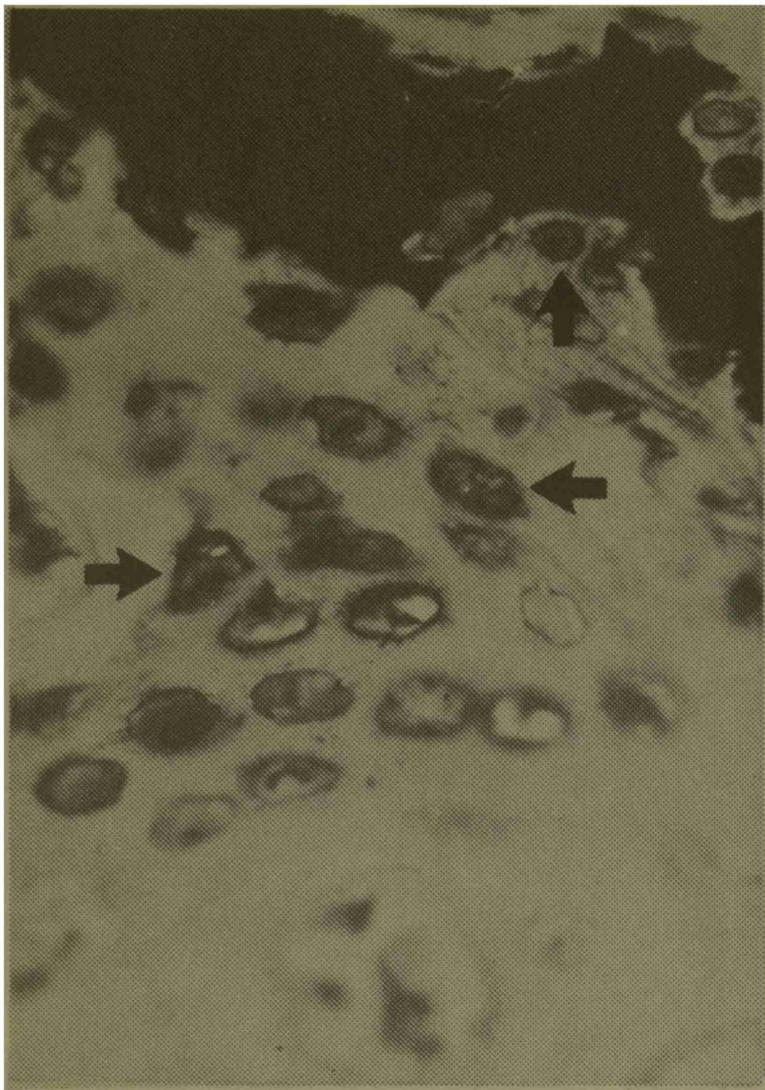
F. 30 - Rata N° 19 - 21 dosis S.M. : Cartílago articular adelgazado y formación de osteonas en la epífisis H.E. 250 X.



F. 31 - Rata N° 19 - 21 dosis S.M. : Necrosis de osteocitos metafisarios (flecha Hor.) Osteolisis (flecha vert.) Azul Tol. 250 X.



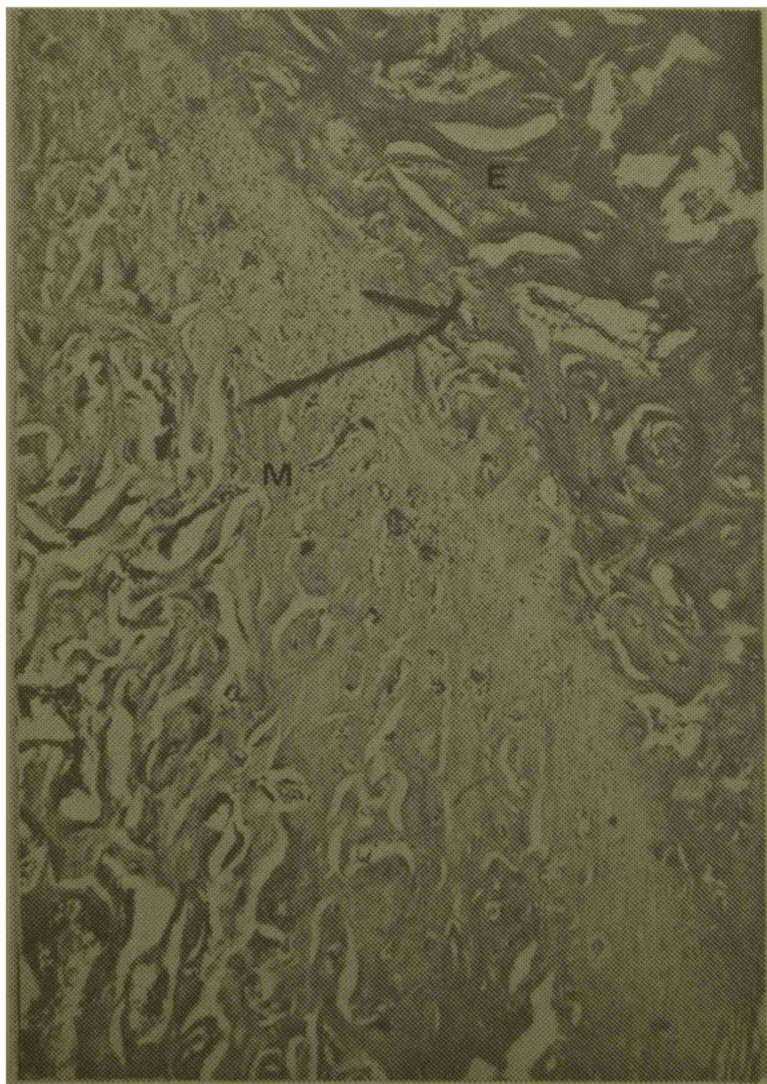
F. 32 - Rata N° 19 - 21 dosis S.M. : Osteocitos necróticos (flechas horiz.) y osteo y condrolisis (flecha vert.) H.E. 800 X.



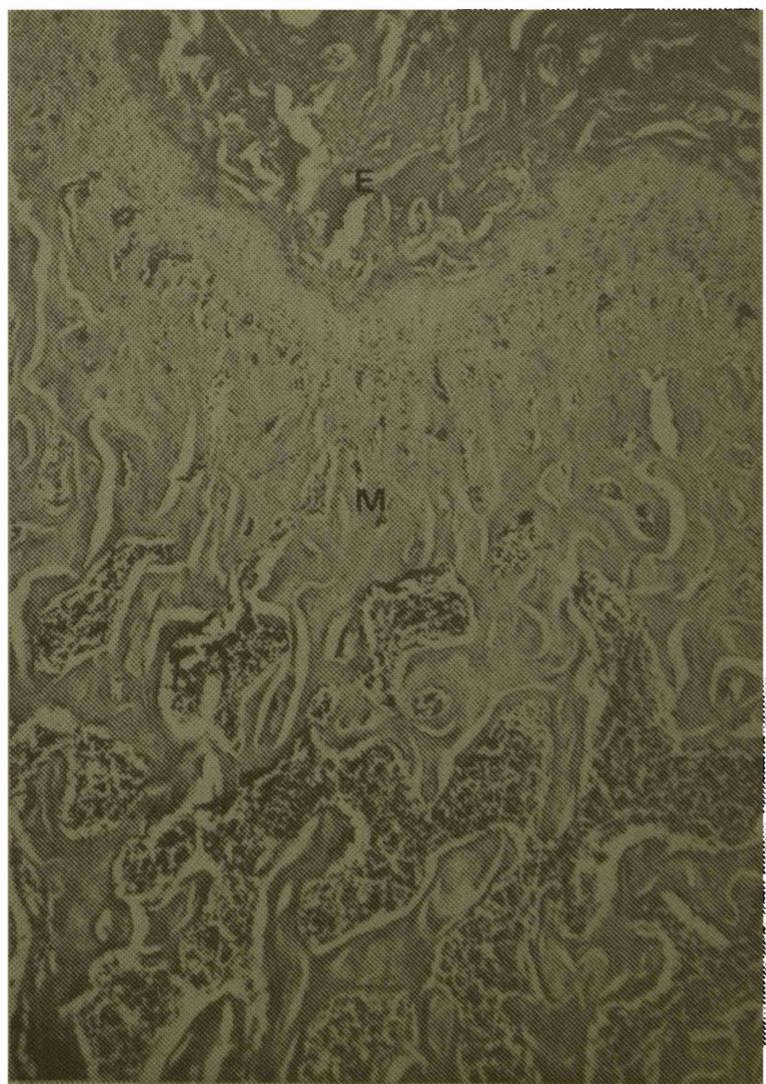
**F. 33 - Rata N° 19 - 21 dosis S.M. : Condrolisis osteocítica (flecha vert) y necrosis (flechas hor.) Azul Tol. 800 X.**



**F. 34 - Rata N° 14 - 21 dosis S.M. : Prominentes líneas de cementación (flecha obl.) y extensa osteonecrosis (N) H.E. 800 X.**



**F. 35 - Rata N° 12 - 18 dosis S.M. : Incremento de la densidad trabecular en epífisis (E) y metáfisis (M) H.E. 70 X.**



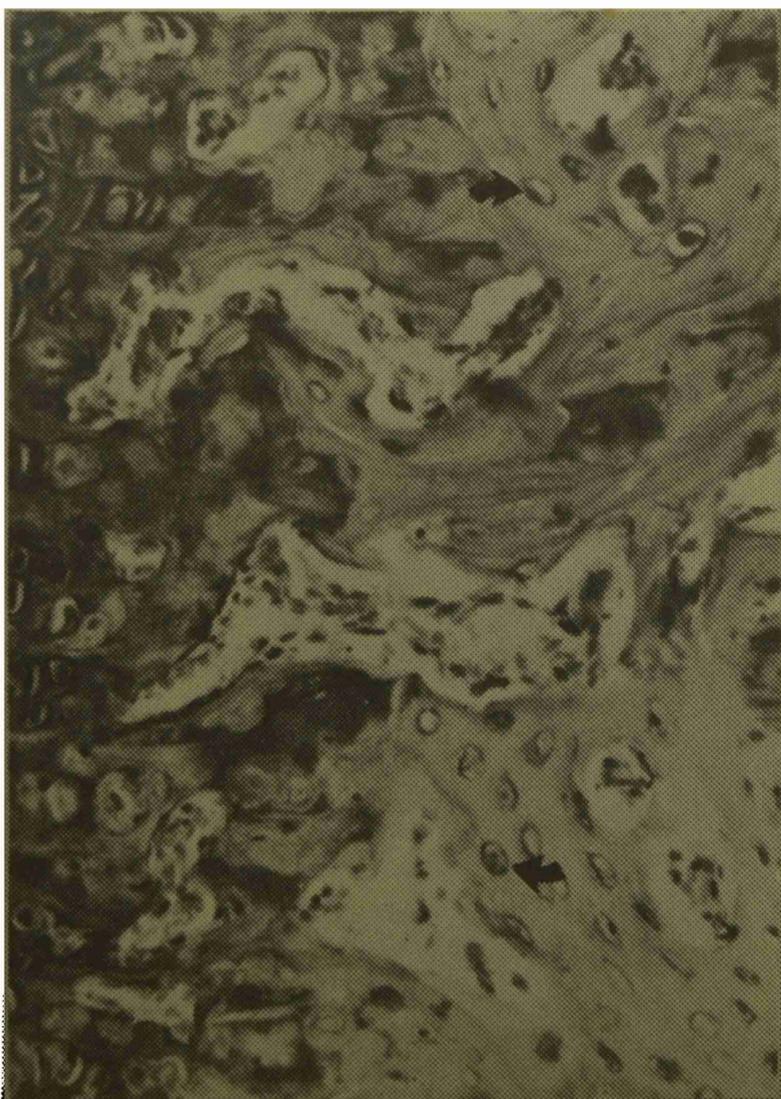
**F. 36 - Rata N° 12 - 28 dosis S.M. : Epífisis (E) Metáfisis (M) (compárese con F. 28 y 29). H.E. 70 X.**



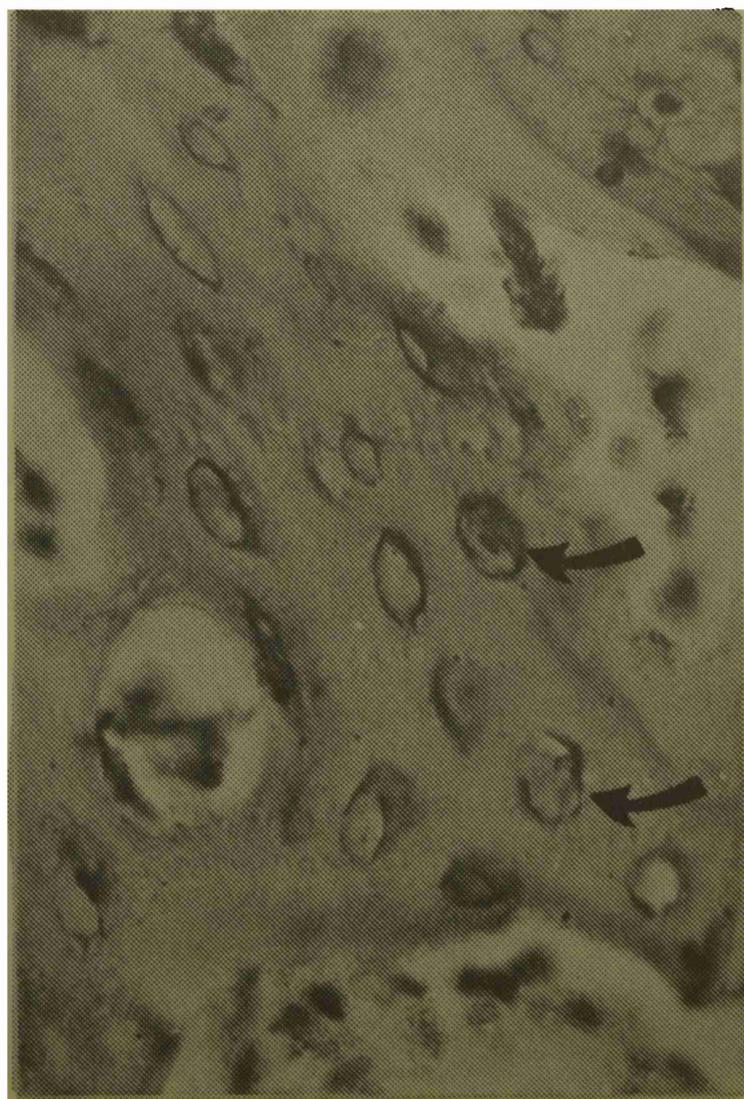
F. 37 - Rata N° 13 - 28 dosis S.M.: Osteocitos necrosados (flechas hor.) y osteoblastos (flecha oblicua). Azul Tol. 250 X.



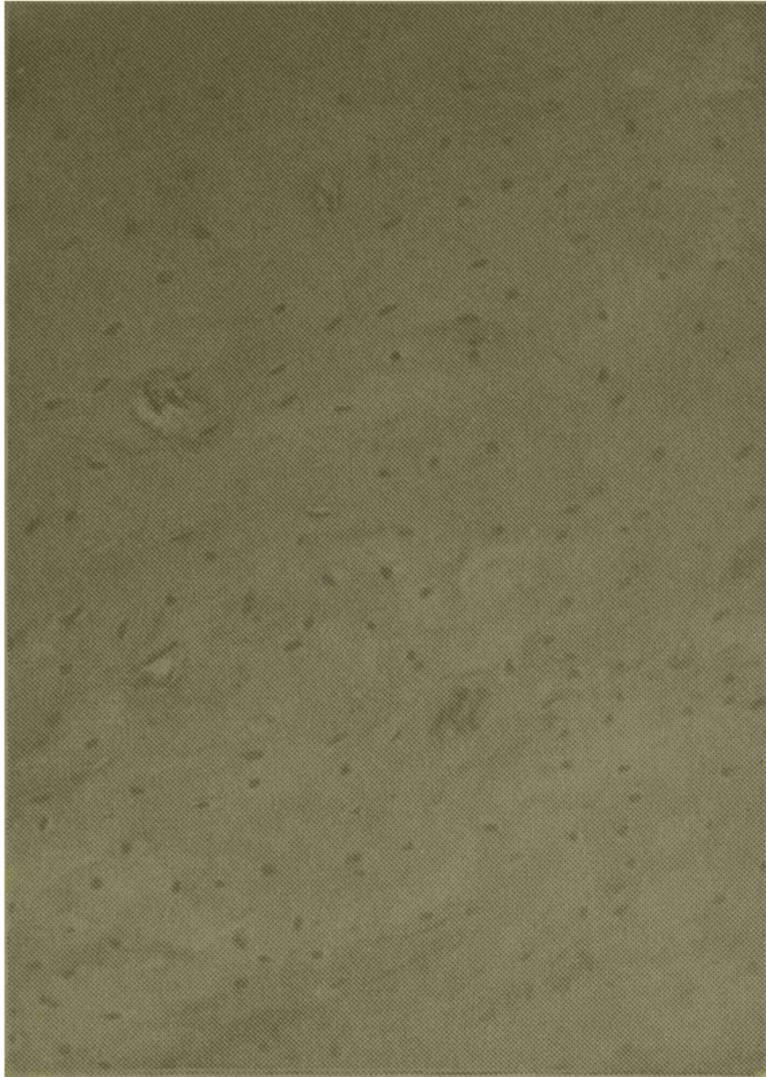
F 38 - Rata N° 13 - 28 dosis S.M.: intensa necrosis osteocítica. Azul Tol. 250 X.



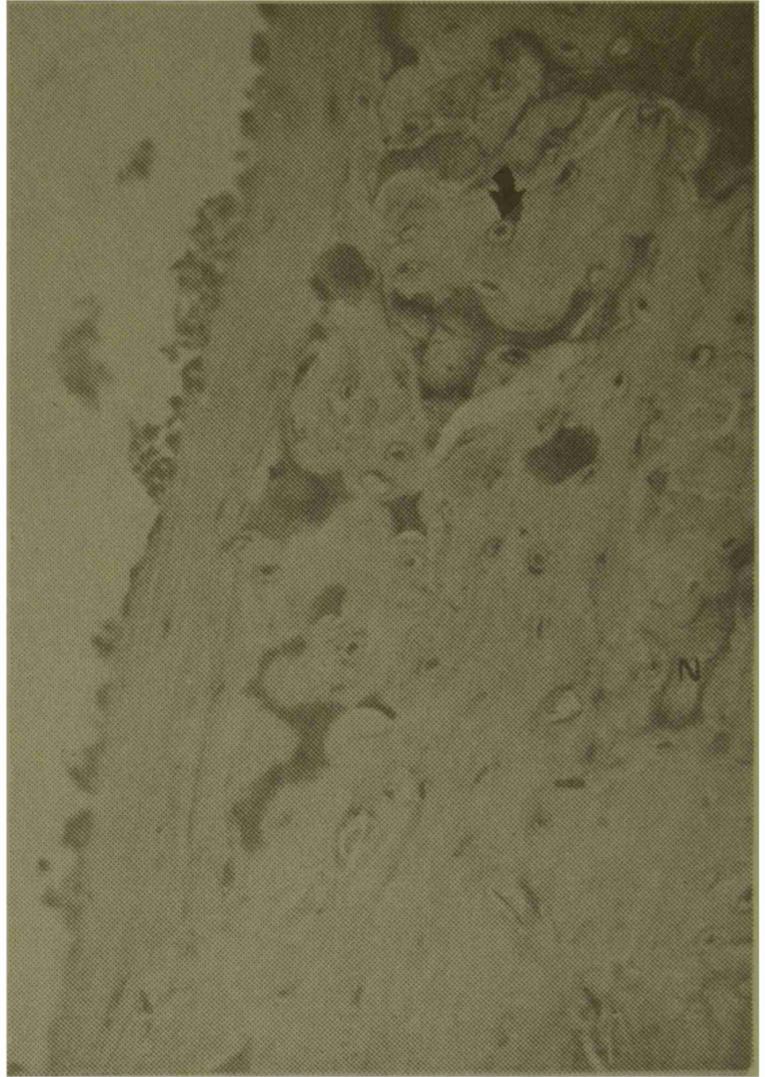
F. 39 - Rata N° 13 - 28 dosis S.M.: Evidente necrosis de osteocitos. H.E. 250 X.



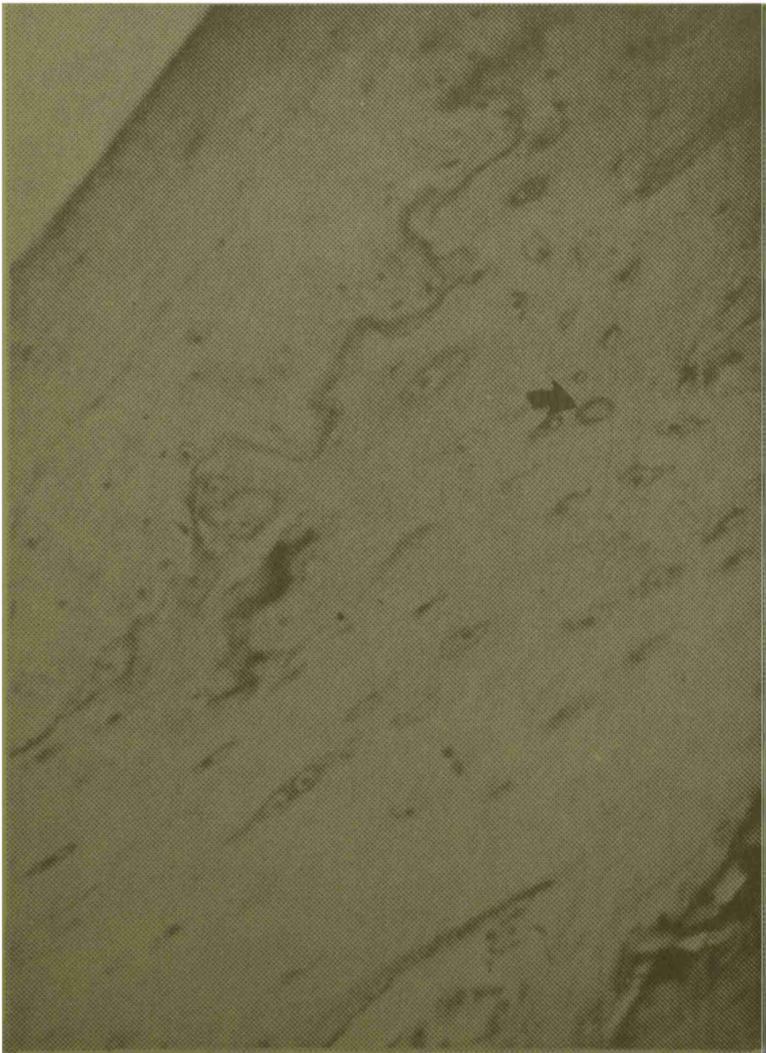
F. 40 - Rata N° 13 - 28 dosis S.M.: Degeneración y muerte de osteocitos trabeculares. H.E. 800 X.



**F. 41 - Rata N° 11 - 48 días sin vitamina D: Hueso diafisario normal. H.E. 250 X.**



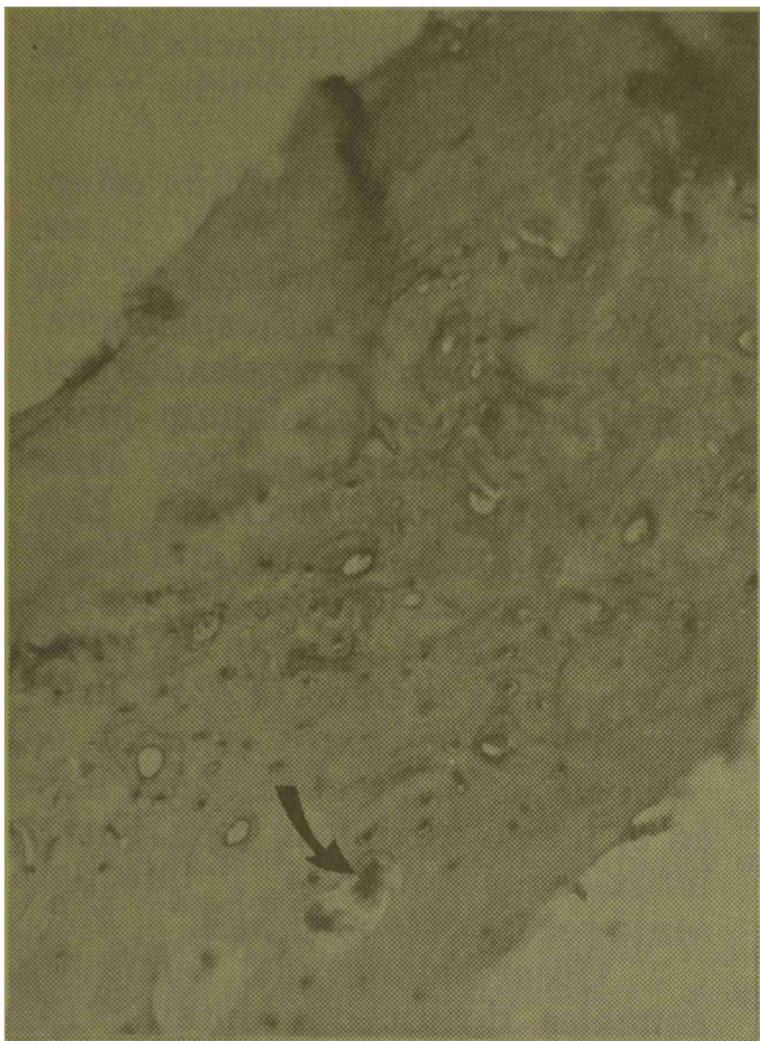
**F. 42 - Rata N° 22 - 7 dosis S.M.: Osteolisis Osteocítica (flecha) y osteonecrosis (N) H.E. 250 X.**



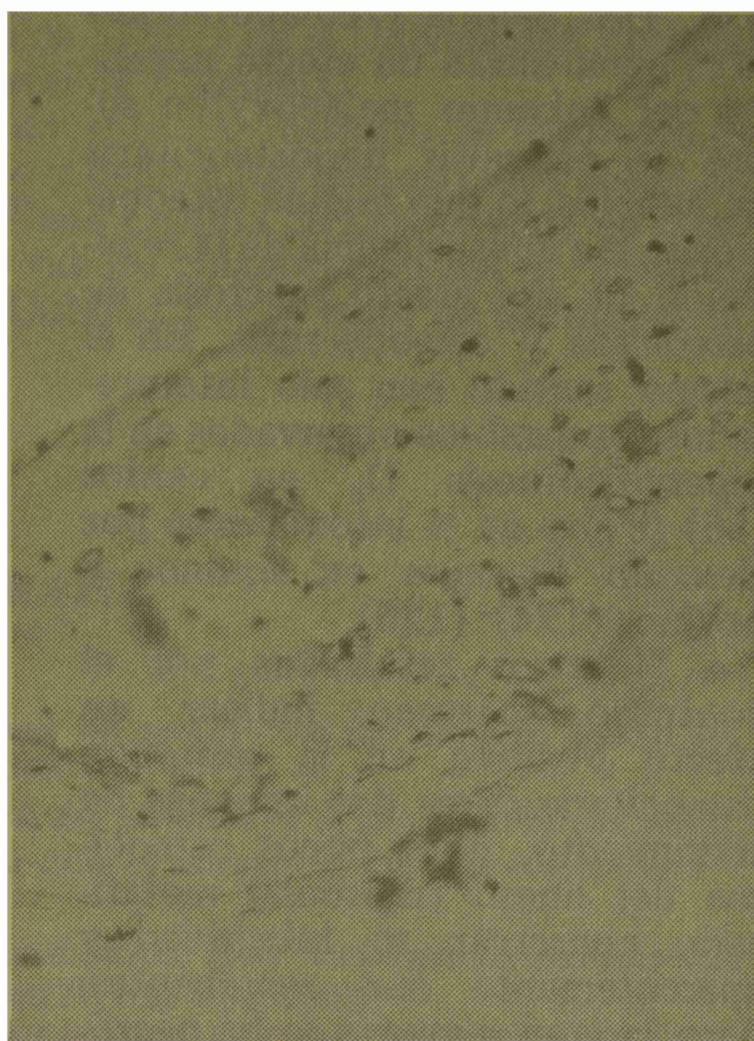
**F. 43 - Rata N° 22 - 7 dosis S.M.: Necrosis osteocítica (flecha) y prominente línea de cementación H.E. 250 X.**



**F. 44 - Rata N° 17 - 14 dosis S.M.: Muerte de osteocitos (flechas) y extensas áreas de osteonecrosis (N) H.E. 250 X.**



F. 45 - Rata N° 13 - 28 dosis S.M.: Osteoclasia (flecha) y abundantes líneas de cementación H.E. 250 X.



F. 46 - Rata N° 13 - 28 dosis S.M.: Lagunas osteocitarias vacías en su casi totalidad (compárese con F. 41 - Azul Tol. 250 X.

cementación son abundantes (foto N° 45). La necrosis osteocítica es muy severa con 14 dosis

(foto N° 44) y más aún con 21 o 28 dosis (foto N° 46).

### DISCUSION

Al igual que en los diversos estudios que ya comentáramos (B,III,c), los resultados anteriores coinciden en parte con los hallazgos de otros autores, pero encontramos igualmente diferencias muy llamativas. La falta de lesiones importantes en animales sometidos a carencia de vitamina D, pero con un aporte adecuado de Ca y P; está en concordancia con las investigaciones de Rasmussen (171)

Según Bordier (18) la carencia de vitamina D se acompaña de osteolisis osteocítica en el raquitismo, y de que dosis curativas de vitamina D<sub>3</sub> reducen la osteolisis. En nuestros resultados no observamos signos de raquitismo, no resulta sorprendente en consecuencia, la reducida osteolisis del lote control. Llamativa es sí la circunstancia de que la osteolisis osteolítica aumentó claramente en animales

que habían recibido 7 dosis de S.M. Dos Santos y colaboradores (71) demuestran un efecto negativo del *Solanum malacoxylon* sobre la osteolisis periosteocitaria en conejos, lo que origina osteopetrosis; y a consecuencia de la repetición de ese efecto, necrosis de osteocitos y osteonecrosis. En el mismo sentido han sido interpretados los cambios observados en la hipervitaminosis D<sub>3</sub> en cerdos (56) (97) y en la intoxicación por *Cestrum diurnum* en equinos y bovinos (124) (125).

Nuestros resultados por el contrario, parecen indicar un efecto positivo en la resorción osteocitaria. Tras dos semanas de tratamiento, unos pocos osteocitos del hueso trabecular metafisario conservan su integridad y aparentemente son resorbentes; pero la gran mayoría se ha necrosado debido a estímulo repetido y agotamiento. La falta de osteolisis osteocítica, evidenciada por las abundantes líneas de cementación y la retención de sustancia condroide en el tejido óseo, lleva a la osteopetrosis.

Realmente sorprendente resulta la falta casi total de alteraciones regresivas en osteocitos de las trabéculas epifisarias.

La actividad osteoblástica es discreta pero evidente en las trabéculas y muy activa en la superficie endosteal del hueso compacto; no se observa en consecuencia el efecto negativo del S.M. sobre los osteoblastos que describen otros autores (71). El incre-

mento en la aposición ósea perióstica y endóstica observado, coincide con las investigaciones de Carrillo (33) (35) y Puche y colaboradores (165).

Las zonas de resorción esteoclástica observadas en el hueso compacto, son similares a las descritas por Ousavaplangchai (154) en cobayos intoxicados con vitamina D o con *Solanum malacoxylon*; y coinciden con áreas de evidente osteonecrosis. Este hallazgo es coincidente con la actual interpretación de que los osteoclastos sólo afectan a hueso previamente alterado (122). Curiosamente, en nuestros estudios, la osteoclasia es prácticamente nula en el hueso esponjoso de animales intoxicados con S.M. y que presenta severa osteonecrosis.

Observaciones del femur de animales dosificados durante 14, 21 ó 28 días, muestran neoformación de tejido óseo en las trabéculas, endostio y periostio; y al mismo tiempo evidente rarefacción por osteoclasia del hueso cortical. Pueden coexistir en consecuencia, incremento en la formación y resorción del tejido óseo aún en el mismo hueso.

Existen suficientes pruebas experimentales (B,III,c) sobre un efecto osteolítico directo del S.M. sobre el hueso. No obstante, deben tenerse en cuenta las alteraciones ocasionadas por el S.M. en paratiroides y células parafoliculares (34) (43) (177), y que originan una menor actividad paratiroidea y una aparente hipersecreción de calcitonina.

#### AGRADECIMIENTOS:

No podemos concluir sin agradecer a todos los que, de una manera u otra facilitaron nuestra tarea; y en especial:

Al Prof. Dr. Gerrit Dirksen y por su intermedio a todo el personal docente y no docente de la Segunda Clínica Médica de la Universidad Ludwig-Maximilians en Munich, República Federal de Alemania.

A todo el personal docente y no docente del Instituto de Patología de nuestra Facultad, destacando el cuidado y dedicación demostrados por el Sr. Alfredo Mario Cinelli y la Sra. María Elena Lemma de Larramendy en nuestro laboratorio de Histopatología; y la valiosa colaboración del Sr. Roberto Fantuzzi y de la Sra. Leticia Stein de Oubiñas por su labor de dactilografía.

### BIBLIOGRAFIA

1. Abe, M. and Sherwood, L.M. "Regulation of parathyroid hormone by adenil ey-clase". *Bioch. Biophys, Res. Comm.* 48, 396-401, 1972.
2. Albright, F. and Ellsworth, R. "Studies on the physiology of the parathyroid gland. I. Calcium and phosphorus studies on a case of idiopathic hypoparathyroidism". *J. Clin. Invest.* 7, 183-201, 1929.
3. Anast, C.S.; Moha, J.M.; Kaplan, K.S.L. and Burns, T.W. "Evidence for parathyroid failure in magnesium deficiency". *Science* 177, 606-608, 1972.
4. Anónimo - "El duraznillo blanco y su efecto sobre el enteque seco". *La Nación (Buenos Aires)*, Secc. 3ª - Pág. 5, Sábado 17, noviembre 1979.
5. Arnold, R.M. and Brass, G. "Observations on the morbid anatomy and histology of Manchester Wasting Disease and related conditions in other countries of América". *Am. J. Vet. Res.* 56, 630-639, 1956.
6. Auhagen, E. und Killstede, C. "Die Wirkung des Vitamin D in Abhängigkeit von Dosierrung und Darreichungsart. Versuche an Ratten". *Veter. Mediz Nach.* 3/4 169-176, 1953.
7. Aurbach, G. D. "Isolation of parathyroid hormone after extraction with phenol". *J. Biol. Chem* 234, 3179-3181, 1959.
8. Barros, S.S. de; Pohlenz, J. und Santiago, C. "Zur Kalzinose beim Schafe". *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 77, 346-349, 1970.
9. Basudde, C.D.K. and Humphreys, D.J. "The Effect of the Active Principle of *Solanum malacoxylon* on Rabbits and the Inhibition of its Action by Actinomycin D" *Calcif.*
10. Basudde, C.D.K. and Humphreys, D.J. "The efect of the administration of *Solanum malacoxylon* on the chick". *Res. in Vet. Sc.* 18, 330-331, 1975.
11. Basudde, C.D.K. and Humpreys, D.J. "The vitamin D<sub>3</sub> metabolite-like activity of *Solanum malacoxylon*". *Clin. Endocr.* 5, 109-118, 1976.
12. Bauer, W.C. and Teitelbaum, S.L. "Thyrocalcitonin activity of particulate fractions of the thyroid gland". *Lab. Invest.* 15, 323-325, 1966.
13. Belanger, L.F. and Migicovsky, B.B. "Bone cell formation and survival in H<sup>3</sup> -thymidine-labeled chicks under various conditions". *Anat. Rec.* 145, 385-390, 1963.
14. Bell, N.H. "The effects of glucagon, dibutyryl 3', 5'-adenosine monphosphate and theophylline on calcitonin secretion in vitro". *J. Clin. Inv.* 49, 1368-1373, 1970.
15. Bell, N.H. and Kodicek, E. "Investigations on metabolites of vitamin D in rat bile and partial identification of a major metabolite". *Biochem* 115, 663-666, 1969.
16. Bhattacharyya, M. H. and De Luca, H. F. "Subcelular location of rat liver calciferol-25-hydroxylase". *Arch. Biochem Biophys.* 160, 58-62, 1974.

17. Bolman, R.M.; Cooper, C.W.; Garner, S.C.; Munson, P.L. and Wells, S.A. "Stimulation of gastrin secretion in the pig by parathyroid hormone and its inhibition by thyrocalcitonin", *Endocr.* 100, 1014-1021, 1977.
18. Bordier, J. "Histologische Aspekte des Knochenumbaus". *Triangel* 3, 85-92, 1974.
19. Brighton, C.T. and Hunt, R.M. "The Role of Mitochondria in Growth Plate Calcification as Demonstrated in a Rachitic Model". *The J. Bone and J. Surg.* 60, 630-639 1978.
20. Brown, W.R.; Krook, L. and Pond, W.G. "Atrophic rhinitis in swine. Etiology, pathogenesis and prophylaxis". *The Cornell Vet.* 56, Supp. 1, april 1966.
21. Brumbaugh, P.F. and Haussler, M.R. " $1 \alpha$ , 25-dihydroxychole-calciferol receptors in intestine", *J. Biol. Chem.* 249, 1251-1262, 1974.
22. Brumbaugh, P. F.; Hughes, M.R. and Haussler, M.R. "Cytoplasmic and nuclear binding components for  $1 \alpha$ , 25-dihydroxycholecalciferol in chick parathyroid glands". *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A.* 72, 4871-4871, 1975.
23. Buckle, R.M. R. M.; Care. A.D.; Cooper C.W. and Gitelman, H.J. "The influence of plasma magnesium concentration on parathyroid hormone secretion". *J. Endocr.* 42, 529-534, 1968.
24. Bulman, G.M. "Guata-í, forma correntina del Enteque Seco". *Proy. Rur*, 2, Nro. 25 32, 33, 1970.
25. Bussolati, G. and Pearse, A.G. E. "Immunofluorescent localization of calcitonin in the C. cells of pig and dog thyroid". *J. Endocr.* 37, 205-209, 1967.
26. Campos, C.; Ladizesky, M. and Mautalen, C. "Effect of *Solanum malacoxylon* on the Serum Levels of Calcium and Phosphate in Thyroparathyroidectomized and Rachitic Rats". *Calcif. Tiss. Res.* 13, 245-248, 1973.
27. Capen, C.C.; Cole, C.R. and Hibbs, J.W. "The pathology of hypervitaminosis D in cattle". *Pathol. Vet.* 3, 350-378, 1966.
28. Care, A.D. and Duncan, T. "Age as a factor in the response to thyrocalcitonin secretion". *J. Endocr.* 37, 107-108, 1967.
29. Care, A. D.; Bates, R.F.L. and Gitelman, H.J. "A possible role for the adenyl cyclase system in calcitonin release". *J. Endocr.* 48, 1-15, 1970.
30. Care, A.D.; Bruck, J.B.; Boelkins, J.; Kenny, A.D.; Conway, H. and Anast. C.S. - "Role of pancreozymin-cholecystokinin and structurally related compounds as calcitonin secretagogues". *Endocr.* 89, 262-271, 1971.
31. Care, A.D. and Bates, R.F.L. "Control of secretion of parathyroid hormone and calcitonin in mammals and birds". *Gener. Comp. Endocr. Supp.* 3, 448-458, 1972.
32. Carrazzoni, J. A. "Ganadería Subtropical Argentina", Editorial Hemisferio Sur, Bs. As. 1974.
33. Carrillo, B.J. "The Pathology of Enteque Seco and Experimental *Solanum malacoxylon* Toxicity". Ph. D. Thesis, Davis, University of California, 1971.
34. Carrillo, B.J. "Efecto de la intoxicación de *Solanum malacoxylon* en la morfología de las células parafoliculares de la tiroides". *Rev. Inv. Agrop. INTA*, S. 4, P.A. X, 1, 41-54, 1973.
35. Carrillo, B.J. "Efecto de la intoxicación de *Solanum malacoxylon* en el sistema óseo". *Rev. Inv. Agrop. INTA*, S.4, P.A., X, 2, 65-67, 1973.
36. Carrillo, B.J. y Worker, N.A. "Enteque Seco: arterioesclerosis y calcificación metastática de origen tóxico en animales a pastoreo". *Rev. Inv. Agrop. INTA*, S.4. P.A., IV, 2, 9-30, 1967.
37. Casco, C.; Ferraro, C.; Ladizesky M; Man, Z.; Ghiringhelli, W.; Cabreja, M. and Mautalen, C.A. "Effects of *Solanum malacoxylon* on hypoparathyroidism". In: "Vit. D, Chem. and Clin. aspects related to calcium metab." 759-761, W. de Gruyter Ed. Berlin 1977 (citado por De Vernejoul, 1968).

38. Castillo, L.; Tanaka, Y.; De Luca, H.F. and Ikekawa, N. "On the physiological role of 1, 25, 25-trihydroxyvitamin D<sub>3</sub>" *Min. Electr. Metab.* 1, 198-207, 1978.
39. Cohn, D. H. Hamilton, J.W. "Newer aspects of parathyroid chemistry and physiology". *The Cornell Vet.* 66, 271-300, 1976.
40. Cole, C.R.; Chamberlain, D.M.; Hibbs, J.W.; Pounden, W.D. and Smith, C.R. "Vitamin D poisoning in a cow, from a study on the prevention of parturient paresis" *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 130, 298-299, 1957.
41. Collier, W.A. "Contribución al conocimiento de la enfermedad de los bovinos conocida con el nombre de Entequé". Folleto del Ministerio de Agric. de la Nación, Bs. As. noviembre de 1926.
42. Collier, W.A. "Zur Kenntnis einer als Entequé bezeichneten Krankheit der Rinder in der Provinz Buenos Aires" *Z. für Infektionskrankheiten* 31 (2), 81-92, 1927.
43. Collins, W. T; Capen, C.C. and Döbereiner, J. "Ultrastructural Evaluation of Parathyroids Glands and Thyroid C-cells from Cattle Fed *Solanum malacoxylon*". 34<sup>th</sup> Ann. Proc. Electr. Micr. Soc. Amer., Miami Beach, Florida, Bailey (ed.), 1976.
44. Collip, J.B. "The extraction of a parathyroid hormone which will prevent or control parathyroid tetany and which regulates the level of blood calcium", *J. Biol. Chem.* 63, 395-438, 1925.
45. Collip, J.B. and Clark, E.P. "Further studies on the physiological action of a parathyroid hormone". *J. Biol. Chem.* 64, 485-507, 1925.
46. Cooper, C.W.; Chwesinger, W.H.; Outjes, D.A.; Mahgoub, A.M. and Munson, P.L. "Stimulation of secretion of a pig thyrocalcitonin by gastrin and related hormonal peptides". *Endocr.* 91, 1079-1089, 1972.
47. Cooper, C.W.; Obie, J.F.; Toverud, S.U. and Munson, P.L. "Elevate serum calcitonin and serum during suckling in the baby rat". *Endocr.* 101, 1657-1664, 1977.
48. Copland, J.W. "Enzootic calcinosis of cattle in Papua New Guinea". *Austr. Vet. J.* 51, 326, 1975.
49. Copp, D.H. "Calcium and phosphorus metabolism". *Amer. J. Med.* 22, 275-285, 1957.
50. Coop, D.H. "Endocrine control of calcium metabolism". *J. Endocr.* 43, 137-161, 1969.
51. Coop, D.H.; Davidson, A.G. F. and Cheney, B.A. "Evidence for a new parathyroid hormone which lowers blood calcium". *Proc. Can. Fed. Biol. Soc.* 4, 17, 1961.
52. Cramer, C.F. "Participation of parathyroid gland in control of calcium absorption in dogs". *Endocr.* 72, 192-196, 1963.
53. Chase, L.R. and Slatopolsky, E. "Secretion and metabolic efficacy of parathyroid hormone in patients with severe hypomagnesemia". *J. Clin. Endocr.* 38, 363-371, 1974.
54. Chen, T.C. and De Luca, H.F. "Stimulation of (<sup>3</sup>H) uridine incorporation into nuclear RNA of rat kidney by vitamin D metabolites". *Arch. Bioch. Biph.* 156, 321-327, 1973.
55. Chertow, B.S.; Baylink, D.J.; Wergedal, J.E.; Su, M.H. and Norman, A.W. "Decrease in serum immunoreactive parathyroid hormone in rats and in parathyroid hormone secretion in vitro by 1,25-dihydroxycholecalciferol". *J. Clin. Inv.* 56, 668-678, 1975.
56. Chineme, C.N.; Krook, L. and Pond, W.G. "Bone pathology in hypervitaminosis D. An experimental study in young pigs". *The Cornell Vet.* 66, 387-412, 1976.
57. Chu, L.L. H.; Mac Gregor, R.R.; Anast, C.S.; Hamilton, J.W. and Cohn, D.V. "Studies on the biosynthesis of rat parathyroid hormone: Adaptation of the parathyroid gland to dietary restriction of calcium". *Endocr.* 93, 915-924, 1973.
58. Dämmrich, K. "Experimentelle D<sub>3</sub> Hypervitaminose bei Ferkel". *Zbl. Vet. Med. A.* 10, 322-349, 1963.

59. Dämmrich, K. "Zur formalen Pathogenese der Systemerkrankungen des Skeletts bei Tieren". *Berl. Munch. Tierärztl. Wschr.* 83, 106-112, 1970.
60. Dämmrich, K.; Dirksen, G. und Plank, P. "Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. 3. Skelettveränderungen". *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 77, 342-346, 1970.
61. Dämmrich, K.; Döbereiner, J.; Done, S.H. und Tokarnia, C.H. "Skelettveränderungen nach Vergiftungen mit *Solanum malacoxylon* bei Rindern". *Zbl. Vet. Med. A.* 22, 313-329, 1975.
62. Davis, G.K.; Camberos, H.R. and Djafar, M.I. "Nutritionally Induced Soft Tissue Calcification". *Fed. Meet. Acad. Sci., Atlantic City, 1968* (Citado por Köhler y col, 1970).
63. De Luca, H.F. "The role of vitamin D. and its relationship to parathyroid hormone and calcitonin". *Recent Progr. Horm. Res.* 27, 479-516, 1971.
64. De Luca, H.F. "Parathyroid hormone as a trophic hormone for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, the metabolically active form of vitamin D". *New Engl. J. Med.* 287, 250-253, 1972.
65. De Luca, H. F. "The kidney as an endocrine organ for the production of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, a calcium-mobilizing hormone". *New Engl. J. Med.* 189, 359-365, 1973.
66. De Luca, H.F. and Schnoes, H.K. "Metabolism and mechanism of action of vitamin D". *Ann. Rev. Bioch.* 45, 631-666, 1976.
67. De Vernejoul, M.C.; Mautalen, C.A. et Miravet, L. "Le *Solanum malacoxylon*: de la plante toxique à l'agent thérapeutique". *Nouv. Press. Med.* 7, 1941-1943, 1978.
68. Dirksen, C.; Plank, P.; Spieß, A.; Hänichen, T. und Dämmrich, K. "Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. 1. Klinische Beobachtungen und Untersuchungen". *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 77, 321-338, 1970.
69. Dirksen, G.; Plank, P.; Dämmrich, K. und Hänichen, T. "Das klinische und pathologisch-anatomische Bild einer enzootischen Kalzinose bei Rind". *Veter. Med. Nachr.* 2/3, 199-214, 1971.
70. Döbereiner, J. und Dämmrich, K. "Skelettveränderungen bei Rindern nach Vergiftungen mit *Solanum malacoxylon* Sendtner". *Verh. Dtsch. Ges Path.* 58, 323-326, 1974.
71. Dos Santos, M. N.; Nunes, V.A.; Nunes, I.J.; Barros, S.S.; Wasserman, R.H. and Krook, L. "*Solanum malacoxylon* toxicity: inhibition of bone resorption". *The Cornell Vet.* 66, 565-588, 1976.
72. Dufresne, L.R. and Gitelman, H.J. "Calcium, Parathyroid Hormone and the Calcitonins". R. V. Talmage and P. L. Munson, Eds. *Excerpta Medica, Amsterdam, 1972* (Citado por Care, 1972).
73. Eckell, O.A.; Gallo, G.G.; Martín, A.A. y Portela, R.A. "Observaciones sobre el entequ seco de los bovinos". *Rev. Fac. C. Vet. La Plata.* 2 (6), 193-211, 1960.
74. Fahrenkrug, J.; Hornum, I.; Rehfeld, J.F. "Effect of calcitonin on serum gastrin concentration and component pattern in man". *J. Clin. Endocr. Metab.* 41, 194-152, 1975.
75. Feußner, H. "Untersuchungen Über die Brauchbarkeit der Röntgendiagnostik zur Erkennung der enzootischen Kalzinose des Rindes". *Vet. Med. Diss., München, 1977.*
76. Fischer, J.A.; Oldham, S.B.; Sizemore, G.W. and Arnaud, C.D. "Calcium regulated parathyroid hormone peptidase". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 2341-2345, 1972
77. Fischer, J.A.; Blum, J.W. and Binswanger, U. "Acute parathyroid hormone response to epinephrine in vivo". *J. Clin. Invest.* 52, 2434-2440, 1973.
78. Foster, G.V.; Doyle, F.H.; Bordier, P. and Matrajt, H. "Effect of thyrocalcitonin on bone". *Lancet.* 2, 1428-1431, 1966.
79. Fraser, D.R. and Kodicek, E. "Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite". *Nature* 228, 764-766, 1970.

80. Frost, H.M. "Mathematical elements of lamellar bone remodelling". Thomas Springfield, Ill. 1964. (Citado por Bordier, 1974).
81. Garel, J.M.; Care, A.D. and Barlet, J.P. "A radioimmunoassay for ovine calcitonin: an evaluation of calcitonin secretion during gestation, lactation and foetal life" *J. Endocr.* 62, 497-500, 1974.
82. Gallo, G.G.; Paoli, A.R.J.; Galofré, E.J.; Torres Moreno, A.; Iseas, F. y Pereyra H. "Tratamiento del entequo seco en bovinos con ficocoloides quelatados aplicados parenteralmente". *Rev. Med. Vet.* 51, 3-12, 1970.
83. Gill, B.S.; Singh, G.; Malkiat, A. and Chopra, A.K. "Enzootic calcinosis in sheep: clinical signs and pathology". *Amer. J. Vet. Res.* 37, 545-552, 1976.
84. Gilmer, W.S. "Hueso y huesos". En: Brunson J.G.; Gall, E.A. y colab. "Patología Humana", Ed. Interamericana, México 1975.
85. Gimeno, E.J. "Estudio histopatológico del entequo seco experimental en ratas y revisión bibliográfica de las calcinosis". Tesis, Fac. C. Vet. Univ. Nac. de La Plata, 1977. Resumen en: *Analecta Veterinaria* 10 (1), 55-93, 1977.
86. Gimeno, E.J. "Controles hormonales del metabolismo del calcio" (en prensa en *Gaceta Veterinaria*, Bs. As. 1979).
87. Grand, R. J. and Gross, P. R. "Independent stimulation of secretion and protein synthesis in rat parathyroid gland". *J. Biol. Chem.* 5608 - 5615, 1969.
88. Gray, T. K. and Munson, P. L. "Thyrocalcitonin: Evidence for physiological function". *Science* 166, 512 - 514, 1969.
89. Guillemin, R. and Gerich, J. E. "Somatostatin: physiological and clinical significance". *Ann. Rev. Med.* 27, 379 - 390, 1976.
90. Haas, G. M.; Treuhart, R. E.; Taylor, C. B. and Stumpe, M. "An experimental histologic study of hypervitaminosis D". *Amer. J. Pathol.* 34, 395 - 413, 1958.
91. Haas, H. G. "Calciumhormone". In: Siegenthaler, W. u. a.; "Klinische Pathophysiologie", 3. Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1976.
92. Ham, A. W. "Tratado de Histología". Ed. Interamericana, México, 1975.
93. Hamilton, J. W., and Cohn, D. V. "Studies on the biosynthesis in vitro of parathyroid hormone. I. synthesis of parathyroid hormone by bovine parathyroid gland slices and its control by calcium". *J. Biol. Chem.* 244, 5421 - 5429, 1969.
94. Hänichen, T.; Dirksen, G. und Plank, P. "Gewebsverkalkungen bei Schlachttieren unter besonderer Berücksichtigung einer enzootische Kalzinose bei Rind". *Schlacht u. Viehhof Z.* 74, 211 - 215, 1974.
95. Hanson, A. M. "The hydrochloric X of the bovine parathyroid and its phosphotungstic acid precipitate". *Milit. Surg.* 54, 76 - 81, 1924.
96. Hargis, G. K., Willims, G. A.; Reynolds, W. A. Chertow, B. S.; Kukreja, S. C.; Bowser, E. N. and Henderson, W. J. "Effect of somatostatin on parathyroid hormone and calcitonin secretion". *Endocr.* 102, 745 - 750, 1978.
97. Haschek, W. A.; Krook, L.; Kallfelz, F. A. and Pond, W. G. "Vitamin D toxicity. Initial site and mode of action". *The Cornell Vet.* 68, 324 - 364, 1978.
98. Haussler, M. R. and Mc Cain, T. A. "Basic and clinical concepts to vitamin D metabolism and action". *New Engl. J. Med.* 297, 974 - 983 & 1041 - 1050, 1977.
99. Haussler, M. R.; Nagode, L. A. and Rasmussen, H. "Induction of intestinal brush border alkaline phosphatase by vitamin D and identity with Ca-ATPase". *Nature* 228, 1199 - 1201, 1970.
100. Haussler, M. R.; Wasserman, R. H.; Mc Cain, T. A.; Peterlik, M.; Bursac, K. M. and Hughes, M. R. "1,25 - Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> - Glycoside: Identification of a Calcinogenic Principle of *Solanum malacoxylon*". *Life Sciences* 18, 1049 - 1056, 1976.
101. Henry, H. L.; Midgett, R. J. and Norman, A. W. "Regulation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1-hydroxylase in vivo". *J. Biol. Chem.* 249, 7584 - 7592, 1974.

102. Herrath von, D.; Kraft, D.; Offermann, G. und Schaefer, K. "Solanum malacoxylon: eine therapeutische Alternative für 1,25 - Dihydroxycholecalciferol bei urämischen Calciumstoffwechselstörungen?". *Dtsch. Med. Wschr*, 99, 2407 - 2409, 1974.
103. Hirsch, P. F.; Gauthier, G. and Munson, P. L. "Thyroid hypocalcemic principle and recurrent laryngealnerve injury factors affecting the response to parathyroidectomy in rats". *Endocr.* 73, 244 - 252, 1963.
104. Hirsch, P. F.; Voelkel, E. P. and Munson, P. L. "Thyrocalcitonin: hypocalcemic hypophosphatemic principle of the thyroid gland". *Science* 146, 412 - 413, 1964.
105. Hotz, J.; Widmaier, F.; Minne, H. and Ziegler, R. "Serum calcium and gastric secretion in chronic gastric fistula rat: influences of parathyroid hormone and calcitonin". *Europ. J. Clin. Inv.* 1, 486 - 490, 1971.
106. Hotz, J.; Minne, H. and Ziegler, R. "The influences of acute hyper - and hypocalcemia and of calcitonin on exocrine pancreatic function in man". *Res. Exp. Med.* 160, 152 - 165, 1973.
107. Howland, J. and Kramer, B. "Calcium and phosphorus in the serum in relation to rickets". *Amer. J. Dic. Chil*, 22, 105 - 121, 1921. (Citado por Rasmussen, 1969).
108. Hüfner, M.; Hersch, R. D. and Schmidt, H. "The gastrointestinal effects of calcitonin". *Acta Endocr. (Kbh) (Suppl.)* 159, 65, 1972.
109. Hughes, M. R.; Baylink, D. J.; and Gonnerman, W. A. "Influence of dietary vitamin D<sub>3</sub> on the circulating concentration of its active metabolites in the chick and rat". *Endocr.* 100, 799 - 806, 1977.
110. Huldshinsky, K. "Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne". *Dtsch. Med. Wschr.* 45, 712 - 713, 1919.
111. Jubb, K. V. F. y Kennedy, P. C. "Patología de los Animales Domésticos, Ed. Labor S.A., Barcelona, 1973.
112. Kellner, B. "Die weisser Ratten bei Vergiftung mit bestrahltem Ergosterin". *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 288, 491 - 526, 1933. (Citado por Feußner, 1977).
113. Kemper, B.; Habener, J.F.; Mulligan, R.C.; Potts, J.T. and Rich, A. "Pre-parathyroid hormone: a direct translation product of parathyroid messenger RNA". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 3731-3735, 1974.
114. Kingsbury, B.F. "On the fate of the ultimobranchial body within the human thyroid". *Anat. Rec.* 61, 155-173, 1935.
115. Kleeman, C.R.; Rockney, R.E. and Maxwell, M.H. "The effect of parathyroid extract on the renal clearance of diffusible calcium". *J. Clin. Invest.* 37, 907, 1958.
116. Klein, D.C.; Moril, H. and Talmage, R.V. "Effect of thyrocalcitonin, administered during peritoneal lavage, on removal of bone salts and their radioisotopes". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124, 627-633, 1967.
117. Kodicek, E. "The story of vitamin D from vitamin to hormone". *Lancet*, 2, 325-329, 1974.
118. Köhler, H. und Libiseller, R. "Über das Auftreten der sogenannten Weidekrankheit bei Kühen in Osterreich in Zusammenhang mit Düngung und Fütterung". *Zbl. Vet. Med. A.* 17, 289-337, 1970.
119. Kolb, E. "Physiologie des animaux domestiques". Vigot Frères Editeurs, Paris, 1965.
120. Köllieker, A. "Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung für die Entstehung der typischen Knochenformen". Leipzig, Vogel, 1873 (Citado por Ham, 1975 y Brown y col. 1966.)
121. Kraft, D.; von Herrath, D.; Offermann, G. und Schaefer, K. "The effect of Solanum malacoxylon on rachitic bone lesions in the rat". *Med. Klin, u Polikl. der Freien Un Berlin* 18;4, 1975.
122. Krook, L. "Metabolic skeletal diseases" FAO/SIDA Follow up Seminar on Veterinary Pathology, UNAM, México, 1979.

123. Krook, L.; Bélanger, L.F.; Henrikson, P.A.; Lutwak, L. and Sheffy, B.E. "Bone Flow". *Rev. Can. Biol.* 29, 157-167, 1970.
124. Krook, L.; Wasserman, R.H.; Mc Entee, K; Brokken, T.D. and Teigland, M.B. "Cestrum diurnum poisoning in Florida cattle". *The Cornell Vet.* 65, 557-575, 1975.
125. Krook, L.; Wasserman, R.H.; Shively, J.N.; Tashjian, A.H.; Brokken, T.D. and Morton, J.F. "Hypercalcemia and calcinosis in Florida horses: Implication of the shrub *Cestrum diurnum*". *The Cornell Vet.* 65, 26-56, 1975.
126. Kunz, W. "Über den Einfluß von *Solanum malacoxylon* (Sendtner) auf den Kalzium-Phosphor- und Magnesium-Gehalt im Blutserum beim Rind nach parenteraler und oraler Applikation". 9. Congr. Mundial de Buiatría, París, 1976.
127. Kunz, W. "Über den Einfluß von *Solanum malacoxylon* (Sendtner) auf den Kalzium-Phosphor- und Magnesium-Gehalt im Blutserum beim Rind nach parenteraler und oraler Applikation". *Berl. Munch. Tierärztl. Wschr.* 90, 69-72, 1977.
128. Lacy, P.E. "Endocrine secretory mechanisms". *Amer. J. Pathol.* 79, 170-187, 1975.
129. Ladizesky, M.; Cabrejas, M.; Labarrere, C. and Mautalen, C. "Solanum malacoxylon and vitamin D: Comparaison of its antirachitic activity and its effect on the intestinal absorption of calcium in the rat". *Acta Endocr. Panamer.* 5, 71-78, 1974.
130. Lignières, J. "Contribution a l'étude de la pasteurellose bovine connue en Argentine sous les nomes de Diarrhée et d'Enteque". *Bol. Soc. Centr. Med. Vet.* 16, 761 - 792, 1898.
131. Lignières, J. "Arteriosclerosis epidémica en el ovino". *Rev. Zoot., Bs. As.* 4, 1 - 17, 1912.
132. Lignières, J. *Amer. Vet. Res.* 44, 284, 1917.
133. Lindt, S. "D-hypervitaminotische Calcinose bei verschiedenen Tierarten". *Wien. Tierärztl. Wschr.* 148 - 164, 1968.
134. Lloyd, W.; Wells, H.; Walling, M. W. and Kimberg, D. V. "Stimulation of bone resorption in organ culture by satsfree extracts of *Solanum glaucophyllum*". *Endocr. Res. Comm.* 2, 159 - 166, 1975.
135. Lynd, F. T.; Wilers, E. B.; Weight, L. A. and Gebauer, P. "Bovine arterioesclerosis in Hawali". *Amer. J. Vet. Res.* 26, 1344 - 1349, 1965.
136. Mac Callum, W. G. and Voegtlin, C. "On the relation of tetany to the parathyroid gland and to calcium metabolism". *J. Exper. Med.* 11, 118 - 151, 1909.
137. Mac Intyre, I. "Calcitonin: recent advances". *Memoir of the Soc. for Endocr.* 19, Cambridge University Press, 1971.
138. Martin, T. J.; Robinson, C. J. and Mac Intyre, I. "The mode of action of thyrocalcitonin". *Lancet* 1, 900, 1966.
139. Mautalen, C. A. "Mecanismo de acción del *Solanum malacoxylon* en el consejo". *Rev. Arg. de Endocr. Metab.* 17, 1 - 18, 1971.
140. Mautalen, C. A. "Mechanism of Action of *Solanum malacoxylon* Upon Calcium and Phosphorus Metabolism in the Rabbit". *Endocr.* 90, 563 - 567, 1972.
141. Mautalen, C. A.; Ferraro C.; Cabrejas, M.; Landi, E. and Gotlieb, D. "Effects of *Solanum malacoxylon* on calcium metabolism pin patients with chronic renal failure". *Calcif. Tiss. Res.* 225, 534 - 537, 1977.
142. Mellanby, E. "An experimental investigation on rickets". *Lancet* 1, 407 - 412, 1919.
143. Milhaud, C.; Perault - Staub, A. M., and Staub, J. F. "Diurnal variation of plasma calcium and calcitonin in the rat". *J. Physiol.* 222, 559 - 563, 1972.
144. Moorhead, J. F.; Humphreys, D. J.; Varghese, Z.; Basudde, C. D. K.; Jenkins, M. V. and Wells, M. R. "Studies on vitamin D-like action of *Solanum malacoxylon*". *Vit. D and Probl. related to Uremic Bone Dis.* W. Gruyter Co., Berlin - New York, 1975.

145. Moriarty, C. M. "Role of calcium in the regulation of adhypophysialhormone release". *Life Sci.* 23, 185 - 194, 1978.
146. Neumann, F.; Nobel, T. and Klopfer, U. "Calcinosis in goats". *J. Comp. Pathol.* 83, 343 - 350, 1973.
147. Neumann, F.; Nobel, T. and Bogin, E. "Enzootic calcinosis in sheep and C-cells hyperplasia of the thyroid". *The Vet. Rec.* 29, 364 - 366, 1977.
148. Nicolayssen, R. N. and Eeg - Larsen, N. "The biochemistru and physiology of vitamin D". *Vit and Horm.* 11, 29 - 60. 1953.
149. Nicholson, T. F. "The mode and site of renal action of parathyroid extract in the dog". *Can. J. Physiol. Pharmac.* 37, 114 - 117. 1959.
150. Norman, A. W. "Gegenwertige Vorstellung zum biocjemischen Wirkungsmechanismus von Vitamin D". *Münch. Med. Wschr.* 116, 1585 - 1598, 1974.
151. Norman, A. W. and Henry, H. "1,25 dihydroxycholecalciferol a hormonally active form of vitamin D<sub>3</sub>". *Rec. Progr. Horm. Res.* 30, 431 - 473, 1974.
152. Olavarría, C. "Ensayo de control de *Solanum malacoxylon* (n. V. Duraznillo Blanco)". *Agencia Ext. Rural INTA, Gral. Madariaga*, 1975.
153. Okada, E. A.; Carrillo, B. J. and Tilley, M. *Solanum malacoxylon* Sendther: A Toxic Plant in Argentina". *Economic Botany* 31, 225 - 236, 1977.
154. Ousavaplangchai, L. "Vergleichende Untersuchungen zur Histopathologie der Intoxication mit Vitamin D<sub>3</sub> und *Solanum malacoxylon* bei Meerschweinchen". *Diss., Wien*, 1972.
155. Paillard, F.; Ardillou, R.; Malendin, H. and Fillastre, J. P. "Renal effects of salmon calcitonin in man". *J. Clin. Med.* 80, 200 - 216, 1972.
156. Paoli, A. R. J.; Gallo, C. G.; Galofré, E. J.; Portillo, A. G.; Torres moreno, A.; Iseas, F. y Cassagne, M. "Estudio preliminar sobre tratamiento terapéutico del Enteque Seco en bovinos". *Rev. Fac. C. Vet. La Plata* 10 (22), 39 - 53, 1968.
157. Patt, H. and Luckhardt, R. "Relationship of a low calcium to parathyroid secretion". *Endocr.* 31, 384 - 392, 1942.
158. Payne, J. M. "The cause and prevent of milk fever". *Veter. Rec.* 79, Suppl. 1 - 11, 1967.
159. Pearse, A. G. E. Common cytochemical and ultraestructural characteristics of cells producing polypeptide hormones (the APUD series) and their relevance to thyroid and ultimobranchial C cells and calcitonin". *Proc. Roy. Soc.* 170, 71 - 80, 1968.
160. Pearse, A. G. E. and Cavalheira, A. F. "Cytochemical evidence for an ultimobranchial origin of rodent thyroid C cellat". *Nature.* 214, 929 - 930, 1967.
161. Pileggi, V.J.; De Luca, H.F. and Steenbock, H. "The role of vitamin D and intestinal phytase in the prevention of rickets in rats on cereal diets". *Arch. Bioch, Bioph.* 58, 194 - 204, 1955.
162. Ponchon, G. and De Luca, H.F. "The role of the liver in the metabolism of vitamin D". *J. Clin. Inv.* 48, 1273 - 1274, 1969.
163. Potts, J.T.; Niall, H.D.; Keutmann, H.T.; Brewer, H.B. and Deftos, L.J. "The amino acid sequence of porcine thyrocalcitonin". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 1321-1328, 1968.
164. Puche, R.C. and Locatto, M.E. "Effects of *Solanum malacoxylon* on Embrionic Bone in vitro and on Isolated Mitochondria". *Calc. Tiss. Res.* 16, 216-219, 1974.
165. Puche, R.C.; Locatto, M.E.; Ferretti, J.L.; Fernández, M. C.; Orsatti, M.B. and Valenti, J.L. "The Effects of Long Term Feeding of *Solanum malacoxylon* to Growing Rats on Ca, Mg, P and Bone Metabolism". *Calc. Tiss. Res.* 20, 105 - 119, 1976.
166. Puche, R.C.; Faienza, H.; Valenti, J.L.; Juster, G.; Osmentti, G.; Hayase, K. and Dristas, J.A. "On the Nature of Arterial and Lung Calcifications Induced in Cattle by *Solanum glaucophyllum*". *Calcif. Tiss. Res.* 26, 61 - 64, 1978.

167. Rasmussen, H. "The influence of parathyroid function upon the transport of calcium in isolated sacs of rat small intestine". *Endocr.* 65, 517-519, 1959.
168. Rasmussen, H. "Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate". *Science* 170, 404-412, 1970.
169. Rasmussen, H. "Die hormonale Steuerung der Knochenzell-funktion". *Triangel*, 3, 103 - 110, 1974.
170. Rasmussen, H. and Craig, L.C. "Purification of parathyroid hormone by counter-current distribution". *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 5003-1959.
171. Rasmussen, P. "The action of vitamin D deficiency on bone tissue and the epiphyseal plate in rats given adequate amounts of calcium and phosphorus in the diet" *Arch. Oral Biol.* 14, 1293 - 1304, 1969.
172. Rasmussen, P. "Calcium deficiency, pregnancy and lactation in rats". *J. Period. Res.* 12, 491-499, 1977.
173. Recklinghausen von, F. "Über Rachitis und Osteomalacie". Jena: Fischer, 1910. (Citado por Brown y col. 1966.)
174. Robinson, C.H.; Martin, R.J. and Mac Intyre, I. "Phosphaturic effect of thyrocalcitonin". *Lancet* II, 83-84, 1966.
175. Rowland, G.N. "Microradiographic evaluation of bone in response to changes in calcium homeostasis". *Diss. Abstr. Int.* 32, B, No. 3, 1926, 1971 (Citado por Feußner, 1977).
176. Ruager, J. Observación personal
177. Ruager, J.; Iturriza, F.C. and Martin, A.A. "Nuclear Vacuolization of the Parafollicular Cells of the Thyroid Gland in a Curious Disease of Bovines" *Rev. Arg. Endocr. Metab.* 16, 159 - 164, 1970.
178. Ruager, J. y Gimeno, E.J. "Enteque Seco en equinos, caprinos y ovinos". *Gaceta Vet.* 39, 597 - 599, 1977.
179. Schäffer, E. "Histomorphologische Skelettbefunde bei einem Hund mit Hypervitaminosis D<sub>3</sub>". *Die Kleintierpr.* 18, 154 - 159, 1973.
180. Simonite, J.P.; Morris, K.L.M. and Collins, J. "Induction of bone resorption by an extract of *Solanum malacoxylon*". *J. Endocr.* 68, P. 18, 1976.
181. Simonnet, G.; Moura, A.M.; Bagdiantz, A. and Blanquet, P. "Calcitonin diuretic effect in the rabbit". *Horm. Metab. Res.* 10, 347 - 452, 1978.
182. Smith, R. and Stern, G. "Muscular weakness in osteomalacia and hyperparathyroidism". *J. Neurol Sci.* 8, 511 - 520, 1969.
183. Spiazzi, R.B. Comunicación personal a J. Ruager, 1977.
184. Spieß, A. "Weitere Beobachtungen über Wesen und Verlauf der enzootischen Kalzinose des Rindes". *Disa*, Gießen, 1974.
185. Stern, P.H.; Ness, E.M. and De Luca, H.F. "Responses of Fetal Rat Bones to *Solanum malacoxylon* in vitro: A Possible Explanation of Previous Paradoxical Results" *Mol. Pharm.* 14, 357 - 365, 1978.
186. Stöber, M. "Hypokalzämische Gebärlähmung". In: Rosenberger, G. u.a. "Krankheiten des Rindes". Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1970.
187. Tarrés, M.C.; Liborio, M.M.; Juster, G.; Osmentti, G. y Puche, R.C. "Evaluación de la incidencia del enteque seco en la provincia de Santa Fe y del perjuicio involuocrado". *Rev. Med. Vet.* 58, 387-397, 1977.
188. Taylor, A.N. "Chick brain calcium-binding protein: Comparison with intestinal vitamin D-induced calcium-binding protein". *Arch. Bioch. Bioph.* 161, 100-108, 1974.
189. Tucker, G.; Gagnon, R.E. and Haussler, M.R. "Vitamin D<sub>3</sub>-25-hydroxylase: tissue occurrence and apparent lack of regulation". *Arch. Bioch. Bioph.* 155, 47 - 57, 1973.
190. Tustin, R.; Piennar, C.; Fand, J.; Schmith, J.; van der Walt, K.; Boyazoglu, P. and Boom H. "Enzootic calcosinosis in sheep in South Africa". *J.S. Afr. Vet. Ass.* 44, 383-395, 1973.

191. Uribe, A.; Holick, M.F.; Jorgensen, N.A. and De Luca, H. "Action of *Solanum malacoxylon* on Calcium Metabolism in the Rat". *Bioch. Res. Comm.* 58, 257 - 262, 1974.
192. Walling, M.W.; Kimberg, D.V. ; Lloyd, W.; Procsal, D.; Wells, H. and Norman, A.W. "*Solanum glaucophyllum* (Malacoxylon): An apparent source of a water-soluble, functional and structural analogue of 1 alfa, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>". *Vit. D and Probl. related to Uremic Bone Dis.*, W. Gruyter & Co, Berlin - New York, 1975.
193. Wasserman, R.H. "Metabolism, function and clinical aspects of vitamin D". *Cornell Vet.* 65, 3-25, 1975.
194. Wasserman, R.H. "Active Vitamin D-Like Substances in *Solanum malacoxylon* and other Calcinogenics Plants". *Nutr. Rev.* 33, 1-5, 1975.
195. Wasserman, R.H. and Taylos, A.N. "Die Physiologische Bedeutung des Vitamin-D-abhängigen calciumbindenden Proteins". *Triangel*, 12, 119-127, 1974.
196. Wasserman, R.H.; Krook, L. and Kirksen, G. "Evidence for anti-rachitic activity in the calcinogenic plant *Trisetum flavescens*". *The Cornell Vet.* 67, 333-350, 1970.
197. Weinmann, J.P. and Sicher, H. "Bone and Bones". 2nd. ed., C. V. Mosby Co., St. Louis, 1955. (Citado por Gilmer, 1975 y Krook, 1979).
198. Weisbrode, S.E.; Capen, C.C. and Nagode, L.A. "Fine Structural and Enzymatic Evaluation of Bone in Thyroparathyroidectomized Rats Receiving Various Levels of Vitamin D". *Lab. Invest.* 28, 29-37, 1973.
199. Wells, H. and Lloyds, W. "Possible involment of cyclic AMP in the actions of thyroid Hormone and Calcitonin, 332 - 333, Eds. Talmage and Bèlanger. Amsterdam: Excerpta Med. Found, 1967 (Citado por Copp, 1969).
200. Worker, N.A. and Carrillo, B.J. "Calcification and Wasting in Grazing Animals in the Argentine". *Nature*, 215, 72 - 74, 1967.
201. Zerwekh, J.E.; Lindell, T.J. and Haussler, M.R. "Increased intestinal chromatin template activity: influence of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and hormone-receptor complexes". *J. Biol. Chem* 251, 2388 - 2394, 1976.
202. Ziegler, R. "Calcitonin-Eine Ubersicht nach 10 Jahren". Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974.
203. Ziegler, R.; Telib, M. and Pfeiffer, E.F. "The secretion of calcitonin by the perfused ultimobranchial gland of the hen". *Horm. Metab. Res.* 1, 39-40, 1969.
204. Ziegler, R.; Delling, G. and Pfeiffer, E.F. "The secretion of calcitonin by the perfused ultimobranchial Gland of the hen". 2nd. Symp on Calcitonin and the C-Cells, London, 1969. Heinemann, 301-310, London, 1970.
205. Ziegler, R.; Bellwinkel, S.; Schmidtchen, D. and Minne, H. "Effects of hypercalcemia, hypocalcemia and calcitonin on glucagon stimulated insulin secretion in man". *Horm. Metab. Res.* 4, 60, 1972.