

Análisis Biomecánico del Callo Óseo en Fracturas Experimentales Tratadas con Xenoinjerto de Hueso Marino (*Sepia Officinalis*)

Trabajo de Fín de Año - Ganador del 2º Premio - Jornadas "Tres Épocas"

Diciembre, 2000 - Caracas

Dr. Leopoldo García G.,* Dr. Gerson Molina J.,* Dr. Eduardo Francis S.**

Dr. Leopoldo García G., Dr. Gerson Molina J. **Análisis Biomecánico del Callo Óseo en Fracturas Experimentales Tratadas con Xenoinjerto de Hueso Marino (*Sepia Officinalis*).**

Revista Venezolana de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Vol. 33, Nº 1, Marzo 2001.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la finalidad de estudiar una nueva variante de xenoinjerto (hueso de *Sepia Officinalis*), con el fin de demostrar la integración estable, confiriéndole características biomecánicas similares a las del hueso sano en defectos óseos experimentales creados en el 1/3 medio del fémur de animales de experimentación (conejos).

La investigación se llevó a cabo en un periodo de 4 meses (mayo - agosto del 2000), durante el cual se realizó estudios clínicos y radiológicos que nos permitieron apreciar la integración estable del injerto de hueso marino. Al poseer confirmación clínico-radiológica de esta integración se procedió a sacrificar los animales de experimentación con el fin de obtener las muestras necesarias para realizar los estudios pertinentes.

Posteriormente mediante el uso de una prensa electromecánica se procedió a realizar una serie de estudios biomecánicos de precisión que permitieran conocer las características propias del callo desarrollado posterior a la implantación del hueso marino. Dicho estudio demostró que en aquellos especímenes tratados con hueso marino aumentó la elasticidad y por tanto la ductibilidad del hueso tratado. En cuanto a la resistencia del callo postimplante, este demostró poseer características similares a las del hueso sano, lo que nos per-

mitió inferir que el implante de *Sepia Officinalis* además de integrarse totalmente adquirió las características de un hueso sano o de neoformación del huésped.

Se concluye que esta nueva alternativa de xenoinjerto tiene amplias posibilidades de aplicación en la cirugía ortopédica y traumatológica, así como en otras especialidades médicas tales como la odontología y la cirugía plástica, siendo además económica, de fácil acceso, manejo y sin incremento de la morbilidad.

PALABRAS CLAVE

Callo óseo, Fracturas, Xenoinjerto, Hueso Marino.

ABSTRACT

A new variable of Kenograft was studied bone from *sepia officinalis* was used.

Our conclusion is that there exists a great possibility of use of this Xenograft with advantages in relation to cost, handling and obtention, without morbidity.

KEY WORDS

Bone Callus, Fractures, Kenograft, Seabone.

INTRODUCCIÓN

El hombre con la llegada del nuevo milenio se ha visto expuesto con mayor frecuencia a accidentes de

diferente índole, ocasionando grandes y diversas lesiones traumáticas y entre ellas las más frecuentes e incapacitantes; las fracturas, las cuales se acompañan en la mayoría de los casos por pérdidas importantes de la masa ósea. La prevención de estos defectos óseos es un problema que se plantea frecuentemente, motivo por el que los cirujanos utilizan distintas técnicas quirúrgicas y una amplia gama de materiales para sustituir al hueso faltante. Estos materiales pueden ser de origen animal, mineral o bien de síntesis. Todos ellos deben ser biocompatibles, es decir; atóxicos, inertes des-

* Instituto Venezolano de los Seguros Sociales, Hospital General del Este "Dr. Domingo Luciani", Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología.

** Docente. Servicio de Cirugía, Ortopedia y Traumatología, Hospital General del Este "Dr. Domingo Luciani".

de el punto de vista inmunitario y no deben ser carcinogénicos. Además tienen que favorecer o inducir una respuesta en el tejido óseo, tener buenas propiedades mecánicas y ser reabsorbibles en mediano plazo.²

Motivado a esta necesidad aparecen los diversos tipos de injertos como alternativas para corregir los defectos óseos y permitir de esta manera la incorporación precoz del individuo a sus actividades habituales. Como resultado de estas investigaciones y estudios aparecen en un principio dos grandes grupos de injertos de material óseo, denominados autoinjertos por ser obtenidos a partir del mismo individuo y los llamados aloinjertos obtenidos de cadáveres humanos, los cuales posteriormente al ser sometidos a procesos de histocompatibilidad son almacenados en los llamados bancos de huesos desde donde son trasladados a diversas partes del mundo para su utilización.^{2,8}

Por diversos motivos entre los cuales figuran: costos, acceso a la población mundial, alta tasa de morbilidad, etc., estos dos tipos de injertos no han alcanzado el éxito y la popularidad deseada, motivo por el cual los científicos han volcado su atención e investigación en los injertos obtenidos de otras especies a los cuales se le llamó xenoinjertos, entre ellos los de ternera, coral marino, etc., muchos de los cuales han sido ya utilizados en cirugía facial y otras especialidades quirúrgicas obteniendo resultados satisfactorios.⁴

Con el advenimiento de nuevas y mejores técnicas de investigación se han descubierto y estudiado otras fuentes de los llamados aloinjertos como lo son las algas marinas, los corales y entre otras la *Sepia Officinalis* (Jibia) que ha demostrado poseer un endoesqueleto, consistente en una lámina rica en carbonato de calcio, matriz fundamental para la estructuración del hueso.^{1,3,5} La *Sepia Officinalis* (jibia) es una especie que habita en aguas del Mediterráneo, el Norte de África, Océano Índico y Australia con predilección a aguas tropicales o templadas y que usualmente migran a aguas profundas durante el invierno. Actualmente es cultivada en el National Resource Cephalopods Center (N.R.C.C.) en Galveston - Texas donde se estudian los cefalópodos en general (calamares, pulpos, sepias y nautilus) para estudios biomédicos, especialmente tópicos relacionados con la neurofisiología, ya que se ha probado su adaptación al laboratorio así como su fácil manejo y traslado, por lo cual han utilizado a esta especie para obtener información mediante estudios fisiológicos, farmacéuticos y de comportamiento.^{6,7,9,10,11} En otros lugares, su carne, muy parecida en consistencia al calamar,

es utilizada como alimento para el hombre (Asia, India, Italia y España).¹²

Desde Asia el hueso en su forma natural es importado a nuestro país en cantidades importantes a un bajo costo para diversos usos: especialmente veterinario, como suplemento de calcio para aves domésticas y de adorno. La observación detallada de éste desde 1997,⁴ nos condujo a estudiarla como una alternativa posible de xenoinjerto.

En 1999 se demostró su viabilidad en animales de investigación para integrarse en defectos óseos;³ proponiéndonos ahora en nuestro trabajo estudiar y determinar las características biomecánicas del callo óseo que se forma a continuación a su implante en una zona de fractura, con el cual queremos evaluar o comparar su similitud con el hueso sano para dar la estabilidad deseada y permitir recuperar la función del miembro afectado.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GENERALES:

Estudiar la integración estable del injerto de Hueso obtenido de la *Sepia Officinalis*, como alternativa para la reparación ad integrum en defectos óseos.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estudiar clínica y radiológicamente las bondades del uso de hueso de *Sepia Officinalis*.
- Estudiar mediante pruebas biomecánicas la estabilidad y utilidad del callo óseo desarrollado posteriormente al implante de hueso proveniente de *Sepia Officinalis*.
- Estudiar la versatilidad en cuanto al manejo, utilización y obtención del hueso de *Sepia Officinalis* como fuente de xenoinjerto.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales:

Para este estudio experimental se utilizaron 12 conejos de Raza Nueva Zelanda con una media de peso de 3 Kilogramos con edades aproximadas de 2,5 a 3 meses, todos del sexo femenino, los cuales fueron seleccionados del Instituto Nacional de Higiene de la Universidad Central de Venezuela. Se realizaron procedimientos standard para la cuarentena. Los animales fueron enjaulados individualmente en el bioterio de la Fa-

cultad de Medicina, Cátedra de Medicina Experimental de la Escuela José María Vargas de la Universidad Central de Venezuela, a 800 metros sobre el nivel del mar. La habitación en la cual los animales fueron enjaulados permaneció con ventilación natural, una temperatura promedio 27°C +/- 2°C, una humedad (40 +/- 10%) y un foto período de luz natural (luz desde las 06:00 am a 06:00 pm). Antes de iniciar el estudio el anteproyecto fue enviado para su revisión por la Cátedra de Medicina Experimental, quien a su vez informa de tales procedimientos a la Sociedad Venezolana de Protección Animal.

2. Implantes de Sepia Officinalis:

Los implantes de Sepia Officinalis fueron especialmente preparados por nuestro equipo en la Ciudad de Caracas - Venezuela, mediante protocolo tipo.²⁵ Utilizamos el implante en cilindros de 0,5 mm de ancho por 5 a 10 mm de alto para colocar en el canal medular. Además se utilizaron fragmentos de 3 x 2 mm de ancho por 15 a 20 mm de alto para la colocación en la zona peridiafisaria. Antes de la implantación los cilindros de injerto fueron esterilizados mediante el uso del gas Amprolene por 24 horas.

3. Equipos Utilizados:

Para la realización del presente Estudio Experimental se utilizaron los siguientes materiales:

- ✓ Micromotor Eléctrico. Craftsman® 6000 R.P.M.
- ✓ Alimento comercial para conejos envasado en sacos de 20 Kilogramos (Conejarina)
- ✓ Marcador radiopaco metálico (Alambre quirúrgico trenzado de 0.3 mm de espesor)
- ✓ Placas metálicas numeradas en orden ascendente desde el 224 al 235
- ✓ Fuentes luminosas de calor para mantener la temperatura corporal de los conejos
- ✓ Equipo de cirugía menor
- ✓ Campos quirúrgico estériles
- ✓ Suturas: Ácido Poliglicólico (sutura sintética absorbible) calibre 3-0 con aguja curva atraumática T-8, y Nylon (sutura sintética no absorbible) calibre 3-0 con aguja curva cortante C-7. (facilitada por Suministro Médicos Jayor, sutura que posee la certificación ISO 9002, U.S.P. y F.D.A.)
- ✓ Solución yodada (Povidine®)
- ✓ Solución fisiológica al 0.90%
- ✓ Anestésicos: Ketalar® (ketamina), Xilacina
- ✓ Antibióticos: Eriprin® (tylocina 4.4 grs., lactato de trimetropin 1.9 gr., sulfafurazona 8,5 gr.) y Gentamicina en suspensión oftálmica.
- ✓ Gasas estériles

- ✓ Guantes estériles
- ✓ Monos quirúrgicos estériles
- ✓ Cámara fotográfica de 35 mm Nikon® - F50
- ✓ Cámara digital Casio® Q.V. 10
- ✓ Solución de formol al 10%
- ✓ Envases de plástico para transporte de muestra
- ✓ Equipo de Rayos X, Marca Siemens®, 3000 M.A.
- ✓ Equipo de T.A.C. Marca Toshiba®, Modelo Auklet. 200 M.A.
- ✓ Máquina de prueba de fuerza: prensa de ensayos triaxiales. Marca Leonard Farell® tipo 301
- ✓ Videocámara, tipo HandyCam®. Video 8. Sony®

4. Unidades de Apoyo Científico:

- ✓ Bioterio de la Escuela de Medicina "José María Vargas" Universidad Central de Venezuela. Dra. Ángela de Martínez.
- ✓ Departamento de Radiodiagnóstico de Clínica Santa Sofía. Dra. Norma Fiorella. Tec. Radiólogo Carolina Savage
- ✓ INGEOSOLUM C.A. Ing. Leonardo García.

5. Técnica Quirúrgica:

La noche antes del procedimiento quirúrgico la comida le fue retirada a los animales de experimentación, permitiéndoseles libre ingesta de agua. El día de la intervención los animales fueron anestesiados con una inyección intramuscular de Ketamina a dosis de 40 mg/kg/peso, Xilacina a dosis de 5 mg/kg de peso y Atropina a 0,02 mg/kg de peso. Posteriormente se procedió al rasurado del muslo derecho, y se aplicaron todas las normas de asepsia y antisepsia recomendadas por la Unidad de Medicina Experimental del Hospital Vargas.

Seguidamente son trasladados a la mesa operatoria donde se colocan en posición de decúbito lateral izquierdo, colocación de mascarilla con oxígeno a razón de 3 litros/minuto. Se realiza nueva asepsia y antisepsia del muslo derecho y finalmente colocación de campos estériles

Se realizaron incisiones de tipo longitudinal anteroexterna buscando altura standard de 2.5 cm por encima de la articulación de la rodilla. Una vez realizada la incisión en piel se procede a realizar divulsión roma por planos en espacio avascular entre recto anterior y vasto externo, evitando lesionar la vena regional externa del muslo. Se visualiza entonces la cara externa del fémur derecho, se levantó el periostio procediendo a realizar en este momento la apertura mediante motor eléctrico de un orificio de aproximadamente 0.3 x 0.3

cm de diámetro. Inmediatamente se realiza lavado con abundante solución fisiológica al 0.90%. Se mantiene la separación de la masa muscular hacia delante y atrás del hueso mediante la utilización de separadores de Farabeuf, se procedió a implantar los cilindros de *Sepia Officinalis* en el defecto óseo diafisario creado, así como en la periferia. Luego se colocó un marcador metálico radiopaco intradiafisario en el sitio de implantación del cilindro de injerto marino. Se realiza cierre por planos, nueva asepsia y antisepsia. El procedimiento anteriormente descrito se realizó de manera standard en seis conejos que catalogamos como GRUPO EXPERIMENTAL, los cuales fueron marcados con placa metálica numerada en la oreja derecha.

La misma técnica quirúrgica fue realizada en los seis conejos restantes, con la salvedad que **NO** se les colocó injerto de *Sepia Officinalis* (hueso marino) sólo el marcador metálico radiopaco. Este grupo fue llamado GRUPO CONTROL y se les colocó placa metálica numerada en la oreja izquierda.

Durante el postoperatorio los animales se colocaron bajo fuente de calor hasta la recuperación del efecto anestésico para su posterior traslado a las jaulas. Se les administró antibiótico a base de Eriprin® vía oral en dosis obtenida mediante la dilución de 01 sobre de 20 gramos en 01 litro de agua para cumplir un total de 07 días de tratamiento, y manteniendo las condiciones de reclusión similares a las preoperatorias. Se les realizó control clínico diario y evaluación radiológica a las siete y diez semanas del postoperatorio.

6. Recolección de la muestra:

Los animales fueron inmovilizados y anestesiados, siendo sacrificados mediante una sobredosis intramuscular de Esmerol® (Bromuro de Rocuronio). Un conejo se sacrificó a las seis semanas y los otros once a las trece semanas después de la Intervención Quirúrgica. Se desecho un fémur derecho sin injerto por fractura del mismo y otro fémur derecho con injerto por técnica inadecuada de recolección del espécimen, quedando cinco parejas de especímenes para el estudio.

Se realizó tomas de las muestras del fémur derecho e izquierdo conservando un lecho muscular de aproximadamente 0,5 mm de espesor periférico a la zona intervenida, y luego colocados para su preservación en recipientes que contenían Solución de Formol al 10% para su transporte y conservación.

7. Procedimientos realizados sobre la muestra:

Los fémures obtenidos fueron sometidos a evaluación radiológica estándar en equipo Marca Siemens, 300 M.A.

Posteriormente las muestras fueron colocadas en una base de acrílico transparente en forma de T invertida en donde fueron sostenidas mediante gomas elásticas, para la posterior realización de tomografía computarizada, mediante cortes axiales y longitudinales cada 2 mm.

Para el estudio biomecánico de las muestras, el fémur fue colocado en una base cilíndrica de 2.5 pulgadas de diámetro, con el fin de ser ubicado en la máquina generadora de esfuerzos en la que un pistón metálico desciende en forma progresiva sobre la zona afectada del espécimen a una velocidad calculada de 0,52 mm/seg, con una altura promedio de la muestra de 0,906 mm y un área inicial de 1,043 mm². Se incrementa la carga axial hasta que se produce la fractura del espécimen. La máquina permite medir con exactitud el tiempo al cual se produce la fractura y asimismo la cantidad de fuerza que se necesitó para llegar a la misma.

RESULTADOS

Analizamos 12 conejos (todas hembras) con un peso aproximado entre 2 y 3 kilogramos y una edad comprendida entre 2 y 4 meses, en un periodo aproximado de 14 semanas.

De los 12 conejos analizados, 2 fueron descartados de las muestras; 1 por técnica inadecuada de recolección del espécimen y otro por fractura espontánea.

De los 10 conejos restantes no se evidenció clínicamente rechazo del implante. Radiológicamente se observó integración del implante y formación de callo óseo a las 10 semanas del postoperatorio.

La tomografía axial computarizada de las muestras no demostró ser concluyente para analizar la integración del injerto marino en el defecto óseo creado.

A los 20 especímenes (fémures) se les practicó estudio biomecánico colocándoseles en prensa electromecánica que permitiría determinar con exactitud la carga (fuerza) y tiempo necesario para producir una fractura en un sitio determinado.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Esfuerzo necesario para producir la fractura en hueso con defecto y tratado con injerto (Kg/cm ²)	
Número de conejo	Fémur derecho
327	32,61
328	25,94
329	30,75
330	45,35
331	29,20
<i>PROMEDIO</i>	32,77

Esfuerzo necesario para producir la fractura en hueso con defecto y no tratado con injerto (Kg/cm ²)	
Número de conejo	Fémur derecho
332	32,61
333	32,92
334	29,82
335	27,95
337	39,14
<i>PROMEDIO</i>	32,48

Esfuerzo necesario para producir la fractura en hueso sano (Kg/cm ²)	
Número de conejo	Fémur izquierdo
327	36,96
328	33,08
329	32,61
330	35,87
331	36,03
332	35,41
333	43,17
334	32,30
335	33,86
337	29,20
<i>PROMEDIO</i>	34,84

Tiempo necesario para producir la fractura en hueso con defecto y no tratado con injerto (segundos)	
Número de conejo	Fémur derecho
327	185
328	345
329	225
330	215
331	230
<i>PROMEDIO</i>	240

Tiempo necesario para producir la fractura en hueso con defecto y no tratado con injerto (segundos)	
Número de conejo	Fémur derecho
332	285
333	125
334	230
335	200
337	195
<i>PROMEDIO</i>	207

Tiempo necesario para producir la fractura en hueso sano (segundos)	
Número de conejo	Fémur izquierdo
327	165
328	240
329	225
330	240
331	270
332	260
333	174
334	255
335	195
337	135
<i>PROMEDIO</i>	216

CONCLUSIONES

1. El injerto de sepia officinalis (hueso marino) demostró ser inocuo y de fácil integración al huésped.
2. El injerto de sepia officinalis evita la transmisión de enfermedades virales y otras patologías de donante a receptor, además de disminuir la morbilidad intra y postoperatoria.
3. Se comprobó el aumento del tiempo de latencia entre el inicio de la fuerza y la fractura, lo que se puede interpretar como un aumento de la elasticidad del callo: el mismo resiste más tiempo a la fuerza ejercida sobre él antes de fracturarse.
4. Se demostró un aumento de resistencia a la carga mecánica del hueso provisto con implante de Sepia Officinalis en relación al hueso sin injerto.
5. Se demostró la dureza del hueso de sepia officinalis como grado 3.3 en la escala de MOHS.
6. Se demostró la necesidad de transformar el hueso de carbonato de calcio original a hueso de trifosfato de calcio (hidroxiapatita, dureza 5 en escala de MOHS), según metodología descrita anteriormente para con esto obtener resistencia ideal del injerto.
7. El injerto de hueso se incorpora total, dinámica, anatomopatológicamente y radiológicamente.
8. El hueso marino (sepia officinalis) es una alternativa de xenoinjerto nueva, confiable, económica, de fácil disponibilidad, manejo, y que le confiere al callo óseo características biomecánicas similares a las del hueso sano.

RECOMENDACIONES

Se hace necesario profundizar mediante la investigación continua y eficiente las posibilidades reales de esta nueva alternativa de xenoinjerto; objetivo que sólo se logrará con un estímulo adecuado que permita la realización de estudios como el presente.

Debe tomarse en cuenta el hecho de que la mayoría de los injertos de origen comercial poseen un alto costo y son de difícil acceso, por lo que alternativas como la que actualmente presentamos son cada día más valaderas y necesarias en nuestro medio.

Es prioritaria la asignación de profesionales capacitados y recursos técnicos adecuados que permitan impulsar el estudio biomecánico e histopatológico de este tipo de injerto alternativo, aún desconocido en la mayoría de los países del mundo.

Se debe transformar el hueso de carbonato, a trifosfato de calcio, a fin de incrementar la dureza del material resultante. Todo ello de acuerdo a tratamiento termoquímico adicional, ya conocido.

Iniciar estudios de viabilidad en humanos, tanto de la forma actual de carbonato de calcio como la hidroxiapatita que pueda derivarse de su transformación químico-térmica.

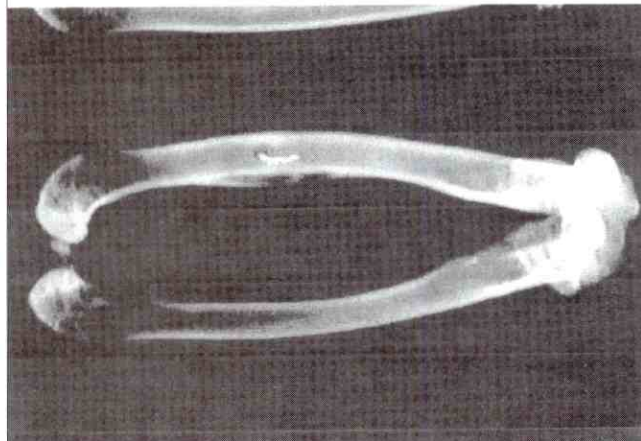
ANEXOS



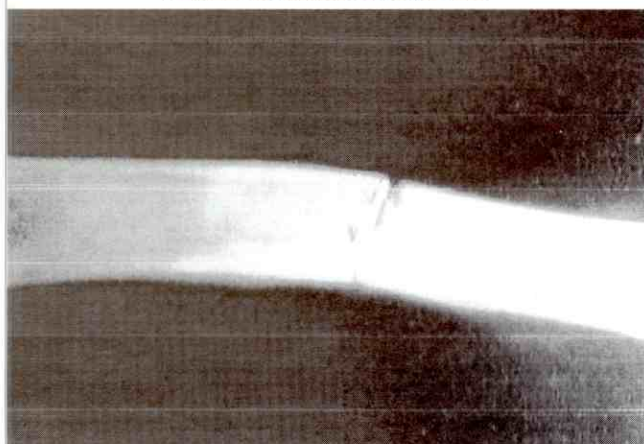
ANEXO III
DETALLE RADIOLÓGICO DEL FÉMUR OSTEOTOMIZADO
CON INJERTO



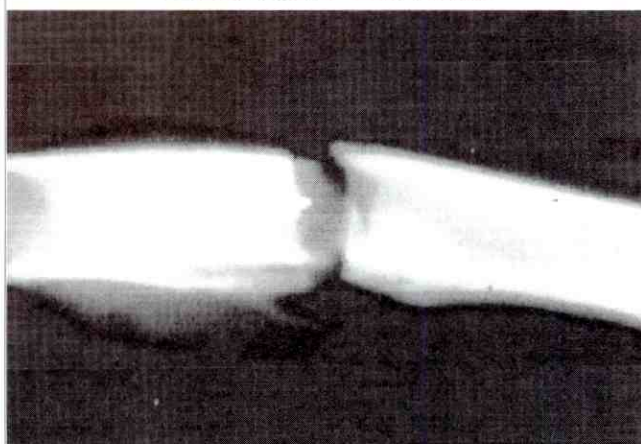
ANEXO IV
RADIOLOGÍA DEL FÉMUR OSTEOTOMIZADO
CON INJERTO



ANEXO V
RADIOLOGÍA DE LA FRACTURA PRODUCIDA EN FÉMUR
OSTEOTOMIZADO SIN INJERTO



ANEXO VI
RADIOLOGÍA DE LA FRACTURA PRODUCIDA EN FÉMUR
OSTEOTOMIZADO CON INJERTO



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Francis, Eduardo; Referencia personal, injertos de Hueso Bovino.
2. Friedlander, G.E., Mankin, H.J., and Sell, K.W.: Osteochondral allografts. Biology, Banking and Clinical applications. Boston Little Brown, 1983.
3. García, A., La Rosa, y Francis, E., Viabilidad del hueso de la sepia officinalis como xenoinjerto en animales de experimentación (tesis presentada ante la S.V.C.O.T. 1999).
4. Kaban, L.B., Mulliken, J.B., Glowacki, J.: Treatment of jaw defects with demineralized bone implants. J. Oral and Maxillofac. Surg., 40:623-626,1982.
5. Martínez González, J. M., Barona Dorado, C., Furió-Bacete, V., Baca Pérez-Bryan, R., Donado Azcárate, A. La hidroxiapatita. en el relleno de los defectos óseos
6. OUP USA: Cephalopod Neurobiology. [URL:hftp://mnemosyne.oup-usa.org/docs/0198547900.html]. OUP Book Cephalopod Neurobiology by Abbott, N. Joan. Última actualización, 02-Sep-1998 Tamaño 4K - en Inglés.

7. OUP USA: Cephalopod Neurobiol [URL:hftp://www.oup-usa.org/gcdocs/gc_0198547900.html]. OUP Book Cephalopod Neurobiology by Abbott, N. Joan. Última actualización 31 -Jul-1998. Tamaño 4K - en Inglés.
8. Salama, R.; Burwell, R.G.; and Dickson, I.R.: Recombined grafts of bone and marrow the beneficial effect upon osteogenesis of impregnating xenograft (heterograft) bone with autologous red marrow. J. Bone and joint surg., 55-B 29.402-417,1973.
- 9 Table of Contents: Cephalopod Neurobiolowgy [UR: http://www.oupusa.org/toc/tc_0198547900.html]. OUP Book Cephalopod Neurobiology by Abbott, N. Joan. Última actualización 31-Jul-1998. Tamaño 6K - en Inglés.
10. The Cephalopod Model. [URL: hftp://www. nrcc.utmb.edu/model.html]. Top [Resources for Researchers] [The Cephalopod Model]. Conta última actualización 28-Aug-1997. Tamaño 4K - en Inglés.
11. The Cephalopod Model. [URL: http://www. nrcc.utmb.edu/model.html]. Top [Resources for Researchers] [The Cephalopod Model]. Conta última actualización 22-Mar-1996. Tamaño 4K - en Inglés.
12. The Cephalopod Model. [URL: hftp://www. nrcc.utmb.edu/model.html]. Top [Resources for Researchers] [The Cephalopod Model]. Conta última actualización 12-Jun-1998. Tamaño 23K - en Inglés.