

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**UTILIZACIÓN DE HUESO XENOGÉNICO COMO ELEMENTO DE
OSTEOSÍNTESIS EN MEDICINA VETERINARIA**

“por”

Valentina Victoria DI SEVO MALLO

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria
MODALIDAD: Revisión Monográfica

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Dr. Alejandro Benech

Presidente de mesa:

Benech

Dr. Alejandro

Segundo miembro (Tutor):

Semiglia

Dr. Gabriel

Tercer miembro:

Dr. Carlos Rodríguez

Cuarto miembro (Co-Tutor)

Dr. Jorge Zunino

Fecha:

15 de Marzo de 2013

Autor:

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada a mi tutor, el Dr. Gabriel Semiglia por su disposición, su paciencia y su apoyo durante la realización de esta revisión monográfica y durante mi carrera.

Al Dr. Jorge Zunino por su co-tutoría y su disposición para este trabajo.

Al personal de biblioteca y hemeroteca por estar a disposición para la búsqueda de material bibliográfico.

A mi familia, por el apoyo y la confianza que me tuvieron durante toda mi carrera.

A mis amigas y compañeras de estudio, que sin ellas hubiese sido muy difícil el llegar hasta aquí.

Al director, docentes y compañeros del Hospital de Veterinaria, especialmente a los integrantes del Perfil quirúrgico de pequeños animales por permitirme acompañarlos durante este tiempo.

A los integrantes de la cátedra de equinos por su apoyo incondicional y su confianza en mi persona.

A una persona muy especial...

A la Prof. Adjunta Carmen Silvia Gallo Muniz, encargada del área de inglés de la Facultad de Veterinaria, por la traducción del resumen del español al inglés.

A mis amigas y amigos de la vida, y aquellos que fui cosechando a lo largo de mi carrera.

Y a todas aquellas personas que capaz hoy no están conmigo pero que hicieron su aporte para que esto fuese posible.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
1. <u>RESUMEN</u>	7
2. <u>SUMARY</u>	8
3. <u>INTRODUCCIÓN</u>	9
4. <u>DESCRIPCIONES GENERALES DEL TEJIDO ÓSEO</u>	11
4.1. ANATOMO-FISIOLOGÍA DEL SISTEMA ESQUELÉTICO.....	11
4.1.1. <u>Células del tejido óseo</u>	14
4.1.2. <u>Factores de crecimiento</u>	15
4.1.3. <u>Células mesenquimales troncales de la médula ósea</u>	16
5. <u>FRACTURAS Y REPARACIÓN ÓSEA</u>	17
5.1. ANATOMO-FISIOLOGÍA DE LAS FRACTURAS.....	17
5.2. CLÍNICA DE LAS FRACTURAS.....	18
5.3. REPARACIÓN DE LAS FRACTURAS.....	22
5.3.1. <u>Osificación primaria</u>	22
5.3.2. <u>Osificación secundaria</u>	23
5.4. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LAS FRACTURAS.....	26
5.4.1. <u>Placas de osteosíntesis</u>	28

5.4.1. <u>Clavos intramedulares</u>	29
6. <u>ESTRATEGIAS DE REPARACIÓN DEL HUESO</u>	31
6.1. OSTEOINDUCCIÓN – OSTEOCONDUCCIÓN.....	33
6.2. OSTEOSÍNTESIS BIOLÓGICA.....	35
7. <u>INJERTOS E IMPLANTES ÓSEOS</u>	36
7.1. CONCEPTOS.....	36
7.2. INJERTOS E IMPLANTES ÓSEOS AUTOGÉNICOS, ALOGÉNICOS, SINGÉNICOS Y XENOGÉNICOS.....	37
8. <u>IMPLANTES XENOGÉNICOS</u>	38
8.1. PROCESAMIENTO DE IMPLANTES XENOGÉNICOS.....	40
8.2. HUESO XENOGÉNICO COMO MATERIAL DE OSTEOSÍNTESIS.....	42
9. <u>RELEVAMIENTO DE TRABAJOS EXPERIMENTALES</u>	45
9.1. INJERTOS USADOS PARA LLENAR DEFECTOS ÓSEOS.....	45
9.2. INJERTOS USADOS COMO ANDAMIOS.....	46
9.3. FORMACIÓN DE NUEVO HUESO A PARTIR DE INJERTOS XENOGÉNICOS.....	47
9.4. LOS INJERTOS XENOGÉNICOS Y LA REACCIÓN INMUNE.....	48
9.5. IMPLANTES XENOGÉNICOS UTILIZADOS COMO MÉTODOS DE FIJACIÓN DE FRACTURAS.....	49
10. <u>DISCUSIÓN</u>	54
11. <u>CONSIDERACIONES FINALES</u>	56
12. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	57

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Descripción	Página
Figura N°1: Esquema de un sector de hueso largo.....	13
Figura N°2: Fuerzas a las que son sometidas los huesos.....	27
Figura N°3: Imagen hueso xenogénico envasado pronto para su uso.....	42
Figura N°4: Fotografía representando un hueso fracturado y el clavo intramedular xenogénico.....	44
Figura N°5: Fotografía representando un hueso fracturado y su fijación combinando el implante xenogénico y fijadores metálicos.....	44
Tabla N°1: Escala de claudicación.....	19
Tabla N°2: Signos radiográficos de cicatrización ósea secundaria.....	21
Tabla N°3: Tiempo aproximado para alcanzar la unión clínica de una fractura diafisaria no complicada.....	31
Tabla N°4: Evolución del caso N°1.....	52
Tabla N°5: Evolución del caso N°2.....	53

1. RESUMEN

En el presente trabajo nos proponemos realizar una puesta a punto (revisión bibliográfica) de los diferentes métodos de osteosíntesis que utilizan implantes biológicos xenogénicos y su utilización en el perro y el gato, con el fin de conseguir la estabilización de fracturas de los huesos largos y su aplicación. Hablaremos de las ventajas y desventajas que ofrecen estos métodos y las características que deben de tener para lograr la biocompatibilidad con el órgano receptor. Finalmente concluimos que con un adecuado procesamiento y desantigenización, los injertos óseos xenogénicos son una opción a considerar para el tratamiento de fracturas y defectos óseos en pequeños animales.

2. SUMMARY

Our aim was to perform a bibliographic review on osteosynthesis' different methods using xenogeneic biological implants and its application in dogs and cats to achieve long bones fractures stabilization. We will discuss these methods advantages and disadvantages and their characteristics to achieve biocompatibility with the recipient organ. Finally we concluded that with proper processing and deantigenizing xenogeneic bone grafts are an option to consider for the treatment of fractures and bone defects in small animals.

3. INTRODUCCIÓN

Las fracturas de los huesos largos se han tratado históricamente de muy diversas formas. Los tratamientos incruentos fueron los pioneros (escayolas, vendajes, cabestrillos). Si bien se mantienen en la actualidad, han ido dando paso a nuevas técnicas de inmovilización interna (elementos aplicados directamente sobre el tejido óseo) que contemplan la biomecánica y la biología ósea. Es así que surge la osteosíntesis mediante elementos metálicos o cerámicos de fijación, buscando dar estabilidad en el sitio de fractura (Bojrab, 1996; Slatter, 2006).

Debido a la aparición de fallas en los implantes, la destrucción ósea alrededor de ellos, las infecciones por mala esterilización y reacciones con el material, es que surgen alternativas de osteosíntesis que conllevan a una mayor preservación de la biología en el tratamiento de las lesiones osteoarticulares (Bojrab, 1996).

Un conocimiento más profundo de la biomecánica ósea, así como de las características biológicas a nivel molecular de la matriz esquelética introducen un nuevo escenario terapéutico: la utilización de injertos, implantes óseos alogénicos y xenogénicos, factores de crecimiento y más actualmente, células estromales mesenquimales indiferenciadas.

En el presente trabajo revisaremos -a la luz de los conocimientos actuales- la anátomo-fisiología del hueso, como pilar para comprender más cabalmente los procesos de reparación ósea que ocurren espontáneamente, así como aquellos consecuentes a la utilización de elementos de osteosíntesis sintéticos, biológicos y factores adyuvantes, en la reparación quirúrgica de las lesiones esqueléticas.

En una segunda instancia analizaremos las características de los procedimientos clásicos de osteosíntesis metálica, aplicados puntualmente al tipo de lesión esquelética que nos ocupa.

Plantaremos las alternativas biológicas a aquel tratamiento, revisando la utilización de autoinjertos, implantes óseos alogénicos, adyuvantes celulares (células estromales mesenquimales - MSC's), factores de crecimiento (factor de crecimiento tisular β , proteína morfogénica del hueso, factor de crecimiento plaquetario), para enfocarnos más extensamente en la utilización de hueso xenogénico procesado como material de osteosíntesis con función osteoinductiva, osteoconductiva y estructural (resistencia biomecánica).

Destinaremos un breve capítulo a la comprensión de los fundamentos biológicos de los mecanismos de osteoinducción y osteoconducción, esenciales para comprender el mecanismo de acción de los implantes xenogénicos.

Existe escasa bibliografía relativa a la utilización clínica de hueso xenogénico como material de osteosíntesis. Sin embargo, de acuerdo a los resultados preliminares obtenidos en nuestro medio (Semiglia y col., 2006) consideramos auspicioso su utilización en la reparación por medios biológicos del sistema esquelético (Semiglia, 2006; Zunino, com. Pers.).

4. DESCRIPCIONES GENERALES DEL TEJIDO ÓSEO

4.1. ANATOMO-FISIOLOGÍA DEL SISTEMA ESQUELÉTICO.

El hueso es estructuralmente, un tejido conectivo con características particulares que le confieren la resistencia (Bojrab, 1996). Sus componentes son células, agua, fase orgánica y sales inorgánicas (Gil y col., 2003) (sales de calcio, fundamentalmente fosfato de calcio, junto con pequeñas cantidades de sodio y magnesio) lo que le brinda las características de resistencia y rigidez (Gil, J y col., 2003; Slatter, 2006). De éstas sales, la hidroxiapatita, un fosfato de calcio pobremente cristalizado, es el mayor constituyente del componente inorgánico. El mayor constituyente de la fase orgánica es el colágeno tipo I, con elementos celulares que integran lo que resta de componente orgánico (Bojrab, 1996; Gil y col., 2003).

El hueso cumple con varias funciones, las cuales son principalmente la de sostén, protección, soporte locomotor, reservorio metabólico y hematopoyético. Para ello necesita relacionarse estrechamente con músculos y articulaciones, integrando lo que se denomina el sistema musculoesquelético. Pero además, debe contar con una estructura anatómica particular que le permita compatibilizar todas sus funciones (Bojrab, 1996; Martinez y Walker, 1999; Slatter, 2006).

Los huesos, según sus características anatómicas, pueden clasificarse en diferentes grupos: los huesos planos, los cortos, y los largos. Los planos son las costillas, esternón, escápula y algunos del cráneo. Los cortos se localizan fundamentalmente a nivel de la columna vertebral. Estos dos grupos forman parte del esqueleto axial (Bojrab, 1996; Dyce y col, 1999). Los huesos largos o tubulares, como su nombre lo indica, son huecos y cilíndricos (falanges y metacarpianos/metatarsianos, fémur, tibia, peroné, radio, cúbito y húmero). En estos últimos, anatómicamente se le denomina epífisis a los extremos y diáfisis al cuerpo del hueso, que tiene como característica ser algo cilíndrico y contener en su interior una cavidad medular. La metafisis es el espacio comprendido entre las dos anteriores. Todos estos huesos

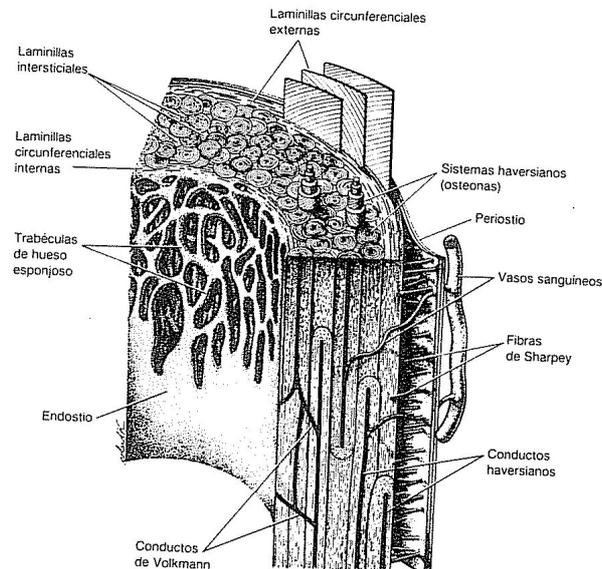
conforman la parte del esqueleto denominado esqueleto apendicular (Bojrab, 1996; Dyce y col, 1999).

Si ponemos como ejemplo un hueso tubular largo, éste está constituido en su parte más externa por periostio, que es una membrana fibrosa que envuelve toda la superficie del hueso. Su capa más profunda es muy rica en células, las que tienen capacidad de formar hueso durante la embriogénesis y la mantienen aun durante la etapa adulta. Ésta es una característica muy especial del tejido óseo, haciendo que sea el único tejido del organismo que se repara por tejido original (Bojrab, 1996; Einhorn, 1998; Dyce y col., 1999).

Siguiendo hacia el interior del órgano tenemos la corteza, que está compuesta por hueso sólido, compacto, formado por laminillas dispuestas de forma ordenada en tubos concéntricos (Sistema Haversiano). Se encuentra a nivel de la diáfisis. Las epífisis están conformadas fundamentalmente por hueso esponjoso, que está compuesto por trabéculas o espículas que forman un patrón enrejado, siendo que esta disposición le da la característica de ser más blando que el cortical (Bojrab, 1996; Porth, 2007) (*Figura N° 1*).

El endostio es también tejido conectivo situado en la cara más interna del hueso, tapiza externamente lo que denominamos una cavidad medular central y las trabéculas del hueso esponjoso, que son los lugares donde se encuentra la médula ósea (Bojrab, 1996; Dyce y col., 1999; Porth, 2007). Formado principalmente por células osteogénicas y por ello, la importancia de él –junto al periostio– en la reparación de una lesión ósea. Existen pruebas también de que tiene potencial hematopoyético (Bojrab, 1996; Porth, 2007; Bojrab y Monnet, 2011).

Figura N° 1: Esquema de un sector de hueso largo.



Fuente: Fawcett, 1995.

La médula ósea (MO) posee un estroma formado por tejido conectivo y por las células precursoras de las diferentes células óseas. Ella está constituida por células indiferenciadas (MSC's) que se caracterizan por tener una baja tasa de crecimiento, capacidad de auto-renovación y cuentan con potencial para diferenciarse en varios linajes celulares (Bojrab, 1996; Junqueira y col., 2004; Kraus y Kirker-Head, 2006). Dentro de la MO se describen dos grupos principales de células: las células tronco hematopoyéticas (CTH) y las células estromales mesenquimales (MSC) (Friedenstein y col, 1968). La capacidad osteogénica de la médula ósea se debe a las células osteoprogenitoras del estroma, en donde se diferencian dos tipos:

- las inducidas: células mesenquimales indiferenciadas que, mediante estímulos locales, son pasibles de formar hueso. Ellas se encuentran en todos los tejidos conectivos; y

- las determinadas: son células diferenciadas a una línea productora de hueso. Se hallan solo en el endostio y en el estroma de la medula ósea (Takagi y Urist, 1982; Bojrab, 1996; Junqueira y col, 2004; Slatter, 2006).

Los elementos celulares del hueso están representados esencialmente por osteoblastos y osteoclastos, los que se alternan funcionalmente en el ciclo de remodelación ósea (turnover): osteogénesis y osteólisis (Bojrab, 1996; Junqueira y col, 2004; Slatter, 2006).

Una de las funciones más importantes que cumple el hueso es el almacenamiento mineral, con predominio de calcio y fósforo (Bojrab, 1996). Hay que tener en cuenta que el mantenimiento de la homeostasis cálcica sérica, guarda relación estrecha con el metabolismo óseo, siendo el control de éste muy eficiente e involucra la hormona paratiroidea (PTH) y calcitonina, además de la vitamina D (Bojrab, 1996; Miyakoshi, 2004). La vitamina A también es esencial para el crecimiento de los huesos. Ésta parece ejercer cierto control sobre la actividad osteoblástica, condroblástica y osteoclástica, lo que la hace necesaria para el crecimiento, maduración y remodelación ósea. La tiroxina, hormonas sexuales y los adrenocorticoides también influyen en el metabolismo óseo (Bojrab, 1996). El hueso está en constante remodelación mineral, tal es así que se considera que un perro a lo largo de su vida, éste remodeló sus huesos unas 70 veces (Slatter, 2006).

4.1.1. Células del tejido óseo.

Las células que componen el tejido óseo, necesarias para su formación y mantenimiento estructural, son de cuatro tipos diferentes. Las células osteogénicas son células indiferenciadas que se encuentran en el periostio, el endostio y en la placa epifisaria de huesos que están en crecimiento. Su función es diferenciarse en osteoblastos y se mantienen activas durante el crecimiento normal hasta el cierre de la placa epifisaria, pero pueden activarse durante la reparación de fracturas u otras lesiones. También participan en el reemplazo continuo (turnover o remodelación) del tejido óseo (Bojrab y Monnet, 2011).

Los osteoblastos son responsables de la formación de la matriz ósea (Bojrab y Monnet, 2011; Bojrab, 1996). Sintetizan colágeno y otras proteínas que componen el tejido osteoide y participan en el proceso de calcificación mediante la secreción de la enzima fosfatasa alcalina. Esta enzima actúa localmente en el tejido óseo elevando los niveles de calcio y fósforo hasta el punto que se produce la precipitación de estas sustancias (Chiappe, 2004).

Cuando los osteoblastos terminan su función de sintetizar proteínas óseas pueden: “diferenciarse” como células que cubren la superficie del hueso recién formado; morir por apoptosis (muerte celular programada) o permanecer incluidas en la matriz y convertirse en osteocitos (Chiappe, 2004). Éstos son osteoblastos rodeados de matriz ósea mineralizada. Son las células más abundantes del hueso (más del 90% del total) (Chiappe, 2004) y mantienen el metabolismo de éste. Estas células son capaces de captar señales de estrés mecánico a que el hueso se ve sometido, optimizando la rigidez ósea, por los mecanismos de aposición-reabsorción (Chiappe, 2004).

Los osteoclastos son parte del sistema macrofágico, realizan la resorción del hueso retirando primero el contenido mineral y luego la matriz orgánica. Todas estas células se derivan de células pluripotenciales de la MO (Porth, 2007).

Como todo órgano, el hueso necesita de la irrigación sanguínea y de la inervación para el mantenimiento de su estructura y función (Pérez y col., 2010). De ahí la importancia de preservar este elemento cuando se intervienen las fracturas.

4.1.2. Factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento son polipéptidos producidos por las células óseas o de tejidos extra óseos y actúan en la matriz ósea como moduladores de las funciones celulares, fundamentalmente el crecimiento, la diferenciación y la proliferación. La mayoría de los factores de crecimiento que actúan sobre el esqueleto son: factor de crecimiento tipo insulina I y II (IGF-I y II), factor β transformador del crecimiento (TGF- β), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento del

endotelio vascular (VEGF) y factores de crecimiento provenientes de las plaquetas (PDGF) (Gil y col., 2003; Pérez y col, 2010; Bojrab y Monnet, 2011).

El IGF-I desempeña un papel importante en la osificación endocondral característica del cartílago de crecimiento (Mundy, 1996; Trippel y col., 1996), mientras que el tipo II es el factor más abundante en el hueso y presenta acciones similares al tipo I, aunque con un estímulo celular menos potente (Gil y col., 2003). El TGF- β quizás sea el más estudiado en el campo de la biología ósea. Su administración exógena es capaz de estimular significativamente la reparación ósea. Representa una superfamilia de factores, dentro de los que se destaca la proteína morfogénica del hueso (BMP) que es una familia específica de citoquinas inductoras de hueso. El FGF está presente en la reparación normal de una fractura, tiene actividad promotora de la mitosis, angiogénesis y también promueve la diferenciación celular (Gil y col., 2003). Los PDGF tienen como principal actividad la mitogénica. Se ha aplicado experimentalmente en conejos demostrando un efecto estimulador en la reparación de osteotomías incrementando el volumen y la densidad del callo óseo, aunque en otros estudios en ratones han demostrado un aumento concomitante en la reabsorción ósea (aumento de la remodelación) (Gil y col., 2003) Los implantes de hueso xenogénico bovino pudieron demostrar la existencia de BMP con capacidad osteoinductora (Zunino y col., 2004; Semiglia y col., 2006).

4.1.3. Células mesenquimales troncales de la médula ósea (MSC's).

Luego de los pioneros trabajos de Huggins (1931) y Burwell (1964), Friedenstein y col. en 1966 identificaron por primera vez las células tronco en la médula ósea, que posteriormente fueron nombradas mesenchymal stem cell (MSCs) (Caplan, 1991). Las MSC forman parte de la población de células indiferenciadas de la médula ósea. Se caracterizan por su capacidad de auto renovación y por su habilidad de diferenciación en al menos más de un tipo celular maduro (Friedenstein y col, 1968). Tienen capacidad para diferenciarse en osteoblastos, condroblastos, adipoblastos, fibroblastos y mioblastos. El periostio y fundamentalmente la médula ósea son las fuentes de donde provienen estas células (Kraus y Kirker-Head, 2006) y, en los

animales jóvenes hay abundancia de ellas, disminuyendo en número con los años. El número y la actividad de estas células son mayores en el hueso metafisario y en áreas de periostio grueso y vascular (Kraus y Kirker-Head, 2006).

Estas células multipotenciales proliferan y según el microambiente regional y sus condiciones metabólicas (oxígeno, pH) pueden diferenciarse en osteoblastos, condroblastos o fibroblastos. Cuando el ambiente es biológica y mecánicamente favorable, estas células se diferenciarán en osteoblastos y condroblastos produciendo inicialmente condroide y sustancia osteoide (ej.: callo primario en el caso de fracturas.) (Kraus y Kirker-Head, 2006).

Resulta de particular interés, destacar la interacción funcional entre el hueso y la MO. Las células estromales de la MO son determinantes en la formación de hueso, son células competentes al igual que aquellas con determinación osteogénica (Urist, 1989). Sin embargo, se ha visto en perros, monos y humanos, que la matriz ósea con estas células estromales sin la exposición a determinadas proteínas inductoras de la formación de hueso, forman una escasa cantidad de tejido (Urist, 1989). Altas concentraciones de células estromales hematopoyéticas y osteogénicas residen en el endostio, en la interfase entre el hueso y la MO. Aquí se produce una interacción entre las células estromales de la MO con el hueso, estableciendo un “consorcio hueso-MO”, en el cual un tejido sirve al otro en el proceso de regeneración ósea (Urist, 1989).

5. FRACTURAS Y REPARACIÓN ÓSEA

5.1. ANATOMO-FISIOLOGÍA DE LAS FRACTURAS.

Un hueso en condiciones normales, soporta determinadas fuerzas que son el resultado de las presiones que recibe fisiológicamente (Slatter, 2006). En este sentido, ningún hueso es igual al otro en el esqueleto, y su forma particular está influenciada directamente por las presiones diferenciales a las que se encuentra sometido (Ley de Wolf y Delpech).

Las fuerzas que debe superar el hueso son de tensión, de rotación, de flexión, de cizallamiento y compresión. La sumatoria de todas ellas (fuerza neta) debe ser igual a cero. Pero cuando esto no sucede y hay fuerzas que superan la resistencia del hueso, se produce la fractura (Bojrab, 1996; Slatter, 2006; Fossum, 2009).

Las lesiones traumáticas del sistema esquelético tienden –como hemos dicho- a auto-repararse (Broos y Sermon, 2004). Sin embargo, si el ambiente biomecánico no es propicio, resulta necesario intervenir exógenamente en este proceso, si deseamos lograr una consolidación precoz, una correcta alineación de los fragmentos óseos, y una mejor rehabilitación funcional (Slatter, 2006; Bojrab y Monnet, 2011).

Se define fractura como una solución de continuidad en el tejido óseo, que puede producirse por múltiples causas, ya sean metabólicas, patológicas o por factores externos al individuo (Bojrab, 1996; Martinez y Walker, 1999; Slatter, 2006).

Para hablar de fractura, debemos definir los siguientes términos:

- Foco: es el lugar donde se produjo la injuria.
- Cabos: se le denomina a los extremos de los segmentos del hueso, provocados por el vencimiento de su resistencia.
- Línea fracturaría: es donde se interrumpe la continuidad del hueso.

Esquemáticamente podemos clasificar las fracturas de varias formas. Se denominan abiertas (cuando los fragmentos óseos han atravesado la piel en algún momento) o cerradas (cuando el foco de fractura no comunica con el exterior). Según la línea de fractura, puede ser completa o incompleta. También se puede clasificar según la localización en proximal, diafisaria central o distal; según la dirección de la línea de fractura en transversa, oblicua o espiralada y según el tipo de los fragmentos en conminuta, segmentaria, en alas de mariposa o impactada. (Slatter, 2006; Porth, 2007; Fossum, 2009).

5.2. CLÍNICA DE LAS FRACTURAS.

En un animal politraumatizado muchas veces la fractura no es la entidad patológica más importante, ya que su etiología puede ser un traumatismo y estar afectados más órganos de la economía, como por ejemplo aparato circulatorio, aparato respiratorio, entre otros. Por lo tanto, todo paciente fracturado debe ser sometido a un exhaustivo examen clínico para después remitirnos al examen particular de la fractura, el cual consiste en tratar de determinar el tipo de fractura, clasificarla y sus posibles complicaciones (Fossum, 2009).

La peor complicación que puede suceder es una fractura expuesta, y las infecciones asociadas a ella. Se clasifican del grado 1 al 4, siendo este último el más severo. La exposición de la fractura provoca un daño vascular y neurológico, empobreciendo notablemente el pronóstico en su reparación (Bojrab, 1996; Toal y Mitchell, 2003; Slatter, 2006).

Otra complicación posible es el síndrome compartimental, que es el aumento de la presión dentro de un compartimento inextensible provocado por el hematoma en la zona de la fractura. Se produce cuando el aumento de presión es por más de 8 horas y por encima de 35 mmHg, provocando daño a nivel vascular y neurológico (Bojrab, 1996).

Tomando la escala de claudicación de Millis y col. (2004), un animal con fractura de hueso largo, se presenta a la clínica con una claudicación severa, generalmente sin apoyo del miembro (*Tabla N° 1*).

Tabla N° 1: Escala de claudicación.

<i>Examen clínico</i>	<i>Grados</i>
Severa	3
Moderada	2
Leve	1

Fuente: Millis y col., 2004

El examen paraclínico para evaluar una fractura son los estudios radiográficos. Para ello se deben de realizar al menos dos incidencias radiográficas con un ángulo de 90° entre sí, visualizando las articulaciones distal y proximal (Toal y Mitchell, 2003).

Radiológicamente la fractura se observa como una disrupción de la continuidad, apreciándose las líneas de fractura radiolúcidas ó una línea o zona esclerótica debido a la superposición de los cabos fragmentarios (Toal y Mitchell, 2003).

Comúnmente para evaluar la cicatrización ósea se toma en cuenta únicamente la unión clínica, valorándose por la presencia de la extremidad firme y no dolorosa, permitiéndole al animal el retorno a la función casi normal del miembro. Es el momento clínico en el cual el mecanismo de fijación puede retirarse. Sin embargo, el tiempo de cicatrización radiológico no siempre coincide con éste, ya que el implante suele retirarse antes de desaparecer completamente la línea fracturaría o de observarse la completa unión de los fragmentos por el callo óseo normal (*Tabla N° 2*) (Toal y Mitchell, 2003).

Tabla N° 2: Signos radiográficos de cicatrización ósea secundaria.

Días pos reducción	Visualización radiográfica
5-10 días	<ul style="list-style-type: none"> • Los fragmentos de la fractura pierden los márgenes agudos • Hay desmineralización de los extremos de los fragmentos que resultan en un ligero ensanchamiento de la línea fracturaría.
10-20 días	<ul style="list-style-type: none"> • Formación de callo endóstico y perióstico • Disminución del tamaño del espacio de fractura • Pérdida variable en opacidad de los fragmentos de fractura libre
Después de 30 días	<ul style="list-style-type: none"> • Las líneas de fractura desaparecen gradualmente • El callo externo aumenta en opacidad y se remodela
Después de 3 meses	<ul style="list-style-type: none"> • Continúa la remodelación externa del callo • Se puede desarrollar un patrón trabecular dentro del callo • La sombra cortical se vuelve más visible a través del callo • La cavidad medular se continúa restableciendo gradualmente • Remodelación de la cortical a lo largo de la línea de estrés

Fuente: Toal y Mitchell, 2003.

5.3. REPARACIÓN DE LAS FRACTURAS

Ya referimos que existe una tendencia del organismo a reparar naturalmente una fractura (Broos y Sermon, 2004). Cuando se produce esta lesión, se desarrolla una serie de eventos biológicos que tienen como finalidad la formación de un callo que luego sufrirá un proceso de transformación hacia tejido óseo. Los elementos celulares que participan en la reparación del hueso son la quimioatracción, migración, proliferación y diferenciación, siendo las MSC's los precursores esenciales en la reparación de la fractura (Kraus y Kirker-Head, 2006).

La reparación puede producirse mediante dos mecanismos: osificación directa (primaria) y osificación indirecta (secundaria) (McKibbin, 1978; Bojrab, 1996; Martinez y Walker, 1999; Slatter, 2006; Bojrab y Monnet, 2011).

5.3.1. Osificación primaria.

El concepto de osificación ósea primaria, surge a partir de 1914 cuando Lane observa la restauración ósea por “primera intención” empleando fijación interna con placas (Bojrab, 1996). Es la menos frecuente, ya que se logra cuando los extremos de la fractura están en estrecho contacto, dando como resultado una estabilidad absoluta (Wheeler y col, 2004) y la deformación interfragmentaria no supera el 2% (rango 0,6%-2,5%) (Bojrab, 1996; Martinez y Walker, 1999; Slatter, 2006).

En este proceso de cicatrización del hueso se produce una migración de osteoblastos y osteoclastos desde un lado hacia el otro de la fractura en donde los fragmentos están en estrecho contacto y, en aquellas zonas donde hay una separación entre los cabos, que no supera 1 milímetro, se produce la denominada “curación de brecha” (Bojrab, 1996; Einhorn y Lane, 1998; Toal y Mitchell, 2003). Esta consiste en la invasión por vasos sanguíneos y tejido conectivo laxo que posteriormente se irá haciendo cada vez más resistente hasta adquirir la firmeza

característica del hueso sano a través del proceso de remodelación (Martinez y Walker, 1999; Slatter, 2006).

El patrón radiológico de reparación se caracteriza por la visualización de la silueta normal del hueso. La línea de la fractura primero se aprecia muy delgada y luego desaparece en forma progresiva. Puede haber un ensanchamiento de la brecha que puede deberse a remodelación ósea interna intensiva que acompaña a la cicatrización por contacto (Bojrab, 1996).

5.3.2. Osificación secundaria

El otro tipo de reparación que existe es la que se observa con más frecuencia, evidenciada a través de la “restauración con callo” de tejidos intermedios en el sitio de la fractura y se le denomina osificación secundaria o indirecta. Consiste en la formación de hueso a través de tejido fibroso o cartilaginoso (Bojrab, 1996; Martinez y Walker, 1999; Slatter, 2006).

Se cumple en cuatro etapas:

- callo sanguíneo/inflamación
- callo fibroso
- callo óseo
- remodelación.

La inflamación comienza luego que se produjo la fractura (Bojrab, 1996; Martinez y Walker, 1999; Slatter, 2006). Se inicia a causa del daño en los tejidos blandos circundantes, al periostio, al endostio y al contenido medular que actúa como una fuente de material extraño (Martinez y Walker, 1999; Slatter, 2006). Esta etapa es importante para inducir la diferenciación celular para la formación del callo, y se mantiene hasta que éste logra fibrosarse (Bojrab, 1996; Martinez y Walker, 1999; Slatter, 2006).

Debido a la lesión producida en el hueso, hay rotura de vasos sanguíneos que dan lugar a una hemorragia con formación de un hematoma. Inicialmente se produce una vasoconstricción transitoria de los extremos de los vasos sanguíneos que han sido dañados durante el trauma lo que limita parcialmente la cantidad de sangre que entra al tejido dañado. El hematoma desencadena una infiltración de células inflamatorias, fibroblastos, colágeno y brotes de capilares nuevos que traerán consigo células de la línea blanca, encargadas de limpiar el foco y células pluripotenciales. Dentro de las primeras 48 hs el hematoma contiene mediadores quimioattractivos, flogísticos, factores angiogénicos y de crecimiento liberados por las plaquetas, células locales lesionadas, mastocitos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Los macrófagos cumplen la función de desbridar y de promover la fibroplasia. Liberan interleuquina 1 (IL-1) que da lugar a la mioatrofia e incrementa la liberación de prostaglandina E2 (PGE2) muscular, la cual promueve la resorción ósea e indirectamente la formación de hueso (Bojrab, 1996; Martinez y Walker, 1999; Slatter, 2006; Porth, 2007; Pérez y col., 2010).

El tejido de granulación invade el coágulo en forma gradual y lo reemplaza (Bojrab, 1996; Porth, 2007).

Las células locales supervivientes se sensibilizan para poder responder mejor a los mensajes y estímulos que allí se producirán. Se verifican cambios endócrinos como el incremento sérico de la paratohormona (PTH), la calcitonina (C), el metabolismo de la vitamina D y la fosfatasa alcalina (Bojrab, 1996; Porth, 2007). La liberación de citoquinas y PDGF que conforman el hematoma tienen un efecto estimulante en la reparación de fracturas. Las MSC's responden a estos estímulos diferenciándose primeramente en fibroblastos o condroblastos, según el Ph del entorno. Estos factores han demostrado ser mitógenos para las células óseas y los TGF- β han demostrado estar presentes en el trombo formado en el foco de fractura (Bojrab, 1996; Morales y Sosa, 2005).

La demanda de oxígeno se incrementa dentro del coágulo, donde aún no se ha establecido la vascularización suficiente, resultando en un incremento local de la concentración de lactato. Esto, junto con los ácidos y enzimas lisosomales liberadas durante la destrucción del material extraño, disminuyen marcadamente el pH del entorno. La disminución en la concentración de oxígeno provee la señal

quimiotáctica para las células endoteliales y mesenquimales que darán lugar a la angiogénesis (Bojrab, 1996; Bojrab y Monnet, 2011). Las células mesenquimales en respuesta a los estímulos producidos en el foco de la fractura, llegan por los nuevos capilares para diferenciarse primeramente en fibroblastos o condroblastos. Las células fibroblásticas segregan matriz celular, brindando un soporte mecánico suficiente al nuevo sistema vascular (Bojrab, 1996; Bojrab y Monnet, 2011).

Finalmente el hematoma es colonizado por células diferenciadas. Este tejido se torna más fibroso desde la periferia hacia el centro, en donde se sustituye por fibrocartílago por su menor suministro sanguíneo, mejorando la estabilidad y reduciendo los movimientos de los fragmentos (Bojrab, 1996; Martinez y Walker, 1999; Slatter, 2006). Una vez formado el tejido fibroso vascularizado, se inicia la osteoconducción o migración de células con potencial osteogénico (Bojrab, 1996; Slatter, 2006). Cuando la oxigenación es mínima en el sitio de la fractura, las células osteoprogenitoras tienden a formar cartílago más que hueso (Bojrab, 1996).

Los condrocitos del callo blando provienen de células mesenquimales pluripotenciales mediante osteoinducción y diferenciación (Bojrab, 1996; Bojrab y Monnet, 2011). El estadio de callo duro comienza cuando los extremos de los fragmentos se mantienen juntos, logrado mediante la neutralización de fuerzas, y finaliza cuando los fragmentos tienen unión firme con el hueso nuevo. Esto corresponde con la fractura cicatrizada, tanto a nivel clínico como radiológico. A partir de aquí comienza la fase de remodelación con reconstrucción ósea (Bojrab, 1996; Slatter, 2006; Toal y Mitchell, 2003).

El remodelado comprende la resorción de los excesos de callo óseo que se desarrollan en el espacio medular y rodeando la cara externa de la fractura, a cargo de los osteoclastos. Este proceso está dirigido por el estrés mecánico y la dirección del soporte de cargas. Como respuesta, el hueso se torna más grueso y fuerte en relación a su función, favorecido por la acción de los osteoblastos (Porth, 2007).

5.4. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO EN LAS FRACTURAS.

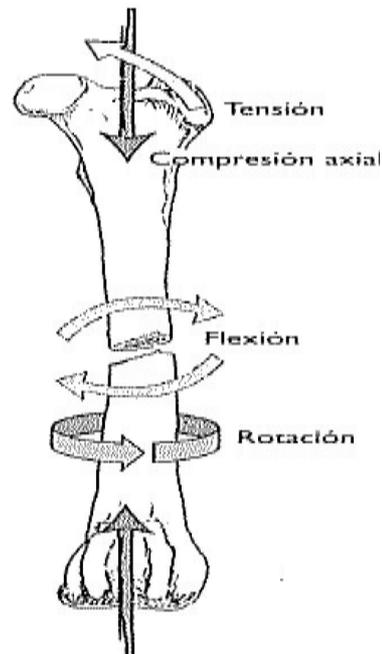
Cuando el objetivo es tratar una fractura, se requiere obtener ciertas condiciones mínimas de reducción e inmovilización (Saltter, 2006; Fossum, 2009).

El desplazamiento severo, la exposición, conminución, pseudoartrosis o infección, son algunas de las condiciones clínicas que determinan el tratamiento quirúrgico de las fracturas (Slatter, 2006; Fossum, 2009).

Los objetivos del tratamiento quirúrgico de las fracturas son fomentar la cicatrización, recuperar la anatomía y funcionalidad del hueso afectado y del tejido blando circundante y obtener resultados estéticamente aceptables (Fossum, 2009). Esto se logra en gran medida mediante el uso de implantes de fijación de distintos materiales (Slatter, 2006; Fossum, 2009).

A la hora de elegir un tipo de implante, el cirujano debe considerar las fuerzas que pueden actuar en el foco (rotación, tensión, flexión, compresión y cizallamiento) (*Figura N° 2*) (Bojrab, 1996; Slatter, 2006; Fossum, 2009), y promover su neutralización, seleccionando el implante adecuado y su correcto posicionamiento (Fossum, 2009).

Figura N° 2: Fuerzas a las que son sometidas los huesos



Fuente: Slatter, 2006.

Estos dispositivos, desde el punto de vista biomecánico, contribuyen al mantenimiento de la continuidad y de la alineación de las partes fracturadas, su estabilización y la neutralización de las fuerzas distorsionantes (Morales y Sosa, 2005)

Existen diversos tipos de medios de fijación: dispositivos de fijación externa, dispositivos de fijación interna y dispositivos mixtos (Slatter, 2006).

Los fijadores esqueléticos externos (FEE) consisten en clavos o tornillos metálicos de una longitud tal que puedan atravesar el hueso fracturado y los tejidos muscular y cutáneo. Después de ser alineados uniendo los extremos de la fractura, los clavos o tornillos son fijados entre sí por medio de una barra externa. Este sistema puede variar, según sea el caso, la rigidez de la fijación durante el período de consolidación de la fractura (Bojrab, 1996; Slatter, 2006; Piermattei y col. 2007).

Hay tres factores esenciales para una buena curación de una fractura bien reducida y son la irrigación sanguínea, la inervación y la estabilización (Palmer, 1999; Slatter, 2006; Fossum, 2009), aunque hoy en día hay tendencia a permitir cierta pérdida de estabilidad para mejorar la respuesta biológica en la cicatrización ósea (Fossum, 2009).

Cuando la estabilización es difícil de lograr y mantener, la fijación esquelética interna (FEI) puede estar justificada (Einhorn y Lane, 1998) La razón principal para elegir fijación interna para el tratamiento de una fractura es la de mantener los fragmentos en forma rígida hasta su cicatrización mientras se permite al paciente mover el miembro y cargar el peso (Slatter, 2006; Fossum, 2009). Estos fijadores, tal como su nombre lo indican, van aplicados al hueso, están en contacto directo con él (Fossum, 2009).

Su implante es un método invasivo, ya que requiere de un acceso quirúrgico al hueso, lo que provocará un daño tisular mayor y, por la propia manipulación de los fragmentos puede prolongar el proceso de cicatrización (Slatter, 2006; Fossum, 2009). Algunos de los principales métodos de FEI son las placas de osteosíntesis y los clavos intramedulares (Rudy, 1981).

5.4.1. Placas de osteosíntesis

Siendo el primer método desarrollado para la fijación de fracturas, son actualmente también los más usados. Este método consiste en la utilización de placas que por medio de tornillos, son fijadas al hueso. La principal característica de la placa ósea es la compresión dinámica (Slatter, 2006; Fossum, 2009). La finalidad es servir como guía para mantener la alineación de la fractura a la vez que comprimir los fragmentos entre si, mientras se produce la consolidación de la misma (Toal y Mitchell, 2003).

Correctamente aplicadas producen una muy buena estabilidad del sitio de fractura. Resisten bien la tensión, compresión y las fuerzas rotacionales aplicadas a un miembro (Slatter, 2006; Fossum, 2009).

La recuperación del hueso cuando se utilizan placas medulares es más lenta (*Tabla N° 3*), ya que toda la carga descansa sobre el implante (Toal y Mitchell, 2003; Slatter, 2006). Su utilización interfiere bastante en el momento de su colocación con la biología ósea (Slatter, 2006).

5.4.2. Clavos intramedulares.

Senn en 1893 y luego Hey-Groves, reportaron los primeros casos relacionados a la fijación intramedular para el tratamiento de fracturas. Sin embargo, fueron los hermanos Rush en Rochester, Minnessota, al mismo tiempo que Gerard Künscher en 1943 en Alemania, los reconocidos como los verdaderos pioneros en la fijación con clavos intramedulares (Morales y Sosa, 2005; Rush y Rush, 1937; Piermattei y col, 2007).

Esta técnica consiste en la alineación y aproximación de los fragmentos óseos insertando un clavo en el canal medular de los huesos largos (Rudy, 1981).

Según el diámetro de estos, se le denominan clavos verdaderos, a aquellos cuyo diámetro es mayor de 1,2 mm y alambres a aquellos cuyo diámetro es menor de 1,2 mm. (Rudy, 1981; Slatter, 2006).

Se los clasifica según su forma y/o su estructura. En el caso de los clavos de Küntscher, cuyo diseño es levemente cónico, son huecos y su sección transversal tiene forma de trébol o triangular; los clavos de Steinmann son sólidos y pueden presentar rosca en los extremos, en el centro o no tenerla. Los clavos de Rush, que son varillas elásticas de sección circular y se colocan de manera única o doble con el fin de ejercer tensión elástica en el sitio de la fractura. El clavo transfixado es una combinación de un clavo intramedular con tornillos de transfixión, cuyo fin es la de evitar la rotación de los extremos óseos (Rudy, 1981; Slatter, 2006; Fossum, 2009; Piermattei y col. 2007).

Todos ellos se pueden utilizar dentro de la cavidad medular de los huesos largos para contrarrestar fuerzas de flexión o para deslizar fragmentos con el fin de mantener su posición (Rudy, 1981; Slatter, 2006; Fossum, 2009).

Una recomendación general es llenar al menos 70% del canal medular cuando se los utiliza como único método de fijación intramedular (Slatter, 2006; Fossum, 2009). Pero hay que tener en cuenta que de esta forma se lesiona la médula y el endostio, afectando la capacidad osteogénica que será necesaria para la reparación de la fractura. Un clavo que ocupe el 30% del la cavidad medular es lo que se aconseja para no afectar la médula y mantener así el potencial osteogénico de ésta. Se puede colocar sin embargo, más de un clavo dentro del canal, con el objetivo de llenar la cavidad medular en el sitio de la fractura. A esto se le denomina enclavijamiento intramedular múltiple. También se utiliza la combinación con el alambre ortopédico logrando la unión de los fragmentos corticales entre si y al clavo intramedular, o el uso de clavos intramedulares asociados a fijadores externos, siendo este último el método más popular empleado para el manejo de las fracturas (Rudy, 1981; Fossum, 2009).

Actualmente, el uso de técnicas combinadas de fijación esquelética es una tendencia a seguir, para proporcionar un retorno del hueso a su función de manera más rápida y segura (*Tabla N° 3*) (Bojrab, 1996; Toal y Mitchell, 2003). Es la técnica utilizada en la presentación de los casos experimentales que hablaremos más adelante.

La aplicación de injertos biológicos junto con los implantes metálicos nos asegura un retorno a la función del miembro de manera precoz, confiriéndole al hueso el material necesario para acelerar su proceso de cicatrización (Semiglia y col., 2006; Zunino y col., 2011).

Los materiales biológicos utilizados como elemento de osteosíntesis, constituyen una novedosa técnica que utiliza la consistencia mecánica de los implantes de hueso, unida a su capacidad osteoinductora y osteoconductora, para acelerar el proceso de reparación de las fracturas. A la vez, su utilización disminuye la

morbilidad en el paciente, ya que –a diferencia de los implantes metálicos-, éstos no debe retirarse, sino que por el contrario, se incorporan al hueso (Zunino, 2010). Más adelante, profundizaremos sobre este punto.

Tabla N° 3: Tiempo aproximado para alcanzar la unión clínica de una fractura diafisaria no complicada.

Edad del animal	Fijación externa con aguja intramedular	Fijación con placa de osteosíntesis
Por debajo de los 3 meses	2-3 semanas	4 semanas
3-6 meses	4-6 semanas	2-3 meses
6-12 meses	5-8 semanas	3-4 meses
Más de 1 año	7-12 semanas	5-8 meses

Fuente: Toal y Mitchell, 2003.

6. ESTRATEGIAS DE REPARACIÓN DEL HUESO.

Como ya hemos dicho, el hueso se regenera mediante: osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis (Kraus y Kirker-Head, 2006).

La osteogénesis significa formación de hueso. Un material que sirva como sustrato y base estructural para la formación de células óseas se denomina osteogénico. El injerto de hueso esponjoso autógeno es el mejor ejemplo de un injerto osteogénico y se considera el mejor material para la regeneración ósea. Se puede obtener de la cresta ilíaca o el tubérculo mayor del húmero en perros y gatos y del esternón y el ilion en otras especies (Friedlaender y Goldberg, 1989; Kraus y Kirker-Head, 2006).

Otro ejemplo de material osteogénico es el estroma celular de la médula ósea. Éste contiene células tronco mesenquimales, células con el potencial de diferenciarse en linajes condro u osteoblásticos (Kraus y Kirker-Head, 2006).

Sin embargo, aisladamente, se considera menos osteogénico que el injerto autógeno de hueso esponjoso, ya que no contienen las proteínas osteoinductoras (BMP), las cuales tienen un gran potencial osteogénico. Combinando ambos métodos se obtienen excelentes resultados, ya que la BMP induce a las células troncales mesenquimales a diferenciarse hacia una línea osteoblástica, favoreciendo la regeneración ósea (Urist 1990).

Un material que le permita migrar a los precursores condro-osteoblásticos y brotes vasculares, actuando como un puente o andamio, se le denomina material osteoconductor (Kraus y Kirker-Head, 2006).

Factores bioquímicos (citoquinas), mecánicos y biológicos juegan importante roles en el proceso de osteoconducción (Weigel, 1993). La estructura del injerto actúa como un entramado tridimensional para el crecimiento interno de nuevos capilares y junto con ellos el ingreso de células osteoprogenitoras (Palmer, 1999; Kraus y Kirker-Head, 2006). Algunos ejemplos de materiales naturales con propiedad osteoconductor son: el injerto autógeno, implantes alo y xenogénicos de hueso, hueso desproteinizado e hidroxiapatita, el exoesqueleto del coral, entre otros (Friedlaender y Goldberg, 1989; Kraus y Kirker-Head, 2006).

La osteoinducción de hueso puede ser desencadenada como vimos, por el efecto de sustancias bioactivas (factores de crecimiento, BMPs, plasma rico en plaquetas, etc.) (Kraus y Kirker-Head, 2006; Zunino, 2010).

Las plaquetas son fuente de factores osteoinductores. Los gránulos α de las plaquetas son una rica fuente de los factores de crecimiento incluyendo TGF- β , PDGF, VEGF y IGF (Kraus y Kirker-Head, 2006).

Las plaquetas obtenidas de un paciente, pueden concentrarse mediante centrifugación de una muestra de sangre, dando como resultado una suspensión concentrada de plaquetas, lo que se conoce como "plasma rico en plaquetas" PRP.

Se sabe también que, además de obtenerse de la sangre, puede ser obtenido a partir de la médula ósea (Kraus y Kirker-Head, 2006).

6.1. OSTEOINDUCCIÓN - OSTEOCONDUCCIÓN.

Desde los pioneros trabajos de Urist (1965), quien describió el fenómeno de la osteoinducción, conocemos que las células mesenquimales indiferenciadas del sistema músculo-esquelético son capaces de sufrir una transformación hacia la línea osteoprogenitora merced al estímulo de ciertos factores biológicamente activos contenidos en la matriz ósea (BMPs) (Kraus y Kirker-Head, 2006; Bojrab y Monnet, 2011).

La osteoinducción es el principal mecanismo que involucra la conversión fenotípica de ciertas células “blanco” en células formadoras de hueso, por medio de señales inductivas (Weigel, 1993). Células indiferenciadas, son así reclutadas para formar hueso y cartílago a través de este proceso. Este se produce a nivel molecular mediante quimioatracción, migración y es modulado por los factores bioactivos de la matriz ósea (Palmer, 1999; Rechenberg y Auer, 2006; Kraus y Kirker-Head, 2006).

Es así que todo aquel injerto o implante óseo que preserve en su estructura estos factores inductores, será capaz -en el ambiente celular o tisular adecuado- de inducir una respuesta osteoformadora por diferenciación de las células estromales del tejido, hacia la línea osteogénica (Urist, 1965; Haje y Volpon, 2006; Zunino y col., 2004).

Los autoinjertos obviamente contienen todos los factores osteoinductores (Alexander, 1987; Friedlaender y Goldberg, 1989; Johnson, 1991; Fitch y col., 1997; Martínez y Walker, 1999; Palmer, 1999).

Los injertos alogénicos e implantes xenogénicos contendrán estos factores según el tipo de procesamiento a que deban someterse a los efectos de su injerto o implante (Piermattei y col., 2007).

Los materiales alogénicos y xenogénicos deben ser tratados y procesados a efectos de disminuir su antigenicidad cuando son implantados en un receptor (Johnson,

1995). Pero además, resulta necesario que los factores bioactivos responsables del mecanismo osteoinductor, tengan la posibilidad de ejercer su acción sobre las células “blanco” y así desencadenar el mecanismo osteoformador (Johnson, 1995).

Desde los trabajos de Urist (1965), es sabido que los implantes óseos, a efectos de ejercer su capacidad inductora, deben ser al menos parcialmente desmineralizados. El hueso completo con una fuerte mineralización de la matriz, es incapaz de permitir la liberación al medio circundante, de los factores osteoinductores encerrados en su matriz (Urist, 1968; Ranga y col., 1988; Guizzardi y col., 1992).

Deslipidización y desmineralización (además de la desantigenización), son procedimientos básicos y fundamentales para lograr que un implante óseo sea osteoinductor (Friedlaender, 1981; Heiple y col, 1987).

Históricamente los tejidos alogénicos y xenogénicos han sido procesados de muy diversas maneras con el objetivo último de evitar su rechazo inmunológico (Urist y col, 1975; Janovec y Dvorák, 1986; Janovec y Dvorák, 1988) Muchos fracasos reportados en la bibliografía relativa a la utilización de tejidos alogénicos y xenogénicos han sido debidos más que al uso o indicación de cierto tipo de hueso, a las deficiencias en su procesamiento (Basset y col, 1962; Hallen, 1966; Friedlaender y Goldberg, 1989; Dongyang y col, 2010).

Es así que, en el siglo pasado, se hizo abundante uso de material xenogénico en reconstrucciones esqueléticas (Hancox y col, 1961; Salama y col, 1973; Salama y Weissman, 1978; Janovec y Dvorák, 1986; Janovec y Dvorák, 1988). Si bien los resultados documentados no fueron en general auspiciosos, una revaloración retrospectiva de los trabajos de aquellos autores, nos permite afirmar que el procesamiento a que estaba sometido el material de implante (desnaturalización proteica), eliminaba el contenido de factores bioactivos (BMPs, TGF β , etc.) de las matrices a implantar (Urist, 1965; Pieron y col., 1968). Esto impedía lograr el efecto osteoinductor de los implantes, aunque preservaba su capacidad osteoconductor (Aspenberg y Thorén, 1990).

Otra de las características que deben tener los materiales osteosímiles, es la propiedad de ser osteoconductores. Esto significa que al ser injertados o

implantados deben permitir la invasión del tejido vascular y células provenientes del organismo receptor (huésped), las que encontrarán en aquella estructura el microambiente adecuado para su desarrollo, crecimiento y expansión (Berven y col., 2001).

El mecanismo osteoconductor permite que un hueso inerte implantado se vaya revitalizando hasta lograr que se produzcan en él, los procesos inherentes al ciclo normal (turnover) de aposición y reabsorción de hueso (Bojrab, 1996).

Este fenómeno ocurre asimismo en estructuras tridimensionales similares a la de la matriz ósea, como lo demuestran experimentos realizados con matrices de coral u otras biocerámicas que aun hoy se utilizan como sustitutos naturales o sintéticos del hueso (Louisia y col, 1999; Zhang y col., 2012a; Zhang y col., 2012b).

6.2. OSTEOSÍNTESIS BIOLÓGICA

Cuando hablamos de osteosíntesis biológica, nos referimos a la mínima intervención necesaria del cirujano para respetar o ayudar la formación de un callo en la fractura, basándose en los procesos que ocurren naturalmente en el organismo. (Rosenthal y col., 1999; Palmer, 1999). Hay distintas estrategias que se emplean para este fin.

Algunas de ellas son la realización de aproximaciones quirúrgicas lo menos traumáticas, el uso de sistemas de fijadores que minimicen el daño vascular y neural en el lugar de la fractura, la utilización de técnicas poco traumáticas para la aplicación de los dispositivos de fijación, y la colocación de injertos o implantes de hueso (Palmer, 1999).

La reconstrucción biológica de defectos en el sistema musculo-esquelético utilizando injertos o implantes óseos u osteoderivados, debe fundamentarse en la preservación de la mayor cantidad de propiedades en el implante, que permita una adecuada regeneración tisular, tanto cuali como cuantitativamente (Palmer, 1999).

7. INJERTOS E IMPLANTES ÓSEOS.

7.1. CONCEPTOS

Un injerto es la colocación de un tejido viable de una parte a otra del cuerpo (autoinjerto), de un individuo a otro de igual (aloinjerto) o diferente especie (xenoinjerto), o de un individuo a otro, genéticamente idéntico (singénico) (Blood y Studdert, 1988; Weigel, 1993; Martinez y Walker, 1999; Piermattei y col., 2007).

Hablamos de trasplante cuando se traspone de un individuo a otro, un órgano viable con su pedículo vascular (Johnson, 1995; Perry, 1999).

Consideramos implante, a la trasposición de tejidos biológicos o materiales biocompatibles desvitalizados (Zunino, com. Pers.).

Haremos particular referencia a los injertos e implantes óseos. Cuando nos referimos a un injerto óseo ideal, es aquel que posee propiedades que favorecen la osteogénesis, principalmente constituir un estímulo osteoinductivo y actuar como un transportador y molde para que las células del huésped reabiliten el injerto, reparando el hueso, mediante la neovascularización (Gil y col., 2003; Bojrab y Monnet, 2011).

Es decir, debe ser osteoinductor y osteoconductor. Los injertos e implantes deben ser además compatibles inmunológicamente o inertes, de modo de no desencadenar un rechazo por parte del receptor (Gil y col, 2003).

Según su estructura morfológica, un injerto puede ser de hueso esponjoso (hueso trabecular, poroso, con mucha cantidad de células), de hueso cortical (hueso compacto, denso, que contiene relativamente poca cantidad de células) o injerto corticoesponjoso (compuesto por ambos tipos de hueso) (Weigel, 1993; Johnson, 1995).

La propia estructura del hueso esponjoso injertado favorece la supervivencia de células osteogénicas, que son capaces de hacerlo por medio de la difusión de los nutrientes (Abbott y col, 1947; Ray y Holloway, 1957). Además, la gran superficie y la amplia red trabecular que presenta el hueso esponjoso lo convierte en un injerto más accesible para el crecimiento de vasos y células del huésped, a diferencia de lo que sucede con el hueso cortical, que tiene la característica de ser mucho más compacto (Abbott y col, 1947; Chalmers, 1959; Chalmers, 1967). Por el mismo motivo, el hueso esponjoso ofrece mucha menor resistencia mecánica que los injertos corticales (Bojrab, 1996).

7.2. INJERTOS E IMPLANTES ÓSEOS AUTOGÉNICOS, ALOGÉNICOS, SINGÉNICOS Y XENOGÉNICOS.

Es hecho bien conocido que la utilización de injertos autogénicos de hueso –si bien considerados injertos ideales por su capacidad osteoinductora, osteoconductora y biocompatibilidad- (Berven y col, 2001), determina un aumento de la morbilidad en los pacientes, vinculada a tiempos operatorios más prolongados y complicaciones adicionales en el sitio de obtención (segunda incisión, dolor, sangrado, infección, etc.) (Arrington y col., 1996; Robertson y Wray, 2001; Schwartz y col., 2009).

Los injertos singénicos aún no son utilizados en la práctica clínica habitual. Son aquellos realizados desde un individuo a otro genéticamente idénticos. Actualmente se los emplea casi exclusivamente a nivel experimental (Zunino, com. pers.).

La inexistencia de bancos de hueso en nuestro medio que posibiliten la obtención, procesamiento y conservación de implantes óseos para una o diferentes especies hace muy dificultoso y hasta imposible la utilización de implantes óseos alogénicos (Semiglia y col., 2006).

Es así que en la última década se ha utilizado en nuestro medio, tanto experimental como clínicamente, hueso xenogénico de origen bovino, procesado, desantigenizado y liofilizado (Zunino y col., 2004; Semiglia y col., 2006).

Este material óseo para implantes posee las siguientes ventajas:

- evita la iatrogenia que significa la obtención de un autoinjerto;
- proviene de una fuente segura desde el punto de vista sanitario (exento de potencial de transmisión de enfermedades infecto-contagiosas (Ministerio de Agricultura y Pesca, 1983; Perdomo, 2001; Rodríguez, 2001)
- es de fácil obtención y procesamiento;
- es probadamente osteoinductor y osteoconductor;
- presenta gran resistencia biomecánica y
- es económicamente ventajoso (Semiglia y col, 2006).

8. IMPLANTES XENOGÉNICOS

En los últimos tiempos se han estudiado diferentes alternativas al injerto de hueso autógeno. Matrices de hueso fresco, congelado, liofilizado y desmineralizado de fuentes alogénicas, están siendo muy utilizadas (Friedlaender, 1981; Heiple y col, 1987), así como también el hueso autoclavado. Sin embargo, este tipo de injertos e implantes posee importantes desventajas debido a su pobre compatibilidad inmunógena con el huésped. La histoincompatibilidad conduce a demoras en la osteosíntesis y fractura por fatiga durante la resorción de estos implantes. (Friedlaender y Goldberg, 1989).

Tienen una actividad biológica insuficiente, son potencialmente inmunogénicos y pueden producir una reacción inflamatoria elevada (Dongyang y col., 2010). Otro problema incluye el riesgo de infección, un remodelado inadecuado con subsecuente falla en la biomecánica del hueso y el riesgo de transmisión de enfermedades (Basset y col, 1962; Hallen, 1966; Friedlaender y Goldberg, 1989; Dongyang y col, 2010).

En el siglo pasado, algunos estudios afirmaban que el implante de hueso xenogénico no tenía potencial osteogénico (Chalmers, 1959). Estos injertos parecían determinar una reacción en el huésped receptor provocando un rechazo

del mismo, (Basset, y col, 1962; Hallen, 1966) e interfiriendo con la formación de hueso nuevo alrededor de los implantes (Elves y Salama, 1974). Sin embargo, usando implantes de hueso procesado preferiblemente frescos, se podía minimizar esta respuesta inmune (Czitrom, 1996).

Salama y col. (1973), manifestaban que la inmunogenicidad del injerto, moría junto con la materia orgánica del mismo (Salama y col, 1973) y preconizaban la destrucción total de la matriz orgánica en los implantes óseos.

Esto llevó a la generación de un descrédito sobre los implantes de hueso xenogénico. Hoy se sabe que los métodos utilizados otrora para la destrucción o desnaturalización de la matriz orgánica del hueso, eliminaba en el mismo proceso, las proteínas bioactivas y factores de crecimiento contenidos en esa matriz, responsables de los mecanismos de osteoinducción. (Fukunaga y col., 1995; Zunino, com. pers.).

La presencia de anticuerpos frente a los materiales xenogénicos implantados también fue objeto de investigación. Elves y Salama (1974) reportaron una baja incidencia de formación de anticuerpos en ratas que recibieron xenoinjertos de hueso bovino desproteínizado. A su vez, el parcialmente desproteínizado Kiel Bone (Elves y Salama, 1974) dio una menor respuesta antigénica que el Oswestry Bone (Elves y Salama, 1974) totalmente desproteínizado.

Algunos antígenos celulares quedan presentes en el Oswestry bone produciendo una respuesta de los anticuerpos por contener probablemente residuos proteicos (Elves y Salama, 1974).

Se sabe que el hueso anorgánico (tratado con etilendiamida) contiene residuos de nitrógeno (Losee y Hurley, 1956; Wheeler y Hyatt, 1960). Sin embargo, una respuesta inmune tardía, luego de injertado, cuando la osteogenesis está bien establecida, tiene poco efecto sobre el implante, en contraste con una respuesta inmune temprana (Elves y Salama, 1974).

Varios trabajos concluyeron sobre la capacidad osteoinductora de la matriz xenogénica de hueso desmineralizado (Nathan y col, 1988; Guizzardi y col, 1992).

El hueso xenogénico previamente tratado tiene varias ventajas. Entre ellas, la de obtenerse y producirse en grandes cantidades y la posibilidad de ser almacenado para casos de emergencia. Injertos de varias formas y tamaños pueden ser preparados de antemano mucho más fácilmente que el obtener hueso fresco. La liofilización y subsecuente envasado y esterilización permiten que el material pueda estar disponible en cualquier momento (Hancox y col., 1961).

Ventaja adicional, el paciente no tiene que sufrir una segunda incisión y los inconvenientes que trae consigo la obtención de un autoinjerto (Hancox y col, 1961).

8.1. PROCESAMIENTO DE LOS IMPLANTES XENOGÉNICOS

El procesamiento de hueso bovino tendiente a transformarlo en un sustituto óseo apto para injertos e implantes, libre de antígenos, biocompatible y con capacidad osteoinductura y osteoconductora, requiere de varias etapas críticas.

Existen diferentes métodos que pueden utilizarse para la depleción de antígenos en los xenoimplantes, preservando las propiedades osteoinductivas de los mismos (Urist y col., 1975; Janovec y Dvorák, 1986; Janovec y Dvorák, 1988).

Un factor crucial en los implantes biológicos lo constituye la preservación de las proteínas osteoinductoras (actividad BMP) en el material óseo. (Friedlander, 1995). Esta depende en gran parte de la forma mediante la cual el material es procesado, que debe incluir la utilización de inhibidores de las enzimas proteolíticas presentes en la matriz, a los efectos de evitar la autodigestión proteica (Zunino y col., 2004). Asimismo, es preciso evitar la desnaturalización proteica (incluyendo proteínas osteoinductoras) evitando la utilización de calor durante el procesamiento, así como detergentes o álcalis (Aspenberg y Thorén, 1990).

Realizar la desmineralización parcial de los implantes (Urist, 1965) permite también aumentar el grado de deslipidización de los mismos (Aspenberg y Thorén, 1990), a la vez que favorece la exposición de las proteínas osteoinductoras de la matriz ósea a las células mesenquimales (Salama y col, 1973). El grado de desmineralización

del injerto juega un rol muy importante en la diferenciación osteogénica de las células tronco (Mauney y col., 2005).

La desmineralización de tornillos hechos de hueso alogénico cortical humano, en el estudio realizado por Actis y col. en el año 2004, son afectados en sus propiedades mecánicas, perdiendo la resistencia con el pasar del tiempo; mientras que el autoclavado a 134 °C durante 5 minutos hace que sean microbiológicamente seguro, pero por otro lado, reduce sus propiedades mecánicas y capacidad osteoconductiva.

Hay diferentes métodos para procesar los xenoinjertos de hueso, con el fin de disminuir su antigenicidad; y de esta forma disminuir la reacción que pueda provocar en el organismo receptor.

Históricamente se han ensayado –con éxito variable- varias formas de productos óseos u osteoderivados. “Kiel bone” es un producto comercial que consiste de hueso desproteínizado obtenido de terneros sacrificados recientemente (frescos) El hueso se lava con agua, se extraen las partes blandas, se macera mediante oxidación con peróxido de hidrógeno y se trata con solventes grasos para luego secarse con acetona. Finalmente es esterilizado mediante radiación gamma (Salama y Weissman, 1978).

Otro producto comercial es el “Oswestry bone” que es hueso totalmente desproteínizado mediante peróxido de hidrógeno y etilendiamida (Hancox, 1961; Elves y Salama, 1974). Estos implantes, carecen de capacidad osteoinductora, debido a la total destrucción –durante su procesamiento-, de las proteínas bioactivas del hueso (Elves y Salama, 1974).

Actualmente, hay estudios (Schultheiss y col., 2005) en donde se utiliza un producto, “Tutoplast” , de hueso esponjoso bovino en bloques, que es un material comercial de origen alemán, certificado por la Comunidad Europea, el cual, para disminuir la antigenicidad del mismo se ha sometido a procesos químicos que aseguran su biotolerancia, pero también reducen su potencial osteoinductivo (Schultheiss y col., 2005).

Zunino y col. (2004) han comprobado la ausencia de antigenicidad del material bovino procesado. Luego de obtenerlo a partir de novillos jóvenes, se lavan

profusamente con solución acuosa de Azida de Sodio 10mMol/l a 4°C y se cortan a diferentes formas y tamaños. Son luego inmersos en un baño con inhibidores enzimáticos (ácido yodoacético 0,01 M y n-ethylmaleimide 0,03 M) y luego desmineralizados parcialmente (con HCl 0,6N) y deslipidizados (con éter-alcohol absoluto 1:1 volumen a volumen). Finalmente se lava el material y es liofilizado y posteriormente congelado a -60°C. Se envasan bajo cámara de flujo laminar en triple bolsa de polietileno y se irradian en gammacámara (*Figura N° 3*).

Figura N° 3: Imagen hueso xenogénico envasado pronto para su uso.



Fuente: Dr. Jorge Zunino.

8.2. HUESO XENOGÉNICO COMO MATERIAL DE OSTEOSÍNTESIS.

Como ya fuera dicho, desde hace varios años, se utiliza en nuestro medio, un material biológico derivado de hueso bovino, desantigenizado, liofilizado, caracterizado por ser a la vez osteoinductor y osteoconductor (Zunino y col., 2004; Semiglia y col., 2006).

Ha sido utilizado tanto a nivel experimental (Zunino y col, 2004) como en casos clínicos en la cirugía de pequeños animales.

Su uso clínico se restringió inicialmente, a su aplicación como implante en la reconstrucción de defectos óseos de diversa etiología: pérdidas de sustancia, pseudoartrosis, infecciones, tumores, etc. (Semiglia y col, 2006). Los resultados han sido auspiciosos, demostrándose su capacidad osteoinductora, osteoconductora, su ausencia de antigenicidad y gran resistencia biomecánica.

Estos resultados determinaron que sus aplicaciones clínicas se ampliaran, como alternativa a procedimientos clásicos de tratamiento de ciertas fracturas.

Hay trabajos en los que se realizó la colocación de clavos intramedulares xenogénicos en gatos, hechos con hueso cortical bovino, para el tratamiento de fracturas, donde se concluyó que este método no genera ningún tipo de complicaciones clínicas (Penha y Padilha Filho, 1998). Con esta técnica, se pueden sustituir los implantes metálicos, pudiendo disminuir los costos de la cirugía y brindando excelentes resultados clínicos (Penha y col, 1998).

En nuestro medio, desde 2008, el hueso xenogénico cortical, se ha utilizado en el tratamiento de fracturas diafisarias de huesos largos en cánidos (Semiglia, comunicación personal).

En efecto, implantes de hueso cortical fueron utilizados remedando anatómica y funcionalmente, clavos intramedulares (*Figura N° 4 y N° 5*) (Semiglia, comunicación personal).

Figura N° 4: Fotografía representando un hueso fracturado y el clavo intramedular xenogénico.



Fuente: Dr. Jorge Zunino.

Figura N° 5: Fotografía representando un hueso fracturado y su fijación combinando el implante xenogénico y fijadores metálicos.



Fuente: Dr. Jorge Zunino.

Con las ventajas de contar con una gran variedad de medidas para cada situación particular, el material ofrece la ventaja de su capacidad osteoinductora y osteoconductora, hechos que determinan una franca aceleración en el proceso de reparación de las fracturas (Semiglia y col., 2006).

Las propiedades biomecánicas de este tipo de implante, con una densidad de 1,787 g/cm², resistencia a la flexión de 18 kg y módulo elástico de Young de 9.500 MPa permite utilizarlo al mismo tiempo como dispositivo intramedular de fijación de la fractura, a la vez que respetando una gran proporción del caudal celular mesenquimal de la médula ósea (Zunino y col., 2004).

La incorporación del hueso xenogénico al hueso receptor y su parcial reabsorción luego de la consolidación de la fractura evita la morbilidad y eventuales complicaciones inherentes a una segunda cirugía de rescate de los implantes, como es el caso frecuente de los implantes metálicos (Hartwig y Schwerdtle, 2002; Harris, 2003).

9. RELEVAMIENTO DE TRABAJOS EXPERIMENTALES.

La utilización de injertos de hueso autogénico se considera el injerto ideal por carecer de reacción antigénica por parte del huésped y por su capacidad osteoconductora y osteoinductora, aunque posee complicaciones debido al aumento de la morbilidad en el paciente, como ya se ha comentado (Arrington y col., 1996; Robertson y Wray, 2001; Schwartz y col., 2009).

Es por ello, que están siendo estudiadas otras opciones de tratamientos biológicos, como ser el uso de injertos xenogénicos.

9.1. INJERTOS USADOS PARA RELLENAR DEFECTOS ÓSEOS

Hancox y col. en 1961 a nivel experimental, han demostrado que el injerto de hueso xenogénico desproteínizado, cuando es usado para llenar defectos y como un puente para las brechas óseas, da tan buen resultado como uno alogénico fresco, incluso como material autógeno.

Rosenthal y col. (1999) afirman que el implante de hueso bovino desmineralizado ofrece una alternativa para el tratamiento de no-uniones (seudoartrosis), quistes óseos y lesiones fibrosas en el hueso.

En el 2006, Semiglia y col. eligieron cinco animales con patologías óseas, a los cuales se les colocó en el defecto fragmentos de hueso liofilizado, reconstituído previamente en una solución con oxitetraciclina y suero fisiológico a temperatura ambiente. Todos los casos evolucionaron favorablemente, se logró retomar la función del hueso permitiendo una marcha y apoyo estables sin claudicación, permitiendo observar mediante imágenes radiológicas de control una progresiva remodelación del implante.

9.2. INJERTOS USADOS COMO ANDAMIOS.

Burwell (1961) fue el primero en registrar el alto potencial osteogénico de las células de la médula ósea que sobreviven a la injertación autógena en combinación con hueso alogénico o xenogénico. El uso combinado de injertos autólogos de médula ósea viva y hueso xenogénico, utilizado como un andamio para las células, ha demostrado de alguna forma facilitar la osteogénesis (Salama y col., 1973). El nuevo

hueso formado en esos injertos, es probablemente debido a la acción de la médula ósea autóloga solamente, según Salama y Weissman (1978).

Se ha sugerido que el injerto de hueso xenogénico desproteínizado no sólo sirve como un excelente andamio para la deposición de nuevo hueso por el huésped sino que, además, tiene propiedades osteogénicas genuinas (Hancox y col., 1961).

El injerto xenogénico de hueso mineral fue utilizado como transportador de la proteína osteogénica-1 (BMP-7) en un estudio realizado por Terheyden y col., en 2001, para favorecer la reconstrucción ósea. Se observó que una gran cantidad de hueso se produjo sobre el material injertado.

Se ha estudiado de qué forma afecta la angiogénesis la utilización de clavos intramedulares hechos de hueso bovino tratados con peróxido de hidrógeno al 3 % y esterilizados mediante óxido de etileno, comparándolo con aquellos animales en los que se utilizó clavos de material convencional para la reparación de fracturas de tibia en caninos. Este estudio demostró que no existe diferencia entre el calibre y la cantidad de vasos sanguíneos formados en el callo entre los dos grupos, concluyéndose que tanto los clavos xenogénicos como los convencionales tienen influencia similar en la irrigación sanguínea extraósea, característica sumamente importante ya que ésta fuente junto con la perióstica, son de mucha importancia para la nutrición del callo (Dehghani y col., 2004).

Otros estudios muestran que la osteoinductividad *in vivo* de un andamio de matriz de hueso bovino o su implantación en biocerámicas tri-dimensionales (Derubeis y Cancedda, 2004) puede ser modulada por la incorporación *ex vivo* de células tronco pertenecientes a médula ósea humana (Mauney y col., 2005).

9.3. FORMACIÓN DE NUEVO HUESO A PARTIR DE INJERTOS XENOGÉNICOS.

Según Hancox y col. (1961) el injerto xenogénico tiene propiedades osteogénicas genuinas. Esto quiere decir que dicho injerto induce a los tejidos del huésped a formar nuevo hueso en lugares donde de otro modo no se hubiese formado.

En 1973, Salama y col. concluyen a través de un experimento, que el xenoinjerto de hueso esponjoso no aporta inducción osteogénica al efecto de la médula ósea autóloga.

Shultheiss y col. (2005) investigaron la osteointegración de xenoinjertos de hueso esponjoso en bloques en el tratamiento de fracturas inestables de la unión toracolumbar, en 11 pacientes. En otros 11 pacientes, se usó autoinjertos de hueso de la cresta iliaca. Doce meses después observaron una completa osteointegración en 8 de los 11 pacientes en donde se utilizó el injerto autógeno y sólo en 2 de aquellos en los que se utilizó el xenoinjerto. Por medio de esto se pudo demostrar que el injerto autógeno tiene un mayor potencial osteoinductivo que el xenogénico.

Más adelante, Zunino y col., (2011) compararon la respuesta osteogénica (mediante osteoinducción y neoformación ósea) de dos tipos de matrices xenogénicas procesadas mediante diferentes métodos, en el ratón. El método de procesamiento que retuvo las proteínas bioactivas en la matriz ósea, determinó que los implantes se comportaran tanto como osteoinductores, así como osteogénicos. La otra matriz ósea ensayada, procesada sin desmineralizar y utilizando productos tensioactivos aniónicos con fines de deslipidización, no resultó osteogénica.

9.4. LOS INJERTOS XENOGÉNICOS Y LA REACCIÓN INMUNÓGENA

En el siglo pasado, algunos estudios afirmaban que el implante de hueso xenogénico no tenía potencial osteogénico (Chalmers, 1959), provocaban una reacción de rechazo por parte del huésped receptor (Basset, y col., 1962; Hallen, 1966; Bauer y col., 2010), interfiriendo con la formación del nuevo hueso (Elves y Salama, 1974).

En un estudio realizado por Fukunaga y col. (1995) en el cual se hicieron injertos de hueso de conejo en ratas, utilizándose un inmunosupresor, se determinó que la administración de este inmunosupresor luego del trasplante deprime significativamente la reacción de defensa del organismo sobre el injerto. La formación de nuevo hueso ocurrió solo cuando utilizaron hueso fresco, y no cuando

utilizaron el injerto previamente congelado a -40 grados Celsius. Se interpretó que estos resultados fueron debidos a que la congelación del injerto sin previo tratamiento, no es un método adecuado para mantener las propiedades osteogénicas en el hueso (autodigestión de las proteínas bioactivas).

Los xenoinjertos de hueso cortical, usados como clavos intramedulares para la reparación de fracturas humerales en aves, provocaron una reacción inflamatoria mononuclear que no afectó la salud del hueso (Wander y col., 2000).

Zunino y col., en 2004, utilizaron también hueso de conejo como implante xenogénico en ratas. Estos implantes fueron previamente incubados a 37°C por 72 hs. en un baño conteniendo inhibidores enzimáticos y buffer fosfato. Luego se los trató con pepsina y ácido clorhídrico a 22°C durante 6 hs. hasta que la solución llegó a un pH de 8, y luego se trató con hidróxido de sodio durante 6 hs a 4 °C. Luego se lavaron con agua destilada, se liofilizaron y se irradiaron (25 KGy, Co 60), con fines de esterilización. En este caso los injertos implantados de manera heterotópica, provocaron una respuesta inmune celular, sin afectar la osteoinducción ni la remodelación ósea.

En la experiencia en la cual se estudió la osteointegración de xenoinjertos de hueso esponjoso en bloques en el tratamiento de fracturas inestables de la unión toracolumbar, se produjo un retardo en el crecimiento óseo en aquellos animales en los cuales no hubo integración del implante llevando a fragmentación y fisuras, pudiendo haber sido influenciado por los procesos inmunológicos (Schultheiss y col., 2005).

9.5. INJERTOS XENOGÉNICOS USADOS COMO MÉTODOS DE FIJACIÓN DE FRACTURAS

Han sido publicado estudios sobre la fabricación de tornillos elaborados con hueso obtenido de la porción media de la diáfisis de la tibia de bovinos jóvenes. Es probable que estos tornillos favorezcan la consolidación ósea, que permita los micro movimientos en la línea de la fractura reduciendo la osteopenia alrededor del implante (Haje y Volpon, 2006).

En un estudio donde se utilizaron tornillos hechos de hueso cortical alogénico para el tratamiento de una fractura sagital en 12 pacientes, se concluyó que éstos tornillos brindan una estabilidad comparable con los dispositivos de fijación metálicos. Las ventajas de ellos pueden ser atribuidos a la bioconversión que presentan y a la no necesidad de realizar una nueva cirugía para su remoción. Además se comprobó que su tratamiento térmico previenen problemas de infección (Obwegeser, 1994).

Lofgren y col., en el año 2000, lograron la fusión rígida de la columna cervical en humanos utilizando implantes óseos xenogénicos de origen bovino.

Hay trabajos en los que se realizó la colocación de clavos intramedulares xenogénicos hechos con hueso cortical bovino en gatos para tratamientos de fracturas, en el cual se concluyó que este método no brinda ningún tipo de complicaciones clínicas (Penha y Padilha, 1998), haciendo de esta técnica un posible sustituto a los implantes metálicos, pudiendo disminuir los costos de la cirugía y brindando excelentes resultados (Penha y col., 1998; Penha y Padilha, 1998).

Otro estudio realizado en Japón, propuso un dispositivo de fijación que consiste en tornillos de hueso cortical para mejorar la reparación de los fragmentos osteocondrales, evitando así el riesgo latente que existe de una osteoartritis secundaria a los métodos convencionales de fijación. Se logró demostrar una mejor reparación del tejido en cuanto a calidad y cantidad cuando las fracturas condrales fueron tratadas con los tornillos hechos de hueso, que cuando fueron tratadas con tornillos de ácido poli-L-láctico (Kono y col., 2012) Según Kono y col, los tornillos fabricados de hueso cortical pueden ser aplicables en situaciones clínicas para la fijación de fragmentos osteocondrales intraarticulares.

Según Wander y col. (2000), la estabilización de fracturas con clavos intramedulares hechos de xenoinjertos corticales de hueso (de avestruz o de caninos) para la estabilización de fracturas en palomas, no demostró diferencias biomecánicas significativas estadísticamente con aquellas que fueron estabilizadas con clavos de acero inoxidable de tipo Kirschner. El hueso estabilizado con el xenoinjerto cortical produjo un mayor callo e inflamación en el sitio de la fractura que en aquellos usando el clavo de Kirschner. Concluyeron que los clavos intramedulares de hueso

cortical derivado de mamíferos o de aves, representa una alternativa en el tratamiento de fracturas humerales en aves, además de poseer la propiedad de biodegradabilidad y de reducir la necesidad de cirugía adicional para remover los implantes luego de consolidar la fractura.

En un estudio realizado por Berns y col. (2001), se evaluó la resistencia a la flexión a la que son sometidos clavos hechos de fémur fresco cortical humano. Un grupo fue testeado sin un tratamiento adicional, mientras que otro grupo fue desengrasado y secado con una solución de acetona. Dentro de éste grupo, se hicieron dos subgrupos donde uno fue autoclavado a 121 °C durante 20 min. y otro donde se autoclavaron a 134 °C durante 8 min. Obtuvieron como resultado, que el grupo tratado con la solución de acetona fue más resistente a la flexión y aumentó el módulo elástico en comparación con el grupo de hueso fresco, y a su vez se demostró que el autoclavado, en ambas situaciones, disminuyó la resistencia a la flexión del clavo de hueso, siendo mayor la disminución a mayor temperatura y menor tiempo.

En el 2004, un estudio evaluó el uso de clavos intramedulares de polimetilmetacrilato en comparación con clavos xenogénicos de hueso cortical para la fijación interna de fracturas humerales en 12 palomas; concluyendo que ambos materiales son adecuados para la inmovilización de fracturas de éste tipo sin provocar reacciones adversas (Kilic y Timurkaan, 2004).

Actualmente están siendo utilizados en nuestro medio como método para la reparación de fracturas, combinaciones de implantes metálicos con injertos xenogénicos de hueso bovino (Semiglia y col., 2006).

Describiremos a continuación dos casos clínicos que fueron sometidos a osteosíntesis con clavo xenogénico bovino y fijador esquelético externo en el Hospital de la Facultad de Veterinaria.

Caso 1

Canino macho cruzado, 11 años de edad, 18 kgs de peso. Presenta una claudicación grado 3 producto de un traumatismo a alta energía. Se realiza un examen físico completo y se constata fractura de húmero proximal, sin otras alteraciones

sistémicas que pudieran comprometerle la vida. La evolución del caso se detalla en la tabla N° 4.

Tabla N° 4 : Evolución del caso N° 1.

Días.	Exámen clínico.	Estudio radiológico.
0	Claudicación grado 3	Fractura de húmero proximal, completa, desplazada.
15	Claudicación grado 3	Puede apreciarse bien el injerto xenogénico dentro del canal medular. No hay reacción de tejidos blandos adyacentes.
30	Claudicación grado 2	No hay diferencias radiológicas
60	Claudicación grado 1	Formación de sustancia osteoide en la brecha fracturaria
90	Claudicación grado 1	Sustancia osteoide

		cubriendo defecto óseo
--	--	------------------------

Fuente: Semiglia, datos sin publicar.

Caso N° 2

Canino macho cruza, 4 meses de edad, 10 kgs. de peso. Presentó fractura de fémur en diáfisis media, completa, consecuencia de un traumatismo a alta velocidad. Al exámen físico se considera que es un paciente con bajo riesgo anestésico. La evolución en el tratamiento se detalla en la tabla N° 5.

Tabla N° 5: Evolución del caso N° 2.

Días	Exámen clínico	Estudios radiológicos
0	Claudicación grado 3	Fractura de fémur completa, en diáfisis media, desplazada y acabalgada
7	Claudicación grado 2	Formación de sustancia osteoide alrededor de la fractura, buena coaptación de los cabos óseos. Visualización del injerto intramedular.
15	Claudicación grado 1	Formación de un callo osteoide alrededor de la fractura exuberante, brecha fracturaría rellena

		de sustancia osteoide, buena continuidad ósea en el defecto óseo. Osteointegración del injerto.
30	Ausencia de claudicación	Visualización del callo óseo, buena continuidad ósea anatómica. Signos de remodelación ósea (comparación con RX anteriores)

Fuente: Semiglia, datos sin publicar.

10. DISCUSIÓN

Si bien no hay una extensa bibliografía sobre el uso de injertos xenogénicos, se ha conseguido demostrar que es una buena opción a utilizarse para llenar defectos óseos como quistes, lesiones fibrosas e incluso en el tratamiento de no-uniones (Hancox, 1961; Rosenthal, 1999; Zunino y col., 2004; Semiglia y col., 2006).

Otros estudios han logrado combinar el uso de injertos xenogénicos con injertos autógenos de médula ósea porque creían que la capacidad osteoinductora era brindada solamente por la médula ósea, mientras que el hueso xenogénico actuaba solamente como un andamio para las células (Salama y col., 1973; Salama y Weissman, 1978; Derubeis y Canceda, 2004; Mauney y col., 2005); aunque Hancox y col., en 1961, sugirieron que además de ser un excelente andamio (Terheyden y col., 2001), posee propiedades osteoinductivas genuinas.

Seguramente estas opiniones encontradas se deban a la variedad de tratamientos a los que han sido sometidos los injertos. Es de vital importancia proceder a tratamientos que conserven las proteínas osteoinductoras (Salama y col., 1973;

Friedlaender, 1995; Zunino y col., 2004), dependiendo en gran parte del método de procesamiento evitando la desnaturalización proteica por el uso de calor, detergentes o álcalis, e incluyendo en su procesamiento inhibidores de enzimas proteolíticas a fin de evitar la autodigestión proteica (Aspenberg y Thoren, 1990). La desproteización parcial del injerto mediante peróxido de hidrógeno y solventes grasos provoca una menor respuesta antigénica que si es desproteizado totalmente con peróxido de hidrógeno y etilendiamida (Hancox, 1961; Elves y Salama, 1974; Salama y Weissman, 1978). De esta última forma, el injerto carece de capacidad osteoinductora según (Elves y Salama, 1974) debido a la total destrucción de las proteínas bioactivas del hueso. La desmineralización parcial juega un rol importante en la diferenciación osteogénica, aumentando el grado de deslipidización favoreciendo la exposición de las proteínas osteoinductoras presentes en la matriz. Sin embargo, todos estos métodos de procesamiento, al igual que el tratamiento con solución de clorhidrato de sodio y acetona (método de procesamiento del "Tutoplast"), el autoclavado y la radiación gamma (métodos de esterilización de los injertos), afectan negativamente su potencial osteoinductivo (Berns y col., 2001; Hofmann y col., 2003; Actis y col., 2004; Schultheiss y col., 2005).

Los estudios en los cuales se utilizan clavos intramedulares xenogénicos como método de fijación de fracturas, han demostrado tener buenos resultados para su utilización en animales de menos de 5 kgs. de peso (Penha y col., 1998a; Penha y col., 1998b; Wander y col., 2000; Kilic y Timurkaan, 2004) .

No hemos encontrado estudios publicados donde se colocaran estos medios de fijación en perros de más de 5 kgs. de peso, salvo los realizados por el Dr. G. Semiglia para su tesis de maestría, en donde se utilizaron huesos xenogénicos bovinos tratados con azida de sodio, ácido iodoacético y etilendiamida como inhibidores enzimáticos, desmineralizados parcialmente con HCl y deslipidizados con alcohol-eter en una relación 1:1, liofilizados y congelados a – 60°C para luego ser esterilizados mediante radiación gamma (método con el cual Zunino y col. comprobaron la ausencia de antigenicidad y el potencial osteogénico de este injerto (2004), concluyendo necesaria la combinación con otro método de fijación (Semiglia, datos sin publicar).

Hasta la fecha no hay datos publicados que avalen el uso de estos implantes como único método de fijación en fracturas de huesos largos en caninos, salvo la presentación realizada por Semiglia y col. (2011).

No hay muchos trabajos publicados que avalen si el tratamiento a los que son sometidos, repercute en la estabilidad mecánica, afectando la resistencia del injerto (Hofmann y col., 2003; Actis y col., 2004).

11. CONSIDERACIONES FINALES

El mejor tratamiento para una fractura siempre es buscar la forma más simple de obtener un sitio estable biomecánicamente para que la naturaleza haga su trabajo. Muchas veces simplemente alcanza con un vendaje o reposo, pero existen fracturas que no se pueden reparar por métodos simples y necesitan de implantes, injertos u otros tratamientos; siendo necesario en estos casos mantener la biología ósea. Los implantes xenogénicos demostraron ser una alternativa.

La utilización de injertos xenogénicos bovinos como clavo intramedular, ofrece como ventaja el comportarse como un implante biológico activo y osteointegrable, pudiendo ser también utilizado en fracturas contaminadas. Su máxima desventaja hasta ahora, a la luz de la bibliografía consultada y de la experiencia los autores que están trabajando en el tema, es que mecánicamente deben ser asociados a otros dispositivos, no pudiendo ser utilizados como único método de fijación salvo en animales menores de 5 kgs.

Salvo las comparaciones entre el hueso bovino xenogénico y los implantes mecánicos, no se han encontrado en la literatura trabajos que comparen los tratamientos de los implantes xenogénicos y su resistencia mecánica como material de osteosíntesis, así como tampoco hay trabajos que comparen la resistencia del hueso xenogénico bovino cortical y esponjoso. Es un campo de estudio muy importante que merece ser investigado.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbot LC; Schottstaedt, ER; Saunders, JB; Bost, FC (1947). The evaluation of cortical and cancellous bone as grafting material. A clinical and experimental study. J. Bone Joint Surg. 29A:381-414.
2. Actis, AB; Obweser, JA; Rupérez, C (2004). Influence of different sterilization procedures and partial demineralization of screws made of bone on their mechanical properties. J. Biomat. Applic. 18(3):193-207.
3. Alexander, JW (1987). Bone grafting. Vet. Clinic. North Am. Small An. Pract. Philadelphia. 17(4):811-819.
4. Arrington, ED; Smith, WJ; Chambers, HG; Bucknell, AL; Davino, NA (1996). Complications of iliac crest bone graft harvesting. Clin. Orthop. 329:300-309.
5. Aspenberg, P; Thorén, K (1990). Lipid extraction enhances bone incorporation. Acta Orthop. Scand. 61(6):546-548.
6. Bauer, J; Efe, T; Herdrich, S; Gotzen, L; Farouk, B; Schmidt, J; Nina, T; Dietmar Schofer, M (2010). Torsional stability of interference screws derived from bovine bone – a biomechanical study. Disponible en: www.biomedcentral.com/1471-2474/11/82. Fecha de consulta: 08/02/2013.

7. Basset, C; Hurley, LA; Stinchfield, FE (1962). The fate of long-term anorganic bone implants. *Trans. Bull.*, 29:423-451.
8. Berns, T; Hofmann, C; Gotzen, L (2001). Strength testing of pins made of human femur cortical bone. *Der Unfallch.* 104(1):64-68.
9. Berven, S; Tay, BK; Kleinstueeck, FS; Bradford, DS (2001). Clinical applications of bone grafts substitutes in spine surgery: consideration of mineralized and demineralized preparations and growth factor supplementation. *Eur. Spine J.* 10:169-177.
10. Blood, DC; Studdert, VP (1988). *Diccionario de veterinaria*. Madrid. Intramericana. 1296 p.
11. Bojrab, J (1996). *Fisiopatología y clínica quirúrgica en animales pequeños*. 2ª ed. Bs. As. Intermédica. 1302 p.
12. Bojrab, MJ; Monnet, E (2011). *Mecanismos de enfermedad en cirugía de pequeños animales*. 3ª ed. Bs. As. Intermédica. 784 p.
13. Broos, PL; Sermon, A (2004). From unstable internal fixation to biological osteosynthesis. A historical overview of operative fracture treatment. *Acta Chir. Belg.* 104:396-400.
14. Burwell, RG (1964). Studies in the transplantation of bone VII. The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone. An analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts. *J. Bone Joint Surg.* 46B:110-140.
15. Caplan, AI (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9(5):641-650.
16. Chalmers, J (1959). Transplantation immunogenicity in bone homografting. *J. Bone Joint Surg.* 41(1):160-179.
17. Chalmers J (1967). Bone transplantation. *J. Clin. Path.* 20:540-550.

18. Chiappe, MA (2004). Mecanismos reguladores de la biología ósea, su importancia en la patogénesis de las osteopatías fragilizantes (primera parte). Ver. Med. Vet., 85(1):8-15.
19. Czitrom, AA (1996). The immune response: the afferent arm. Clin. Orthop. 326:11-24.
20. Dehghani, S; Vafafar, A; Emami, MJ (2004). Angiographic study of the canine tibial fracture fixed by bovine bone pins as compared with the conventional metal pins. Iranian J. Vet. Res. 5(2):67-72.
21. Derubeis, AR; Cancedda, R (2004). Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. Ann. Biomed. Eng. 32(1):160-165.
22. Dyce KM; Sack, WO; Wensing, CJG (1999). Anatomía Veterinaria. 2ª ed. Mexico DF. Interamericana. 952 p.
23. Dongyang, M; Liling, R; Yanpu, L; Fulin, C; Junrui, Z; Zhenxun, X; Tianqui, M (2010). Engineering scaffold-free bone tissue using bone marrow stromal cell sheets. J. Orthop. Res. 28(5):697-702.
24. Einhorn, TA (1998). The cell and molecular biology of fracture healing. Clin. Orthop. Relat. Res. 355:7-21.
25. Einhorn, TA; Lane, JM (1998). Clinical orthopaedics and related research. Association of bone and joint surgeons. Fracture healing enhancement. Workshop. Lippincott Williams and Wilkins. 366 p.
26. Elves, MW; Salama, R (1974.) A study of the development of cytotoxic antibodies produced in recipients of xenografts (heterografts) of iliac bone. J. Bone Joint Surg. 56B(2):331-339.
27. Fawcett, DW (1995). Bloom, Fawcett: Tratado de histología. 12 ed. Madrid. Interamericana. 1044 p.

28. Fitch, R; Kerwin, S; Sinibaldi, KR; Newman-Gage, H (1997). Bone autografts and allografts in dogs. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.* 19(5):558-576.
29. Fossum, TW (2009). *Cirugía en pequeños animales*. 3ª ed. Barcelona. Elsevier. 1640 p.
30. Friedlaender, GE (1981). Guidelines for banking osteochondral allografts. En: Friedlaender, GE; Mankin, HJ; Sell, KW. *Osteochondral allografts: biology, banking and clinical applications*. Boston. Little Brown. Pp:177-180.
31. Friedlaender, GE; Goldberg, V (1989). *Bone and cartilage allografts: biology and clinical applications*. Warrenton, Virginia. Am. Acad. Orthop. Surg. 303 p.
32. Friedlander, GE (1995). Biology and immunobiology of bone autografts and allografts. Clinical implication of biological events. En: Hollinger, J; Seyfer, AE. *Portland Bone Symposium*. Oregon Health Sciences University. Portland, Oregon. August 2-5. Pp.:289-299.
33. Friedenstein, AJ; Petrakova, KV; Kurlesova, AI (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Trans. Mar.* 6(2):230-247.
34. Fukunaga, T; Masumi, S; Hirokazu, Y; Shuji, I; Shimizu, K. (1995). Osteogenesis in xenogeneic bone transplantation, using an immunosuppressant. *Acta Orthop. Scand.* 66(6):557-560.
35. Gil, J; Garrido, R; Gil, R; Melgosa, M (2003). Materiales para la reparación y sustitución ósea. Factores de crecimiento y terapia génica en Cirugía Ortopédica y Traumatología. *Mapfre Med.* 14(1): 51-65.
36. Guizzardi, S; Silvestre, MD; Scandroglio, R; Ruggeri, A; Savini, R (1992). Implants of heterologous demineralized bone matrix for induction of posterior spinal fusion in rats. *Spine.* 17(6):701-707.

37. Haje, D; Volpon, J (2006). Bovine boné screws development: machining method and metrological study with profile projector. *Acta Ortop. Bras.* 14(2):87-91.
38. Hallen, LG (1966). Heterologous transplantation with kiel bone. *Acta Orthop. Scand.* 37:1-19.
39. Hancox, NM; Owen, R; Singleton, A (1961). Cross-species grafts of deproteinised boné. *J. Bone Joint Surg.* 43B(1):152-161.
40. Harris, GK; Shi, X (2003). Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. *Mutat. Res.* 533:183-200. Review.
41. Hartwig, A; Schwerdtle, T (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol. Lett.* 127: 47-54. Review.
42. Heiple, KG; Goldberg, VM; Powell, AE; Bos, GD; Zika, JM (1987). Biology of cancellous bone grafts. *Orthop. Clin. North Am.* 18:179-185.
43. Hofmann, C; Schädel-Höpfner, M; Berns, T; Sitter, H; Gotzen, L (2003). Influence of processing and sterilization on the mechanical properties of pins made from bovine cortical bone. *Der Unfallchirurg.* 106(6):478-482.
44. Janovec, M; Dvorák, K (1986). Segmental bone defect of rabbit filled with demineralized autolyzed bovine xenoinplant. *Scripta Med. Fac. Med. Univ. Brun.* 52:299-306.
45. Janovec, M; Dvorák, K (1988). Autolyzed antigen-extracted allogeneic bone for bridging segmented diaphyseal bone defects in rabbits. *Clin. Orthop.* 229:249-256.
46. Johnson, AL (1995). Bone grafting. En: Olmstead, ML. *Small animal orthopedics.* St. Louis, Mosby. Pp: 146-151.
47. Johnson, AL. (1991). Principles of bone grafting. *Sem. Vet. Med. Surg. Small An. Philadelphia.* 6(1):90-99.

48. Junqueira, R; Souza, B; Falci, AP; Perez, L (2004). Medula óssea autógena. Uma alternativa de exerto em ortopedia veterinaria. *Ceres*. 51(295):411-418.
49. Kilic, S; Timurkaan, N (2004). Repair of humeral fractures with pins in pigeons. *Indian Vet. J.* 81(9)-995-998.
50. Kono, M; Mori, R; Uchio, Y (2012). Bone screws have advantages in repair of experimental osteochondral fragments. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 470(7):2043-2050.
51. Kraus, KH; Kirker-Head, C (2006). Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.* 35(3): 232-242.
52. Kraus, KH; Kirker-Head, C (2006). Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.* 35(3): 232-242.
53. Losee, FL; Hurley, LA (1956). Successful cross-species bone grafting accomplished by removal of the donor organic matrix. *Res. Rep. of the Naval Medic. Res. Inst.* 14:911.
54. Lofgren, H; Johannsson, V; Olsson, T; Ryd, L; Levander, B (2000). Rigid fusion after cloward operation for cervical disease using autograft, allograft, or xenograft; a randomized study with radio stereometric and clinical follow-up assessment. *Spine.* 25(15):1908-1916.
55. Louisia, S; Stromboni, M; Meunier, A; Sedel, L; Petite, H (1999). Coral grafting supplemented with bone marrow. *J. Bone Joint Surg.* 81B(4):719-724.
56. Martinez, SA; Walker, T (1999). Bone grafts. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. Philadelphia*, 29(5):1207-1219.
57. Mauney, JR; Jaquiéry, C; Volloch, V; Heberer, M; Martin, I; Kaplan, DL. (2005). In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials.* 26(16):3173-3185.

58. McKibbin, B (1978). The biology of fracture healing in long bones. *J. Bone Joint Surg.*, 60B:150-162.
59. Millis, DL; Levine, D; Taylor, RA (2004). *Canine rehabilitation physical therapy*. St. Louis, Missouri. Ed. Elsevier. 526 p.
60. Ministerio de Agricultura y Pesca. Dirección General De Servicios Veterinarios (1983). *Reglamento Oficial de Inspección Veterinaria de productos de Origen Animal. Parte I: Carne, subproductos, derivados y productos cárnicos* (dec. 369/983, 7 oct. República Oriental del Uruguay). 81 p.
61. Miyakoshi, N (2004). Effects of parathyroid hormone on cancellous bone mass and structure in osteoporosis. *Current Pharmaceutical Design* 10:2615-2627.
62. Morales, B; Sosa, V (2005). *Efectos del uso de la luz láser de baja potencia en el proceso de reparación ósea*. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria. 63 p.
63. Mundy, GR. (1996). Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin. Orthop.* 323: 24-28.
64. Nathan, RM; Bentz, H; Armstrong, RM; Piez, KA; Smestad, TL; Ellingsworth, LR; McPherson, JM; Seyedin, SM (1988). Osteogenesis in rats with an inductive bovine composite. *J. Orthop. Res.* 6(3):324-334.
65. Obwegeser, JA (1994). Bioconvertible screws made of allogenic cortical bone for osteosynthesis following saggital split ramus osteotomy without postoperative immobilization. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 22(2):63-75.
66. Palmer, R. (1999). Biological osteosynthesis. En: *Fracture Management and bone healing*. *Vet. Clin. North Am.: Small An. Pract.* 29(5):1171-1185.

67. Penha, L; Padilha Filho, J; Brasil, F (1998a). Use of intramedullary nail xenograft made from bovine cortical bone, preserved in 98% glicerol, for the treatment of femoral dyaphisis osteotomy in the cat. A clinical study. XXIII Congreso de la Asociacion Mundial de Medicina Veterinaria de Pequeños Animales. Resúmenes. Bs.As. Tomo II. Pp. 635.
68. Penha, L; Padilha Filho, J; Canola, J; Selmi, A (1998b). Use of intramedullary nail xenograft made from bovine cortical bone, preserved in 98% glicerol, for the treatment of femoral dyaphisis osteotomy in the cat. A radiographic study. XXIII Congreso de la Asociacion Mundial de Medicina Veterinaria de Pequeños Animales. Resúmenes. Bs.As. Tomo II. Pp. 701.
69. Perez, M; Ramírez, E; Lledó, M; Calvo, JL; Pérez, DC. (2010). Biomaterials for bone regeneration. Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal 15(3): R517-522.
70. Perdomo, E. (2001). Observaciones sobre la encefalopatía espongiiforme bovina o “mal de la vaca loca”. En: Enfermedades priónicas en el animal y el hombre. Arch. Inst. Neurolog. 4(1):7-11.
71. Piermattei, D; Flo, G; DeCamp, C (2007). Manual de ortopedia y reparación de fracturas de pequeños animales: Brinker, Piermattei y Flo. Bs.As. Intermédica. 835 p.
72. Pieron, AP; Bigelow, D; Hamonic, M (1968). Bone grafting with Boplant. Results in thirty-three cases. J. Bone and Joint Surg. 50 B (2):364-368.
73. Porth, CM (2007). Fisiopatología: salud – enfermedad: Un enfoque conceptual. 7ª ed. Bs. As.- Madrid. Panamericana. 1582 p.
74. Ray RD; Holloway JA (1957). Bone implants. Preliminary report of an experimental study. J. Bone Joint Surg. 39A:1119-1128.
75. Rechenberg, BV; Auer, JA (2006). Bone grafts and bone replacements. En: Auer, JA; Stick, JA. Equine Surgery. 3a ed. St. Louis. Saunders. Pp.:1030-1036.

76. Robertson, PA; Wray, AC (2001). Natural history of posterior iliac crest bone graft donation for spinal surgery. A prospective analysis of morbidity. *Spine*. 26 (13):1473-1476.
77. Rodríguez, M. (2001). Bases genéticas de las enfermedades priónicas en el hombre. En: *Enfermedades priónicas en el animal y el hombre*. *Arch. del Inst. de Neurolog*. 4(1):18-24.
78. Rosenthal, RK; Folkman, J; Glowacki, J (1999). Demineralized bone implants for nonunion fractures, bone cysts and fibrous lesions. *Clin. Orthop. Rel. Res*. 364:61-69.
79. Rudy, RL (1981). Principios del enclavamiento intramedular. En: Rudy, RL. *Manejo de las fracturas de los miembros de los pequeños animales*. *Clin. Vet. Norte Am. BsAs. Hemisferio Sur*. Pp.:75-98.
80. Rush, LV; Rush, HL (1937). A reconstructive operation for comminuted fractures of the upper third of the ulna. *Am. J. Surg*. 38:332.
81. Salama, R; Burwell, RG; Dickson, IR (1973). Recombined grafts of bone and marrow. *J. of Bone and Joint Surg*. 55B:402-417.
82. Salama, R; Weissman, SL (1978). The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. A preliminary report. *J. of Bone and Joint Surg*. 60B(1):111-115.
83. Schultheiss, M; Sarkar, M; Arand, M; Kramer, M; Wilke, HJ; Kinzl, L; Hartwig, E (2005). Solvent-preserved, bovine cancellous bone blocks used for reconstruction of thoracolumbar fractures in minimally invasive spinal surgery-first clinical results. *Eur. Spine J*. 14:192-196.
84. Schwartz, CE; Martha, JF; Kowalski, P (2009). Prospective evaluation of chronic pain associated with posterior autologous iliac crest bone graft harvest and its effect on postoperative outcome. *Health Qual. Life Outcomes* 7:49-52.

85. Semiglia, G; Izquierdo, D; Zunino, JH (2006). Reparación quirúrgica de defectos esqueléticos en pequeños animales mediante implantes óseos xenogénicos desantigenizados: resultados preliminares. *Veterinaria (Montevideo)* 41 (161-162) 45-48.
86. Semiglia, G; Filomeno, A; Zunino, J; Cirio, A (2011). Resolución de una fractura expuesta de fémur en un canino mediante la colocación de un clavo intramedular asociado a un fijador externo tipo 3. VIII Congreso Iberoamericano FIAVAC. Punta del Este, Uruguay. 24 – 26 Nov.
87. Slatter, D (2006). Tratado de cirugía en pequeños animales. 3ª ed. Bs.As. Intermedica. 3156 p.
88. Takagi, K; Urist, MR (1982). The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clin. Orthop.* 171:224-231.
89. Terheyden, H; Knak, C; Jepsen, S; Palmie, S; Rueger, DR (2001). Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 30(5):373-379.
90. Toal, RL; Mitchell, SK (2003). Cicatrización de fracturas y complicaciones. En: Thrall, D. Manual de diagnóstico radiológico veterinario. 4ª ed. Madrid. Elsevier. 758 p.
91. Trippel, SB; Coutts, RD; Einhorn, TA; Mundy, GR; Rosenfeld, RG (1996). Growth factors as therapeutic agents. *J. Bone Joint Surg.* 78A: 1272-1286.
92. Urist, MR (1965). Bone: Formation by autoinduction. *Science.* 12(150):893-899.
93. Urist, MR; Mikulski, A; Boyd, SD (1975). A chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone Banks. *Arch. Surg.* 110:416-428.

94. Urist, MR (1989). Bone morphogenetic protein induced bone formation and the bone – bone marrow consortium. En: Aebi, M; Regazzoni, P. Bone transplantation. Berlin. Springer-Verlag. Pp.185-197.
95. Urist, MR (1990). Proteína morfogenética en la generación y regeneración del hueso. Rev. Ortop. Traum. 34IB (2): 240-252.
96. Wander, KW; Schwartz, PD; James, SP; Powers, BE; Taylor, B; Wimsatt, JH (2000). Fracture healing after stabilization with intramedullary xenograft cortical bone pins: a study in pigeons. Vet. Surg. 29(3):237-244.
97. Weigel, JP (1993). Bone grafting. En: Bojrab, MJ; Smeak, DD; Bloomberg, MS. Disease mechanisms in small animal surgery. 2ªed. Philadelphia. Lea & Febiger. Pp.:678-684.
98. Zhang, W; Li, G; Deng, L; Qiu, S (2012). New bone formation in a true bone ceramic scaffold loaded with desferrioxamine in the treatment of segmental bone defect: a preliminary study. J. Orthop. Sci. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=new%20bone%20formation%20in%20a%20true%20bone%20ceramic>. Fecha de consulta: 1/05/2012. (a).
99. Zhang, Q; He, QF; Zhang, TH; Yu, XL; Liu, Q; Deng, FL (2012). Improvement in the delivery system of bone morphogenetic protein-2: a new approach to promote bone formation. Biomed. Mater. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22556155> Fecha de consulta: 10/05/2012. (b).
100. Zunino, JH; Bengochea, M; Johnston, J; Deneo, H; Hernandez, S; Servetto, C; Taranto, L; Ordoqui, G (2004). Immunologic and osteogenic properties of xenogeneic and allogeneic demineralized bone transplants. Cell and Tissue Banking, 5:141-148.

101. Zunino, JH (2010). Reconstrucción biológica del sistema esquelético con material osteoderivado xenogénico. Tesis de Docencia. Facultad de Medicina. 75 p.
102. Zunino, JH; Semiglia, G; De Pro, C; Carzoglio, J; Filomeno, A (2011). Osteoinductive and osteogenic properties of two xenogeneic bone matrices. VI Congreso Mundial de Bancos de Tejidos y XX Congreso de la Asociación Europea de Bancos de Tejidos. Barcelona, España, 9-11 Nov.