



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

TRAUMATO ORTOPEDIA EN CANINOS

**“Tratamiento Biológico de Fracturas Diafisarias con Implantes
Endomedulares de Hueso Xenogénico en Caninos”**

Dr. Gabriel Semiglia Repetto

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2016**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

TRAUMATO ORTOPEDIA EN CANINOS

**“Tratamiento Biológico de Fracturas Diafisarias con Implantes
Endomedulares de Hueso Xenogénico en Caninos”**

Dr. Gabriel Semiglia Repetto

DMV, MSc, PhD. Alberto Cirio

2016

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

Jacqueline Maisonnave; DMV, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la Republica- Uruguay

Nelsa Widenhorn; DMV, MSc, MPVM, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad Nacional del Litoral – Argentina

Alejandro Benech; DMV, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay

2016



ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 8 de diciembre de 2016

TRIBUNAL: Dres. Jacqueline Maisonnave (Presidente), Nelsa Widenhorn, Alejandro Benech

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
1.724.440-5	SEMIGLIA REPETTO, Gabriel Gastón	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

FIRMA

Dra. Jacqueline Maisonnave (Presidente)

Dra. Nelsa Widenhorn

Dr. Alejandro Benech

NOTA: La calificación mínima para aprobar el examen es B B B (6)

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Jacqueline Maisonnave, Nelsa Widenhorn y Alejandro Benech por haber aceptado ser integrantes de este Tribunal de Tesis.

Al Dr. Alberto Cirio por haber aceptado ser tutor de mi tesis a pesar de no ser su disciplina, con su excelencia académica, paciencia y docencia logro que este proyecto pudiera llegar a su fin.

Al Dr. Jorge Zunino por haber guiado mi carrera docente desde mi primera clase y luego haber compartido conmigo todos sus conocimientos como pionero que es de la implantología xenogénica en nuestro país.

A mi abuela Blanca, a mi madre Teresita y a Héctor por trasmitirme sus valores que son pilares de mi vida.

A Andrea, mi compañera de camino contra viento y marea. Y vamos...

A mis hijos, Analía, Gastón y Carolina por sus enseñanzas en la maestría de mi vida

A Pepe y su fiel amigo, el Dr. Pedro Benedek por enseñarme que es posible la amistad entre dos seres de diferente especie.

Esta tesis está dedicada a todos mis alumnos, de todas las generaciones y todos los países.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	V
SUMMARY.....	VI
INTRODUCCION	1
EL HUESO COMO ORGANO	1
Definición.....	1
Macroestructura.....	2
Microestructura.....	2
Células óseas	3
Osteoblastos, osteocitos	3
Osteoclastos	4
Médula ósea y células mesenquimales troncales	4
Factores de crecimiento	5
LA FRACTURA COMO ENTIDAD PATOLOGICA Y SU MECANISMO BIOLOGICO DE REPARACION.....	6
Mecanismo biológico en la reparación de fracturas	6
TRATAMIENTO DE LAS FRACTURAS.....	10
Métodos de fijación	10
Fijación esquelética externa.....	12
EVALUACION CLINICO- RADIOLOGICA DE LAS FRACTURAS	12
ANTECEDENTES.....	14
Estrategias para la reparación ósea.....	14
Injertos e implantes óseos	15
Biocompatibilidad.....	18
Procesamiento de implantes óseos xenogénicos.....	19
Antecedentes de la utilización de hueso xenogénico en ortopedia.....	20
La osteosíntesis biológica con material xenogénico.....	22
CARACTERIZACION DEL PROBLEMA E HIPOTESIS	24
OBJETIVOS.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos.....	25
MATERIALES Y METODOS.....	25

Preparación de los implantes.....	25
Controles de calidad	26
Casos clínicos.....	26
Técnica quirúrgica.....	30
Cuidados post-operatorios.....	34
Controles evolutivos	35
<i>RESULTADOS.....</i>	35
<i>DISCUSION.....</i>	41
<i>CONCLUSIONES</i>	43
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i>	44

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1: Hueso bovino liofilizado, esterilizado con radiación Gamma y envasado en polietileno listo para ser usado en el block quirúrgico.....	31
Figura 2: Clavo de hueso xenogénico ubicado en el canal medular.....	32
Figura 3: Adaptación del clavo óseo xenogénico al canal medular del cabo distal para su posterior introducción en el mismo.....	32
Figura 4. Reconstitución del clavo xenogénico en una solución de suero fisiológico y oxitetraciclina.....	33
Figura 5. Colocación definitiva del implante en el canal medular.....	33
Figura 6. Colocación de clavos de fijación externa luego de instalado el clavo xenogénico en el canal medular de los cabos distal y proximal.....	34
Cuadro I. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 1.....	36
Cuadro II. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 2.....	36
Cuadro III. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 3.....	37
Cuadro IV. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 4.....	37
Cuadro V. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 5.....	38
Cuadro VI. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 6.....	38
Cuadro VII. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 7.....	39
Cuadro VIII. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 8.....	39
Cuadro IX. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 9.....	40

RESUMEN

La osteosíntesis por métodos biológicos constituye una clara tendencia actual en cirugía ortopédica, que desarrolla sus diferentes técnicas en base al conocimiento cada vez más profundo de los mecanismos por los que el hueso se autorepara. El presente trabajo describe y evalúa un método original que permite lograr la estabilización de fracturas a la vez que la osteogénesis reparadora de las mismas por medio de un elemento polifuncional: un hueso procesado de origen bovino utilizado como implante endomedular.

Basados en resultados previos del uso experimental y clínico de hueso xenogénico en cirugías del sistema esquelético en pequeños animales, diseñamos un estudio prospectivo que nos permitiera evaluar el comportamiento de estos implantes óseos en términos de tiempo de consolidación de las fracturas, desempeño funcional locomotriz del paciente, capacidad biomecánica y osteointegración del implante. Nueve caninos que presentaron fracturas diafisarias de etiología traumática (2 abiertas y 7 cerradas) representaron la población de nuestro estudio. Nuestro método terapéutico consistió en la reducción quirúrgica de los cabos fractuarios y su posterior estabilización con el clavo intramedular xenogénico asociado a un fijador esquelético externo tipo Kirschner. Los controles evolutivos se realizaron mediante exámenes clínicos y radiológicos a los 15, 30, 60 y 90 días post operatorios. Todos los casos salvo uno evolucionaron favorablemente a la consolidación de sus fracturas, comprobándose sistemáticamente a los 90 días del post-operatorio, signos radiológicos de consolidación y ausencia clínica de claudicación. El implante óseo xenogénico utilizado fue capaz de soportar las fuerzas de compresión y extensión en el foco de fractura, osteointegrándose luego de la consolidación ósea. Este nuestro aporte representa pues una técnica más que permite promover la regeneración ósea basada en la amplificación del estímulo de los factores que normalmente actúan fisiológicamente en la reparación del hueso. Implantes óseos u osteoderivados osteoinductores, células troncales, factores de crecimiento, utilizados en forma aislada o combinada, parecen representar el nuevo camino en la reparación de diferentes defectos del sistema esquelético.

Palabras clave: Hueso, xenoinjerto, perro

SUMMARY

Performing osteosynthesis applying biological methods represents a clear present trend in orthopedic surgery. Its different developing techniques are based on the increasing knowledge about the self repairing mechanisms of bone. This trial describes and evaluates an original method that enables both fracture stabilization and restorative osteogenesis as well, by means of a polyfunctional device: a processed bovine bone used as an endomedular implant. Based on previous experimental and clinical results using bovine xenogeneic bone in skeletal surgery on small animals, we designed a prospective clinical trial for assessing our bone implant's performance, basically regarding four facts: time of fracture healing, patient's functional locomotor performance, biomechanic and osseointegration capacity of the bone implants. Nine dogs presenting traumatic diaphyseal bone fractures (2 open and 7 closed) integrated our study population. Our therapeutic method was based on an open reduction of the fracture and its subsequent stabilization by means of an endomedular xenogeneic bone implant in association to a skeletal external Kirschner device. At 15, 30, 60 and 90 days post operative, clinical and X-Ray evaluation was performed. All patients but one healed their fractures. At day 90 post op., radiologic signs of bone healing and clinical absence of locomotive claudication were systematically assessed. The xenogeneic bone implant was able to bear both the compressive and elongative stress within the fracture site, achieving its osseointegration after the fracture healing process. Our input represents an additional technique that - based on the stimuli amplification on normal physiological factors involved in bone repair- enables and promotes bone regeneration. The use of osteoinductive bone or bone-derivate implants, stem cells, growth factors, either alone or combined, seem to represent the incoming way to approaching skeletal system defects' repair.

Keywords: Bone, xenograft, dog

INTRODUCCION

La comprensión cada vez mayor a nivel molecular de los eventos fisiológicos implicados en la reparación de las fracturas nos ha llevado a la búsqueda de la optimización de los métodos de osteosíntesis. Hoy por hoy, ya no solo evaluamos los aspectos mecánicos en la fijación y neutralización de fuerzas de desplazamiento de los fragmentos óseos, sino también la capacidad de los diferentes implantes de promover la osteogénesis y luego de cumplida su función, osteointegrarse o bioabsorberse.

Si bien se han utilizado muchos tipos de implantes e injertos óseos con esa finalidad, pocos han sido a su vez evaluados como dispositivos de fijación y osteopromoción en la reparación invasiva de fracturas.

A efectos de establecer los fundamentos biológicos de la utilización de métodos adyuvantes en la reparación de fracturas, en la primera parte de esta tesis nuestro estudio bibliográfico permitirá describir las características del hueso normal como órgano, para después enfocarnos en la fractura del mismo como patología y los mecanismos biológicos que emplea el organismo para repararla.

Luego realizaremos una revisión de los diferentes tipos de métodos de osteosíntesis utilizados hasta el presente, poniendo especial énfasis en la utilización de implantes biológicos óseos y osteoderivados, particularmente aquellos de origen xenogénico.

Finalmente, expondremos y discutiremos nuestra experiencia en la utilización de métodos biológicos de fijación y osteopromoción en el tratamiento de fracturas utilizando material óseo xenogénico.

EL HUESO COMO ORGANO

"En la evolución de los tejidos de soporte el hueso ocupa el lugar más alto. El representa la solución a la necesidad del organismo de tener un sostén sólido llamado esqueleto" Robert K. Shenik

Definición

El hueso es un órgano estructural básico en la constitución corporal. Además de reservorio metabólico, da soporte funcional al sistema músculo tendinoso y protege órganos vitales. El tejido que conforma el hueso difiere de otros pues tiene la particular capacidad de autorepararse y puede alterar sus propiedades y geometría en respuesta a la demanda mecánica (Kaplan, 1994)

Macroestructura

El esqueleto contiene dos tipos de hueso macroscópicamente diferentes; el cortical que predomina en los huesos largos de las extremidades y el hueso esponjoso o reticulado que predomina en las vértebras y la pelvis (Ericson y col, 1994)

El hueso cortical aparece como una masa sólida continua en la cual sólo se ven espacios con la ayuda de un microscopio. Representa el 80% de la masa esquelética. El hueso esponjoso consiste en finas placas o espículas de espesor variable (50 a 400 nanómetros). Estas trabéculas están interconectadas ofreciendo gran resistencia mecánica y delimitan un sistema laberíntico ocupado por medula ósea. Como el hueso cortical es metabólicamente menos activo por unidad de volumen que el esponjoso, el metabolismo del esqueleto queda casi igualmente distribuido entre los dos tipos de tejido óseo (Ericson y col, 1994)

Los huesos están recubiertos por el periostio, una capa de tejido conjuntivo especializado dotada de potencia osteogénica. La cavidad medular de la diáfisis y las cavidades del hueso esponjoso están revestidas por el endostio, una fina capa celular que también posee capacidad osteogénica (Fawcett y col, 1995).

Según su forma anatómica los huesos pueden clasificarse en planos, cortos y largos. Los planos son las costillas, esternón, escápula, ilíaco y la mayor parte del cráneo. Los cortos se localizan fundamentalmente a nivel de la columna vertebral, carpo y tarso. Los huesos largos o tubulares son huecos y casi cilíndricos, conteniendo la cavidad medular en su interior. A sus extremos se los denomina epífisis, siendo la metáfisis, el sector entre las 2 anteriores. Están representados por las falanges, metacarpianos, metatarsianos, fémur, tibia, peroné, radio, cúbito y húmero, formando parte del esqueleto apendicular.

En nuestro ensayo clínico serán tratadas fracturas de huesos largos: fémur, tibia y húmero.

Microestructura

La microestructura ósea la representan canales vasculares circunferencialmente rodeados por hueso laminar, constituyendo el sistema de Havers, cuya unidad anátomo-funcional es el osteón, cilindro irregular y surcado con anastomosis, compuesto por un canal neurovascular central longitudinal y rodeado por células de la matriz ósea (Kaplan,1994). Los canales haversianos se comunican unos con otros y con la superficie o la cavidad medular por medio de canales transversales u oblicuos llamados canales de Volkmann (Fawcett,1995)

Las laminillas se componen de fibras colágenas mineralizadas con una orientación ortogonal que aumenta la resistencia ósea. De una forma simplificada se puede decir que las fibras de colágeno resisten las fuerzas de tracción y que la matriz mineral resiste la compresión (Alberts,1989)

La fase mineral representa el 70% de la matriz compuesta principalmente por fosfato y calcio que forman estructuras cristalinas de hidroxiapatita (Erikson y col, 1994)

Aproximadamente el 90% de la matriz orgánica está compuesta por colágeno tipo I; el resto consiste en proteínas unidas al colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas, lípidos y otras macromoléculas.

La asociación de hidroxiapatita con fibras colágenas es responsable de la dureza y resistencia del tejido óseo.

El conocimiento del aspecto estructural tanto macro como microscópico resulta de primordial importancia en nuestro trabajo, ya que en él hemos utilizado tejido óseo procesado como implante.

Células óseas

Las células de tejido óseo adulto necesarias para su formación, mantenimiento estructural y remodelación, están representadas por tres tipos diferentes: *osteoblastos*, *osteocitos* y *osteoclastos*. Sin embargo, el hueso como órgano, contiene varias líneas celulares que explican el proceso de remodelación del hueso (turnover), su capacidad de autoregeneración, su capacidad hematopoyética y su participación en el metabolismo mineral del organismo.

Osteoblastos, osteocitos

Los osteoblastos derivan de las células osteoprogenitoras que persisten hasta la vida postnatal. Producen matriz ósea, que está predominantemente formada por colágeno tipo I, además de secretar proteoglicanos, osteocalcina, osteonectina y osteopontina (Kaplan,1994; Fawcet ,1995). Cuando los osteoblastos culminan su función de síntesis de proteínas óseas, pueden diferenciarse como células que cubren la superficie del hueso recién formado (*lining cells*), sufrir apoptosis o permanecer incluidos en la matriz y convertirse en osteocitos (Chiappe, 2004; Monnet, 2011).

Los osteocitos son osteoblastos maduros incluidos en la matriz ósea mineralizada. Son las células más abundantes del hueso (más del 90% del total) y están distribuidas volumétricamente en forma homogénea. Su cuerpo celular está contenido en espacios dentro de la matriz llamados lagunas osteocíticas o de Howship, y sus extensiones citoplasmáticas se comunican con los osteocitos vecinos y con las *lining cells* que cubren la superficie del hueso, a través de los canalículos ya referidos. Debido a su localización estratégica y a su capacidad

de comunicarse con otras células cumplen una función mecanosensora, captan fuerzas y transmiten señales que optimizan la rigidez ósea, determinando la remoción de hueso donde mecánicamente es innecesario (mediante la acción de osteoclastos) y aponiendo donde es necesario reforzar de acuerdo al régimen de cargas (Ley de Wolf y Delpech)

Osteoclastos

Estas células son parte del sistema macrofágico; su función es la reabsorción del hueso, retirando primero el contenido mineral y luego la matriz orgánica (Fawcett, 1995; Porth, 2007)

Las células antes mencionadas derivan de la médula ósea (Pérez y col, 2010); de ahí la importancia de ésta en los mecanismos de reparación del hueso y de su preservación cuando se realizan métodos de osteosíntesis. El implante biológico empleado en nuestro trabajo de investigación –como luego veremos-, al ser utilizado en forma intramedular está en contacto directo con ella, lo que explica gran parte de las interacciones biológicas implante-células mesenquimales.

Médula ósea y células mesenquimales troncales

La médula ósea es un órgano formado por una red de capilares sanguíneos en un estroma de tejido conjuntivo y una población celular de variada progenie. Dispuesta en el interior del hueso, sufre variaciones en su distribución en diferentes huesos y en su celularidad (tipo y densidad) en el curso de la vida. Dentro de esta intrincada matriz encontramos 2 grupos principales de células: las *hematopoyéticas* y las que Friedenstein y colaboradores identificaron por primera vez en 1966 y denominaron células troncales de la médula ósea y que posteriormente fueron denominadas *células estromales mesenquimales* (MSC, su sigla en inglés) por Kaplan en 1991. La capacidad osteogénica de la médula ósea se debe fundamentalmente a estas células que se clasifican en 2 tipos:

Tipo 1 inducidas

Son aquellas MSC indiferenciadas que mediante estímulos locales son pasibles de formar hueso. Ellas también se encuentran en muchos otros tejidos de la economía (tejido adiposo y muscular, entre otros).

Tipo 2 determinadas

Son células diferenciadas a una línea de progenie osteoblástica. Se hallan solo en el endostio y en el estroma de la médula ósea (Takagy y Urist, 1982; Bojrab, 1996; Junquera y col, 2004; Slatter, 2006).

A la luz de las últimas investigaciones se logró determinar la capacidad osteogénica que posee la médula ósea. En ella participan tanto los elementos celulares que en ella se encuentran, como los factores de crecimiento liberados por estos.

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son polipéptidos o glucopéptidos 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 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 de tipo endocondral (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 TGF- β está presente en la reparación normal de las fracturas, tiene actividad promotora de la mitosis, la angiogénesis y también promueve la diferenciación celular (Gil y col., 2003).

Los PDGF tienen como principal actividad la mitogénica. Se han aplicado experimentalmente en conejos demostrando un efecto estimulador en la reparación de osteotomías, incrementando el volumen y la densidad del callo óseo. Otros estudios en ratones han demostrado un aumento concomitante en la reabsorción ósea (aumento de la remodelación) (Gil y col, 2003).

Las BMP (bone morphogenetic proteins) constituyen un grupo de morfógenos de particular relevancia en la organogénesis ósea. Presentes en los huesos de todos los vertebrados, son responsables de la capacidad de autoreparación del hueso (Urist, 1965).

Los implantes de hueso xenogénico bovino procesado utilizados en nuestros ensayos clínicos demostraron indirectamente su contenido en BMP, a través de su capacidad osteoinductora sistemática (Zunino y col, 2004; Semiglia y col, 2006)

Resulta de particular interés destacar la interacción funcional entre el hueso y la médula ósea. Las células estromales de la médula ósea 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 estudios experimentales en perros, monos y humanos, que la matriz ósea conteniendo

estas células estromales sin la exposición a determinadas proteínas inductoras de la osteogénesis, 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 médula ósea. Es a este nivel que se produce la mayor interacción entre las células estromales de la médula ósea con el hueso, estableciendo un “consorcio hueso- médula ósea”, en el cual un tejido sirve al otro en el proceso de regeneración ósea (Urist, 1989).

A través de nuestro ensayo clínico-experimental trataremos de demostrar que el tipo de implante que utilizaremos tiene -a la vez que una función de fijación de las fracturas-, una actividad osteogénica *per se*, por su interacción biológica en su sitio de implante.

LA FRACTURA COMO ENTIDAD PATOLOGICA Y SU MECANISMO BIOLÓGICO DE REPARACION

La fractura es una solución de continuidad del hueso, acompañada por un grado variable de lesión de tejidos blandos circundantes, irrigación, inervación y masas musculares, con la consiguiente pérdida o limitación funcional (Piermattei et al 2006)

Un hueso en condiciones normales soporta determinadas fuerzas que son el resultado de las presiones o carga 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 soportar 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).

Mecanismo biológico en la reparación de fracturas

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 solo 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; Martínez 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).

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 la 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:

- 1 callo sanguíneo/inflamación
- 2 callo fibroso
- 3 callo óseo
- 4 remodelación.

La inflamación comienza luego que se produjo la fractura (Bojrab, 1996; Martinez y Walker, 1999; Slatter, 2006). Se inicia a causa del daño a los tejidos blandos circundantes, al periostio, al endostio y al contenido medular que actúa como una fuente de material extraño (Martínez 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 (productores de 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 horas el hematoma contiene mediadores químicamente atractivos, químicamente 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 interleucina 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 (ciclo de la remodelación) (Bojrab, 1996; Martínez 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 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 liberados durante la destrucción del material desvitalizado, 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 (colágeno), 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 óseos (Bojrab, 1996; Martínez 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 el proceso de 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. Estos acontecimientos se corresponden con la fractura cicatrizada, tanto a nivel clínico como radiológico. A partir de aquí comienza la fase de remodelación con reconstrucción ósea (Bojrab, 1996; Toal y Mitchell, 2003; Slatter, 2006).

El remodelado comprende la resorción de los excesos de callo óseo que se desarrollan en el espacio medular y rodeando el sector externo 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).

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).

TRATAMIENTO DE LAS FRACTURAS

El objetivo de tratar una fractura es neutralizar las fuerzas que provocan inestabilidad en el foco impidiendo que la cicatrización ósea se lleve a cabo.

La reducción es el procedimiento por el cual los cabos óseos desplazados son llevados a su posición anatómica original. La reducción puede ser abierta o cerrada. Esta última consiste en hacer coaptar los cabos desde el exterior mediante la aplicación de tracción y contracción.

La reducción abierta es el método de elección para un gran número de fracturas. Los fragmentos son reducidos en forma directa mediante un abordaje quirúrgico y luego se le aplica un método de fijación (Denny, 2000). Los objetivos del tratamiento quirúrgico de las fracturas son fomentar la cicatrización, recuperar la anatomía y funcionalidad del hueso afectado y del tejido circundante y así obtener resultados funcional y estéticamente aceptables (Fossum, 2013). Esto se logra en gran medida mediante el uso de implantes de fijación de distintos materiales (Slatter, 2006; Fossum, 2013).

En nuestro trabajo experimental hemos realizado en todos los casos este último tipo de reducción.

Métodos de fijación

Los métodos de fijación pueden estabilizar la fractura de manera indirecta desde el exterior como por ejemplo yesos y férulas o directamente aplicarse sobre el tejido óseo afectado. Estos últimos son los clavos endomedulares, fijadores externos, placas de osteosíntesis y alambres de cerclaje

Placas de osteosíntesis

Este método consiste en la utilización de placas que por medio de tornillos son fijadas al hueso. La finalidad es servir como guía para mantener la alineación de la fractura mientras se produce la cicatrización de la misma (Toal y Mitchell, 2003). Correctamente aplicadas producen buena estabilidad en el sitio de fractura. Resisten bien la tensión, compresión y las fuerzas rotacionales que se aplican sobre el eje esquelético de un miembro (Slatter, 2006; Fossum, 2009).

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

Enclavijado intramedular

Senn en 1893 y luego Hey-Groves en 1914, reportaron los primeros casos relacionados a la fijación intramedular para el tratamiento de fracturas. Sin embargo, fueron los hermanos Rush en Rochester, Minnesota, al mismo tiempo que Gerard Kuntscher en 1943 en Alemania, los reconocidos como los verdaderos pioneros en la fijación con clavos intramedulares (Rush y Rush, 1937; Morales y Sosa, 2005; 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 los implantes, 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 Kuntscher, cuyo diseño es levemente cónico, son huecos y su sección transversal tiene forma circular, 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 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 trabado 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; Piermattei y col, 2007; Fossum, 2009;). 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 medula ósea y el endostio, lo cual afecta la capacidad osteogénica que será necesaria para la reparación de la fractura. Un clavo que ocupe el 30% de la cavidad medular es lo que se aconseja para no afectar la medula 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 sí 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 diafisarias (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. (Bojrab, 1996; Toal y Mitchell, 2003).

Fijación esquelética externa

La fijación esquelética externa es un medio de estabilización de fracturas mediante clavos de fijación percutáneos que penetran por dentro de las cortezas óseas y son interconectados externamente por medio de barras para formar un marco estabilizador. La nomenclatura del aparato de fijación externa depende de los componentes usados y su disposición geométrica.

La configuración más simple consiste en clavos de fijación que pasan por un lado del miembro y por ambas cortezas; estos se denominan medios clavos y pueden conectarse a una barra para formar una férula tipo 1.

Los clavos de fijación que pasan por ambos lados del hueso son llamados completos. Los clavos se conectan entre sí para formar un aparato tipo 2. La configuración tipo 2 es muy resistente a las fuerzas compresivas pudiéndose utilizar en fracturas relativamente inestables.

Se pueden combinar los aparatos tipo 1 y 2, siendo esta la configuración más rígida de las que se utilizan en la actualidad; casi 10 veces más resistente que la tipo 1 y siendo de elección en fracturas abiertas o conminutadas muy inestables.

En nuestro trabajo hemos combinado un dispositivo de fijación esquelética externa con un implante intramedular óseo xenogénico.

EVALUACION CLINICO- RADIOLOGICA DE LAS FRACTURAS

Muchas veces la fractura no es la entidad patológica más importante en un paciente dado, ya que su etiología puede ser un traumatismo y por lo tanto en el paciente pueden verse afectados más órganos de la economía, como por ejemplo los aparatos circulatorio y 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 determinar el tipo de fractura y sus posibles complicaciones (Fossum, 2007).

En el presente trabajo todos los pacientes se encontraban estables desde el punto de vista respiratorio y hemodinámico al momento de realizar los procedimientos quirúrgicos de reducción y fijación de sus fracturas.

Una de las complicaciones más graves que puede presentarse a nivel del sitio de fractura es la exposición del o los cabos óseos; a este tipo de fractura se le denomina abierta o expuesta y tiene gran riesgo de infección por la contaminación bacteriana exógena. Además, la exposición puede provocar daño vascular y/o neural, ensombreciendo el pronóstico (Bojrab, 1996; Slatter, 2006).

En nuestra casuística, intervinimos 3 casos de fractura abierta.

Luego de iniciado el tratamiento de la fractura con los métodos descritos anteriormente, debemos seguir la evolución clínica de la cicatrización ósea, siendo uno de sus parámetros, el retorno a la función del miembro. Toda fractura en el sistema locomotor produce una claudicación. Definimos claudicación como la interferencia en la locomoción normal de un animal, que generalmente afecta el mecanismo de propulsión de uno o más miembros. La claudicación puede ser causada por dolor o por un intento del animal de reducir el dolor, el cual de ordinario ocurre durante la fase de contacto con el suelo. También la elevación (protracción) a veces causa dolor e interferencia con la marcha y hasta se le denomina claudicación por elevación. Existen varias escalas para evaluar el grado de claudicación; en nuestro trabajo utilizaremos la escala del 1 al 5 (Miles, Levine y Taylor 2004) .

Luego de la intervención, el examen clínico del paciente es de gran utilidad para valorar la buena evolución del callo que consolidará la fractura. La ausencia de inflamación y dolor, así como el apoyo del miembro afectado son parámetros que indican la formación de un callo primario firme, lo que lleva a que paulatinamente mejore el puntaje en la escala de claudicación.

La radiología es una herramienta indispensable en ortopedia no sólo para determinar la existencia de una fractura u otra anomalía ósea, sino también para observar el proceso de reparación. En la evaluación radiográfica de la osificación secundaria -que es la evaluada en las primeras etapas de la formación del callo puente es subestimada porque la reparación fibrocartilaginosa no es visible, aunque si funcional. Esto explica en parte la discrepancia entre la palpación de un gran callo y la visualización radiográfica de un puente radiopaco relativamente pequeño.

La maduración del callo fibrocartilaginoso produce la desaparición radiográfica de la línea de fractura, apareciendo un área de radioopacidad similar a la del hueso adyacente.

La evaluación radiológica de las fracturas constituye el examen paraclínico de elección y el que utilizamos en nuestro experimento para la valoración de consolidación.

Las sales minerales principalmente calcio y fósforo le dan al hueso su densidad y apariencia “blanca” en las radiografías. Radiológicamente la fractura se observa como interrupción en la continuidad, apareciendo las líneas de fractura radiolúcidas. El incremento de densidad es llamado esclerosis y normalmente es la respuesta del hueso a un agravio; en el caso de una fractura, el hueso incrementa su densidad a lo largo de las líneas de stress, o sea, las fuerzas que se aplican sobre este después que se logra la reducción. La respuesta a la

formación de callo se evalúa como ausente, parcial o total y es acorde con el grado de opacidad observado en el defecto óseo.

En nuestro trabajo, hemos evaluado la consolidación ósea por parámetros radiológicos y clínicos.

ANTECEDENTES

Estrategias para la reparación ósea

El conocimiento de los mecanismos por los cuales el tejido óseo se repara ha llevado a que en el tratamiento de la fractura se potencien y estimulen los componentes biológicos que intervienen en la cicatrización, preservando la irrigación e inervación, así como el “microclima osteogénico”. A esta nueva tendencia de la ortopedia se le llama osteosíntesis biológica. Cuando hablamos de osteosíntesis biológica nos referimos a la mínima intervención del cirujano para contribuir a la reparación ósea, basándose en la preservación, promoción y potenciación de los procesos que ocurren naturalmente en el organismo (Rosental y col,1999; Palmer, 1999).

Hay distintas estrategias que se emplean con este fin:

Osteogénesis- Es la transferencia de células al foco de fractura; la forma más conocida es el injerto de hueso esponjoso autólogo siendo este el “gold standard” de los materiales osteogénicos. Otro ejemplo de material osteogénico es la médula ósea; los aspirados de médula ósea contienen stems cells (MSCs) y plaquetas que pueden ser aplicados en el foco fractuario.

Osteoinducción- Los materiales que tienen la capacidad de inducir la formación de hueso en un sitio donde son inexistentes o se desea incrementar los existentes, son denominados osteoinductores. Estos materiales tienen la capacidad de reclutar MSCs y su progenie que infiltran el sitio mediante quimio atracción y migración. El material más conocido es la matriz proteica desmineralizada (MPD) que contiene proteínas osteoinductoras, como la proteína morfogénica ósea (BMP). Estas inducen a las MSC a transformarse en condroblastos y osteoblastos (Zunino y col, 2012).

Osteoconducción- Se refiere al mecanismo por el cual se produce una migración vascular primero y luego de células condrales y finalmente osteoblásticas, entre el hueso del receptor y el material óseo, osteosímil u osteoderivado injertado o implantado. Los materiales pueden ser sintéticos como las cerámicas o biológicos como el utilizado en nuestro experimento.

Osteopromoción- Puede definirse como el empleo de sustancias o estímulos físicos que son capaces de favorecer la formación de hueso induciendo la formación, proliferación y diferenciación de MSC hacia la línea osteoblástica. Un buen ejemplo de osteopromoción es la utilización de plasma rico en plaquetas (PRP); los gránulos alfa de las plaquetas son ricos en factor de crecimiento plaquetario y factor de crecimiento vascular, potentes agentes quimio tácticos y de diferenciación celular.

Los estímulos físicos en el foco de fractura durante la formación del callo, como el aumento de presión provocado por el apoyo precoz (carga) del miembro, estimulan también la diferenciación y proliferación de las MSCs. En el centro del callo óseo las MSCs son sometidas a una gran presión mecánica que se traduce en un aumento de presión intracelular que las estimula a diferenciarse en condroblastos, mientras que en la periferia del callo la presión es menor y se diferencian en osteoblastos. El implante utilizado en nuestro experimento estará ubicado en el centro del callo óseo.

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

Injertos e implantes óseos

Definimos injerto como la trasposición de un tejido viable de una parte a otra del cuerpo en el mismo individuo (autoinjerto); de un individuo a otro de igual (aloinjerto) o diferente especie (xenoinjerto) o de un individuo a otro genéticamente idéntico (singénico) (Blood y Studdet,1988; Weigel,1993; Martínez y Walker,1999; Piermattei y col, 2007)

Definimos implante biológico como la trasposición de tejidos o materiales biológicos desvitalizados (Zunino 2010)

Reservamos el término trasplante, para designar la translocación de órganos viables pediculados.

Es nuestro interés por las características de nuestro modelo experimental, hacer referencia a los injertos e implantes óseos o de material osteoderivado. Las características de un injerto óseo ideal están dadas por sus propiedades que favorecen la osteogénesis; principalmente, constituir un estímulo osteoinductivo y actuar como un transportador y molde para que las células, vasos y nervios del huésped rehabiliten el injerto, reparando el hueso mediante la neo - vascularización (Bojrab y Monnet, 2001; Gil y col, 2003)

Los injertos e implantes deben además ser compatibles inmunológicamente o inertes, de modo de no desencadenar un rechazo o respuesta inmune por parte del receptor (Gil y col, 2003)

Los injertos óseos se pueden clasificar de acuerdo a su estructura en: esponjosos, corticales o cortico-esponjosos.

El autoinjerto más utilizado fresco es el de hueso esponjoso; éste favorece la viabilidad de células osteogénicas y MSCs, que son capaces de nutrirse por difusión. Además, la gran superficie y la amplia red trabecular que presenta el hueso esponjoso lo convierten en un injerto más apto para el crecimiento de vasos y células del huésped en el sitio receptor, respecto de lo que sucede con el hueso cortical, que tiene la característica de ser mucho más denso y compacto. Por el mismo motivo el hueso esponjoso ofrece mucho menor resistencia mecánica que los injertos corticales.

Es hecho bien conocido que la utilización de injertos autogénicos de hueso, si bien son considerados los injertos ideales por su capacidad osteoinductora, osteoconductora y biocompatibilidad (Di Sevo, 2014), determinan un aumento de morbilidad en los pacientes vinculada a tiempos operatorios más prolongados y complicaciones adicionales en el sitio de la obtención o área dadora (segunda incisión, sangrado, dolor e infección.) (Di Sevo, 2014).

Los autoinjertos corticales son de más difícil obtención ya que requieren abordajes más grandes, lo que demanda más tiempo quirúrgico, así como de cicatrización del lecho.

Los injertos óseos singénicos aun no son utilizados en la práctica clínica habitual. Actualmente se los emplea sólo a nivel experimental (Zunino, 2010).

En las últimas décadas se han estudiado diferentes alternativas al injerto de hueso autógeno. Matrices de hueso fresco, congelado, liofilizado y desmineralizado de fuentes alogénicas, han sido muy utilizadas (Friedlaender, 1981; Heiple y col, 1987), así como también el hueso autoclavado. Sin embargo, este tipo de injertos e implantes no procesados 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). Las matrices de hueso autoclavado tienen una actividad biológica insuficiente, son potencialmente inmunogénicos y pueden producir una reacción inflamatoria considerable. (Dongyang y col., 2010). Otro problema incluye el riesgo de infección, un remodelado inadecuado con subsecuente falla en la biomecánica del hueso, así como el riesgo potencial de transmisión de enfermedades (Basset y col, 1962; Hallen, 1966; Friedlaender y Goldberg, 1989; Dongyang y col, 2010).

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 dificultosa y hasta imposible la utilización de implantes óseos alogénicos frescos. Es así que en la última década se ha utilizado en nuestro medio, tanto a nivel experimental como clínico, hueso xenogénico de origen bovino procesado, liofilizado y desantigenizado (Zunino y col, 2004; Semiglia y col, 2006).

En el siglo pasado, algunos estudios afirmaban que el implante de hueso xenogénico carecía de 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, 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, 2010).

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 osteogénesis está bien establecida, tiene poco efecto sobre el implante, en contraste con una respuesta inmune temprana (Elves y Salama, 1974).

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

Biocompatibilidad

Biocompatibilidad es la capacidad o propiedad de un material de llevar a cabo su función junto a una respuesta biológica apropiada, ante una situación específica. La importancia de la bioabsorbibilidad fue jerarquizada históricamente por algunos de los primeros cirujanos como el caso de Joseph Lister quien fundamentó el hecho de que los materiales para suturas que en ese momento no eran absorbibles actuaban como “nido” de infección.

En las dos últimas décadas los materiales bioabsorbibles han sido utilizados y experimentados en diferentes áreas de la cirugía ortopédica como alternativa para la fijación de las fracturas, artrodesis, osteotomías y lesiones en los ligamentos y meniscos. Este tipo de materiales fueron ideados para eliminar la necesidad de una segunda intervención quirúrgica destinada a la remoción de los implantes, ya que los mismos tienen la finalidad de proveer la rigidez suficiente para que el hueso comience a sanar, mantener sus propiedades mecánicas mientras que el hueso forma callo óseo primeramente y luego inicia su degradación o periodo de reabsorción. Los materiales bioabsorbibles son la mejor alternativa para el soporte temporal de diferentes tipos de tejido por las siguientes razones:

- En la etapa de reparación de un tejido los implantes absorbibles mantienen propiedades mecánicas requeridas por el tejido a reparar. Con el tiempo, el implante se desintegra gradualmente y las tensiones son transferidas al tejido en cuestión.

- No requieren una segunda intervención quirúrgica para la remoción del implante.

- Después de la reabsorción del implante los riesgos o complicaciones a largo plazo relacionados con el implante pueden ser reducidos.

El objetivo de las distintas técnicas de restauración de defectos óseos y fracturas es conseguir la regeneración y consolidación de los mismos restaurando la anatomía original lo más posible y recuperando al mismo tiempo el máximo de funcionalidad del hueso.

Para poder concebir la utilización de hueso xenogénico como elemento biocompatible de osteosíntesis debemos definir sus características como material de xenoimplante, su comportamiento biológico y su antigenicidad en el organismo receptor.

Procesamiento de implantes óseos xenogénicos

El procesamiento de hueso de origen xenogénico, debe transformarlo en un sustituto óseo apto para implantes, libre de antígenos, biocompatible y con capacidad osteoconductiva y osteoinductora. Esto requiere de varias etapas críticas a tener en cuenta.

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

Un factor crucial en los implantes biológicos lo constituye la preservación de las proteínas osteoinductoras (actividad BMP) en el material óseo (Friedlander, 1995). Esto depende en gran parte de la forma mediante la cual el material es procesado, debiendo incluir la utilización de inhibidores de enzimas proteolíticas 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 y álcalis (Aspenberg y Thoren, 1990).

La desmineralización parcial de los implantes (Urist, 1965) permite también aumentar el grado de deslipidización de los mismos (Aspenber y Thoren, 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 implante juega un rol muy importante en la diferenciación osteoblástica de las células tronco (Mauney y col, 2005). Sin embargo, la desmineralización de tornillos hechos de hueso alogénico cortical humano, en el estudio realizado por Actis y col. en el año 2004, muestra que éstos son afectados en sus propiedades mecánicas, perdiendo la resistencia en el curso del tiempo.

Históricamente se han ensayado- con éxito variable- varias formas de productos óseos y osteoderivados. Como ya fuera referido, "Kiel bone" es un producto comercial que consiste en hueso desproteinizado obtenido de terneros sacrificados recientemente (frescos). El hueso se lava con agua, se extraen las partes blandas, se macera mediante oxidación con peróxido de hidrogeno y se trata con solventes grasos para luego secarse con acetona. Finalmente es esterilizado con radiación Gamma (Salama y Weissman, 1978). Otro producto comercial es el "Oswestry bone" que es hueso totalmente desproteinizado mediante peróxido de hidrogeno 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 comercial, "Tutoplast", de hueso esponjoso bovino en bloques, el cual para disminuir su antigenicidad ha sido sometido a un proceso químico que asegura su biotolerancia, pero también reduce su potencial osteoinductivo (Schultheiss y col, 2005). Zunino y col (2004) han comprobado la ausencia de antigenicidad del material bovino procesado, tanto a nivel experimental como clínico en el relleno de defectos óseos en caninos, con resultados exitosos. Este procesamiento será descrito con detalle más adelante ya que será el utilizado en nuestro trabajo experimental. El método ha demostrado conservar la capacidad osteogénica y osteoinductora de los implantes.

Sin embargo, debemos destacar que el proceso estandarizado de esterilización final de estos implantes (irradiación gamma), conlleva cierto menoscabo en las propiedades físico-biomecánicas de los mismos. En este sentido, muchos bancos de tejidos particularmente en Europa utilizan métodos alternativos de esterilización del material óseo. En nuestro medio y *a posteriori* del inicio del presente estudio clínico, se ensayó experimentalmente (Zunino y col, 2012) el uso del ácido peracético-alcohólico como agente desinfectante de productos biológicos. El ensayo de osteoinducción de material óseo esterilizado con dicho agente demostró en forma inequívoca, la conservación de la capacidad osteoinductora de los huesos tratados en implantes heterotópicos en el ratón. Este agente desinfectante no genera alteraciones físicas en el hueso, constituyéndose en una alternativa económica, segura y eficaz a la irradiación gamma.

Antecedentes de la utilización de hueso xenogénico en ortopedia

Hancox y col en 1961, demostraron a nivel experimental que el injerto de hueso xenogénico desproteinizado, cuando es usado para llenar defectos y como un puente para las brechas óseas, da tan buen resultado como uno alogénico fresco, incluso como el material autógeno. Rosenthal y col (1999) afirman que el implante de hueso bovino desmineralizado ofrece una alternativa para el tratamiento de no uniones (pseudoartrosis), quistes óseos y lesiones fibrosas en el hueso.

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 (scaffold) para las células, ha demostrado de alguna forma facilitar la osteogénesis (Salama y col, 1973). Se ha sugerido que el injerto de hueso

xenogénico desproteínizado no solo 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 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. Otros estudios muestran que la osteoinductividad *in vivo* de un andamio de matriz de hueso bovino o su implantación en biocerámicas tridimensionales (Derubeis y Cancedda, 2004) puede ser modulada por la incorporación *ex vivo* de células tronco pertenecientes a médula ósea humana (Mauney y col, 2005).

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 humanos. 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 solo en 2 de aquellos en los que se utilizó el xenoinjerto. Se produjo asimismo 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). Mas adelante, Zunino y col (2011) compararon la respuesta osteogénica (mediante osteoinducción y neo formación 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 en cambio osteogénica.

En el siglo pasado, algunos estudios afirmaban que el implante de hueso xenogénico no tenía potencial osteogénico (Chalmers, 1959) y provocaba 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).

Zunino y col en 2004, utilizaron también hueso de conejo desantigenizado como implante xenogénico en ratas. Estos implantes fueron previamente incubados a 37°C por 72 horas, en un baño conteniendo inhibidores enzimáticos y buffer fosfato. Luego se los trató con pepsina y ácido clorhídrico a 22°C durante 6 horas, hasta que la solución llegó a un pH de 8, y luego se trató con hidróxido de sodio durante 6 horas 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 de escasa entidad que no afectó la osteoinducción ni la remodelación ósea.

La utilización de xenoinjertos/implantes en Medicina Veterinaria ha sido limitada en el siglo pasado por dos factores: eventualidad de morbilidad (infección y rechazo) y disponibilidad de material biológico (Semiglia et al,2006).

La osteosíntesis biológica con material xenogénico

Han sido publicados 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 humanos, se concluyó que estos tornillos brindan una estabilidad comparable con los dispositivos de fijación metálicos. Las ventajas de ellos pueden ser atribuidas a la bioconversión que presentan y a la falta de necesidad de una nueva cirugía para su remoción. Además, se comprobó que su tratamiento térmico previene eventos 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.

La bibliografía registra trabajos en los que se realizó la colocación de clavos intramedulares xenogénicos hechos con hueso cortical bovino en gatos para tratamiento de fracturas, en los que se concluye que este método no brinda ningún tipo de complicaciones clínicas (Penha y Padilha, 1998), haciendo de esta técnica una posible alternativa a los implantes metálicos, a la vez que disminuyendo los costos de la cirugía y brindando excelentes resultados clínicos (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 osteoartritis secundaria a los métodos convencionales de fijación. Se logró demostrar una mejor reparación cuali y cuantitativa del tejido 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 estos autores, 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 xenoimplantes corticales de hueso (de avestruz o de caninos) para la estabilización de fracturas en palomas, no demostró diferencias

biomecánicas estadísticamente significativas con aquellas que fueron estabilizadas con clavos de acero inoxidable de tipo Kirschner. El hueso estabilizado con el xenoimplante 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 la consolidación de 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 testado sin un tratamiento adicional, mientras que otro grupo fue deslipidizado y secado con una solución de acetona. Dentro de este grupo, se hicieron dos subgrupos donde uno fue autoclavado a 121°C durante 20 minutos y otro donde se autoclavaron a 134°C durante 8 minutos. 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 este tipo sin provocar reacciones adversas (Kilic y Timurkaan, 2004).

Otro aspecto de interés resulta del estudio de la forma en que la angiogénesis puede verse afectada por la utilización de vástagos intramedulares hechos de hueso bovino tratados con peróxido de hidrogeno al 3 % y esterilizados mediante óxido de etileno, comparándolo con los casos 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. Esta condición resulta muy relevante, ya que esta fuente junto con la perióstica, son de gran trascendencia para la nutrición del callo (Dehghani y col. 2004). En otro estudio, 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)

En nuestro país se ha utilizado xenoimplante bovino experimentalmente en forma exitosa (ausencia de rechazo acompañado de aumento de osteogénesis)

en roedores. (Zunino y col, 2004). En una etapa ulterior, se utilizó clínicamente en perros y gatos como relleno en defectos óseos (Semiglia y col, 2006). También se ha reportado el uso en nuestro medio de hueso xenogénico procesado en casos clínicos de cirugía maxilo-facial en humanos (Zunino et al 2012). Los autores utilizaron dicho material con excelentes resultados en reconstrucciones del seno maxilar y defectos alveolares para la colocación de implantes de titanio en fijaciones protésicas.

De particular importancia resulta resaltar las propiedades físicas y biomecánicas del hueso xenogénico procesado de origen bovino, más allá de sus características biológicas (osteoinducción, osteoconducción y ausencia de antigenicidad). Este material presenta propiedades físicas y biomecánicas que hacen muy adecuada su utilización como material de osteosíntesis en pequeños animales. En un estudio realizado en nuestra Facultad de Ingeniería (Zunino et al 2011), la densidad del hueso bovino cortical procesado fue calculada en 1,787 g/cm³. Los tests de flexión (bending) mostraron un valor promedio de 1,8 mm luego de una carga de 18 kg (stress). Los tests de tracción provocaron rotura del material con una carga de 360 kg luego de un estiramiento promedio de 1,2 mm. El módulo de Young calculado para el hueso procesado fue de 6.900 MPa (mega pascales) para tracción y de 9.500 para flexión (bending).

Basados en el análisis de la documentación bibliográfica, así como en la experiencia favorable generada en nuestro medio en el uso de material óseo xenogénico desantigenizado, nos propusimos evaluar este material como implante biológico de osteosíntesis en fracturas de huesos largo en caninos.

CARACTERIZACION DEL PROBLEMA E HIPOTESIS

La utilización de clavos intramedulares metálicos en cirugía ortopédica de pequeños animales ofrece como desventaja que no pueden ser utilizados en fracturas abiertas porque diseminan la infección dentro del canal medular, no intervienen en la estimulación del proceso osteogénico y luego de consolidada la fractura deben ser extraídos del paciente.

No existen antecedentes en medicina veterinaria de la utilización de un clavo intramedular que interactúe positivamente en el proceso osteogénico, que pueda ser utilizado en fracturas abiertas y que no deba ser extraído.

La hipótesis que sustenta nuestro trabajo puede enunciarse de la siguiente forma: la utilización de un vástago intramedular fabricado de hueso bovino desantigenizado puede contribuir a la consolidación de fracturas diafisarias en caninos, ofreciendo ventajas con respecto a la utilización de implantes metálicos. como la de poder ser utilizado en fracturas abiertas y de no tener que proceder a su extracción luego de consolidada la fractura.

OBJETIVOS

Objetivo general

Diseñar un método de osteosíntesis biológico en fracturas diafisarias en huesos largos en el perro, en base a un implante xenogénico osteoinductor y biomecánicamente resistente.

Objetivos específicos

1. Obtener, desantigenizar, preservar y esterilizar hueso cortical bovino con forma de vástago, para utilizarlo como “clavo” biológico de osteosíntesis.
2. Lograr la manufactura de un implante biológico que brinde un adecuado soporte mecánico con resistencia y adaptabilidad al sitio de implantación.
3. Estandarizar un método de colocación de dicho implante lo menos invasivo posible para evitar la desvitalización del tejido óseo y los tejidos blandos circundantes, a efectos de evitar un retardo en la consolidación ósea.
4. Determinar si el implante proporciona la estabilidad mecánica suficiente al foco de fractura o es necesario adicionar otro medio de fijación.
5. Evaluar su comportamiento biológico como estimulante de la consolidación ósea.
6. Evaluar la eficacia clínico-funcional de este método en el perro.
7. Evaluar su osteointegración a los 90 días de su colocación.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de los implantes

La preparación de los implantes se realizó en el Instituto Nacional de Donación y Transplante de Células, Tejidos y Órganos.

El fémur y tibia de un bovino joven fueron obtenidos en un matadero certificado y enfriados de inmediato (- 80°C). Los huesos largos fueron desprovistos de partes blandas y cartílago y luego cortados en fragmentos lineales de 2,3 cm de espesor, 4 mm de ancho y 15,2 y 25 cm de largo. Se obtuvieron así fragmentos de material óseo cortical de forma prismática rectangular. El material fue lavado abundantemente con agua destilada y solución de azida de sodio (10 mMol/L). Luego fue tratado con solución de ácido clorhídrico 0.6 N a 22°C por 16 horas. Luego de nuevo lavado con agua destilada, el material fue deslipidizado con mezcla de alcohol de 95 grados y éter etílico 1:1 por 24 horas, a temperatura ambiente. Los huesos luego fueron incubados a 37°C por 72 horas en baño de fosfato buffer, según técnica de Urist (Urist y col, 1975). Luego fueron tratados

con pepsina (Pepsina, Sigma, USA) 1: 100 peso a peso enzima: matriz. La actividad de la pepsina fue detenida aumentando el pH de la solución a 8.0 con hidróxido de sodio 0.1 N por 6 horas a 4°C. Los fragmentos óseos se lavaron con agua destilada y luego se liofilizaron (Liofilizador Labconco, Mod.Lyph-Lock, USA) a una presión de vacío de 0.13 x 10 Mbar (milibares) y temperatura de -50°C por 72 horas. El material destinado al implante fue luego envasado en triple bolsa de polietileno de 60 micrones de espesor e irradiado a una temperatura de congelación de -60°C con dosis de 25 KGy (kilogray) de cobalto 60, con fines de esterilización. Los controles microbiológicos de muestras de control post irradiación mostraron ausencia de gérmenes en los cultivos para aerobios y anaerobios (Zunino, 2010).

Controles de calidad

La medida de agua residual en las muestras de control de material óseo liofilizado fue evaluada por la diferencia ponderal del material antes y después de ser sometido a calentamiento rápido a 120°C en horno, obteniéndose un valor de 4% de residuo hídrico en las muestras.

La medida de lípidos residuales fue realizada por el método de Soxhlet (Luque de Castro y col 1998), que arrojó un resultado de 4 g por cada 100 g de hueso procesado.

Muestras representativas de los implantes óseos fueron previamente biológicamente testados para su capacidad osteoinductora en el modelo murino clásico de implante heterotópico en el cuádriceps de ratón (Zunino, 2010).

Casos clínicos

Se trataron 9 pacientes caninos, de edades entre 4 meses y 11 años, que ingresaron al Hospital de la Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay) presentando fracturas de huesos largos de causa traumática, abiertas o cerradas. Por tratarse de casos clínicos de resolución quirúrgica, no fue necesario la aprobación de la Comisión de Bioética en la Experimentación Animal para la realización del presente trabajo. Sin embargo los propietarios de los pacientes fueron previamente informados sobre el uso del material xenogénico como implante en la osteosíntesis y se recabó su consentimiento explícito para realizar el procedimiento terapéutico.

Cada perro fue sometido a un examen clínico exhaustivo para descartar otras patologías co-existentes asociadas al trauma que ocasionó la fractura. Comprobándose la ausencia de éstas, los pacientes fueron sometidos a un examen radiológico (incidencias frente y perfil del miembro fracturado). Aquellos que presentaron fractura diafisaria de hueso largo fueron seleccionados para el estudio.

Descripción de los casos

Caso 1

Se presentó en el Hospital de la Facultad de Veterinaria un canino raza Caniche de 3 años de edad y un peso de 5,3 kg. Como consecuencia de una lesión no intencional de tránsito presenta una fractura abierta de fémur, que se clasificó como diafisaria, completa, desplazada, cabalgada a nivel de tercio distal. No presentaba otras alteraciones clínicas como consecuencia del traumatismo. El paciente fue sometido a intervención quirúrgica donde se realizó la reducción abierta de la fractura y se procedió a su fijación con la colocación de un implante intramedular de hueso xenogénico y fijador esquelético externo biplanar.

Caso 2

Se presentó en el Hospital de la Facultad de Veterinaria un canino macho, mestizo de 11 años de edad de 18 kg. de peso. El motivo de consulta fue una lesión no intencional de tránsito. Siendo sometido al examen clínico, se diagnosticó una fractura de humero completa que involucraba su tercio proximal, no encontrándose otras lesiones. Fue sometido a cirugía 48 hs. posteriores al trauma, realizándose una reducción abierta de la misma. Se colocó un clavo intramedular xenogénico, asociado a un fijador esquelético externo uniplanar en donde se colocaron 2 clavos de 2 mm de diámetro y 3 clavos de 2 mm unidos por una barra conectora.

Caso 3

Se admitió en el hospital de la Facultad un paciente canino macho mestizo de cuatro meses de edad y 6,30 kg de peso. El mismo había presentado una lesión no intencional de tránsito y el motivo de consulta fue una claudicación tensional grado 4 en el miembro posterior derecho. El examen clínico fue normal salvo por la presencia de una fractura de fémur que radiológicamente se evidenciaba como completa y desplazada a nivel del tercio medio de la diáfisis.

El paciente fue sometido a cirugía en la que se practicó una reducción abierta del foco de fractura con la colocación de un clavo medular xenogénico y un fijador externo uniplanar.

A las dos semanas se extrajo el fijador externo debido a la evidencia clínica de formación de un callo exuberante y la presencia de signos clínicos de contractura del cuádriceps.

Caso 4

Se asistió en el hospital de la Facultad de Veterinaria un canino macho mestizo de 10 años de edad y 12 kg de peso. El motivo de consulta fue una claudicación grado 4 en miembro anterior derecho producida por una lesión no intencional de tránsito. Fue sometido al examen clínico general, no comprobándose otras patologías más que una fractura de húmero.

Los estudios radiológicos revelaron una fractura completa, oblicua ubicada en el tercio proximal de la diáfisis.

El paciente fue sometido a cirugía, realizándose una reducción abierta con colocación de un clavo xenogénico dentro del canal medular asociándolo a un fijador esquelético externo uniplanar.

Caso 5

Consultó en el Hospital de la Facultad de Veterinaria canino macho mestizo de 10 años de edad y 12 kg de peso. El motivo de la misma fue una claudicación en miembro posterior izquierdo luego de una lesión no intencional de tránsito producida 2 días antes.

Luego de realizado el examen completo correspondiente a un politraumatizado y careciendo de otra alteración con compromiso vital, se diagnosticó una fractura de fémur, realizándose el tratamiento quirúrgico de la fractura 5 días después de efectuada la consulta.

Se realizó un abordaje para la colocación de un clavo intramedular de hueso xenogénico de aproximadamente 0,4 cm de diámetro y 6,0 cm de longitud. También se colocó un fijador externo compuesto por 4 clavos de Steinmann de 3 mm de diámetro, 2 a proximal y dos a distal de la fractura, unidos por una barra conectora mediante metilmetacrilato.

Caso 6

Se presentó en el Hospital de la Facultad un canino macho, mestizo, de 5 años de edad y 30 kg de peso. El motivo de consulta fue una fractura abierta en tibia de etiología desconocida. Al examen clínico se pudo comprobar que no presentaba lesiones que le comprometieran la vida. Se procedió a realizar el tratamiento quirúrgico de la misma que consistió en la reducción abierta y la colocación de un implante óseo xenogénico y un fijador esquelético externo uniplanar.

Caso 7

Se presentó al Hospital de la Facultad de Veterinaria un canino macho, cruzado, de 6 meses de edad y 4 kg de peso. Presentaba fractura de fémur abierta grado 3, de etiología traumática, evolucionada, producto de un accidente de tránsito ocurrido 2 días antes.

Se realizó un abordaje craneolateral de la diáfisis femoral. Una vez reducida la fractura se colocó un implante de hueso bovino liofilizado y desantigenizado, el cual ocupó el 80% del diámetro del canal medular y un 60% de la longitud del hueso. El implante intramedular fue colocado en forma retrógrada y luego impactado en el extremo distal del fémur. Para neutralizar las fuerzas de rotación y flexión -que el clavo intramedular no neutraliza- se colocó un fijador externo, constituido por 4 clavos de Steinman de acero 316, de 2 mm de diámetro. Se colocaron 2 clavos en el cabo proximal y 2 en el cabo distal, unidos a una barra conectora mediante metilmetacrilato. Se cubrió el hueso con los tejidos blandos de la zona y se dejó a la herida quirúrgica cerrar por segunda intención, debido a la gran pérdida de tegumento en la zona afectada. Se realizaron RX post-quirúrgicas inmediatas.

Caso 8

Se presentó a Facultad un canino macho, cruza, de 6 meses de edad y peso aproximado de 22 kg. con fractura oblicua en el tercio medio del fémur, producto de un accidente de tránsito sucedido dos días antes.

Luego de realizar el examen general correspondiente a un politraumatizado, y asegurándose que no estaba ningún otro sistema del organismo afectado de tal forma que pudiera comprometerle la vida al animal, se procedió a resolver la fractura mediante cirugía, realizándose 5 días posteriores a la consulta.

Se procedió a la realización de la osteosíntesis del fémur a través de la colocación de un clavo intramedular de hueso bovino de aproximadamente 7 mm de diámetro relativo y 5,5 cm de largo, combinado con un método de fijación externa unilateral. Este fijador consistió en la colocación de dos clavos Steinman de 3 mm de diámetro en el cabo proximal, y dos clavos del mismo tipo en el cabo distal de la fractura, unidos mediante una barra conectora con metilmetacrilato.

Caso 9

Se presentó en el Hospital de la Facultad de Veterinaria un canino macho de 5 años de edad y 37 kg. de peso, raza cimarrón, cuyo motivo de consulta fue una claudicación en miembro posterior derecho ocasionada por una lesión no intencional de tránsito de una semana de evolución. Los rayos X revelaron una fractura diafisaria completa en tercio medio de fémur.

Se procedió a la intervención quirúrgica realizando la reducción abierta, con la colocación de un implante óseo xenogénico asociado a un fijador externo tipo 3.

Técnica quirúrgica

En aquellos pacientes que presentaron fractura abierta se realizó (previo a la cirugía) lavados del foco lesional con suero fisiológico, desbridamiento y limpieza de la herida, con posterior cierre de la misma total o parcialmente con la finalidad de cubrir el tejido óseo lesionado con tejidos blandos viables. Posteriormente se vendó la lesión para mantenerla limpia hasta el momento de la cirugía.

Los procedimientos quirúrgicos se realizaron en block convencional, con las condiciones de asepsia preconizadas para intervenciones ortopédicas (Tobias, 2014). Las drogas anestésicas utilizadas fueron lidocaína a dosis de 4,4 mg/kg peso vivo (PV) intravenosa (IV) y Propofol 4-6 mg/kg PV, IV como inducción; para el mantenimiento se usó Isoflurano a una concentración de 4 %.

Una vez que se realizó la tricotomía del miembro, éste fue preparado en forma aséptica para la cirugía. Se realizó el abordaje del foco lesional, exponiendo los cabos óseos, inspeccionando el canal medular a través de ambos cabos óseos y midiendo su diámetro interno para la posterior elección del implante xenogénico adecuado a colocar dentro del canal medular. Seguidamente se procedió a la selección del clavo xenogénico, extrayéndolo de su envoltura estéril (Fig.1) y midiendo su diámetro y largo, seleccionando el implante que mejor se adaptara al canal medular del paciente (Fig. 2). Posteriormente se realizó con una gubia las modificaciones necesarias para su mejor adaptación al canal medular del cabo distal tratando de no debilitar el material (Fig.3).



Figura 1. Hueso bovino liofilizado, esterilizado con radiación Gamma y envasado en polietileno listo para ser usado en el block quirúrgico.

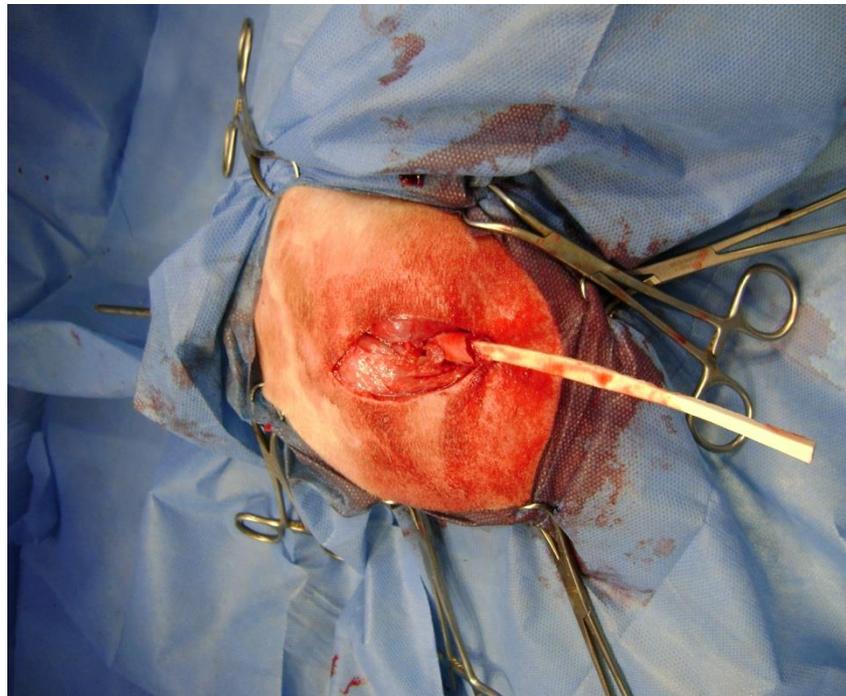


Figura 2. Clavo de hueso xenogénico ubicado en el canal medular proximal para determinar su capacidad de adaptación al mismo y la longitud a la cual debe ser cortado para utilizarlo posteriormente como elemento de fijación intramedular.

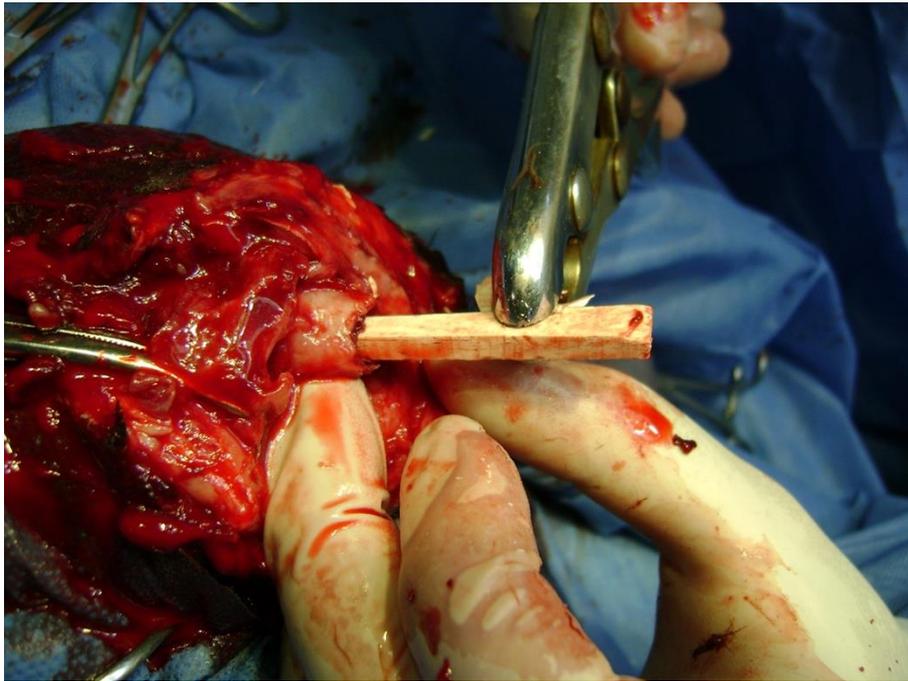


Figura 3. El clavo óseo xenogénico luego de ser cortado es adaptado con una gubia al canal medular del cabo distal para su posterior introducción en el mismo.

El clavo xenogénico fue posteriormente reconstituido en una solución de oxitetraciclina al 10% en suero fisiológico en proporción 1:50 ml volumen a volumen, a temperatura ambiente (Fig.4). A continuación, se colocó el implante mediante un martillo de osteosíntesis en forma retrógrada en el cabo proximal de la fractura procurando su avance y firmeza dentro del canal (Fig. 5).

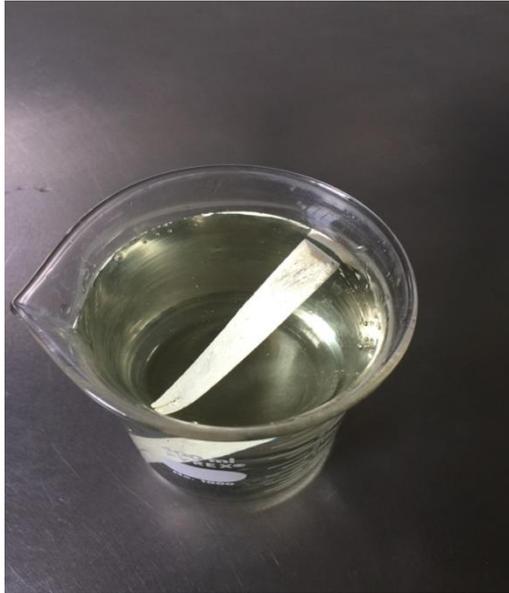


Figura 4. El clavo xenogénico luego de tener su longitud y diámetro deseado es sumergido en una solución de suero fisiológico y oxitetraciclina para su reconstitución.

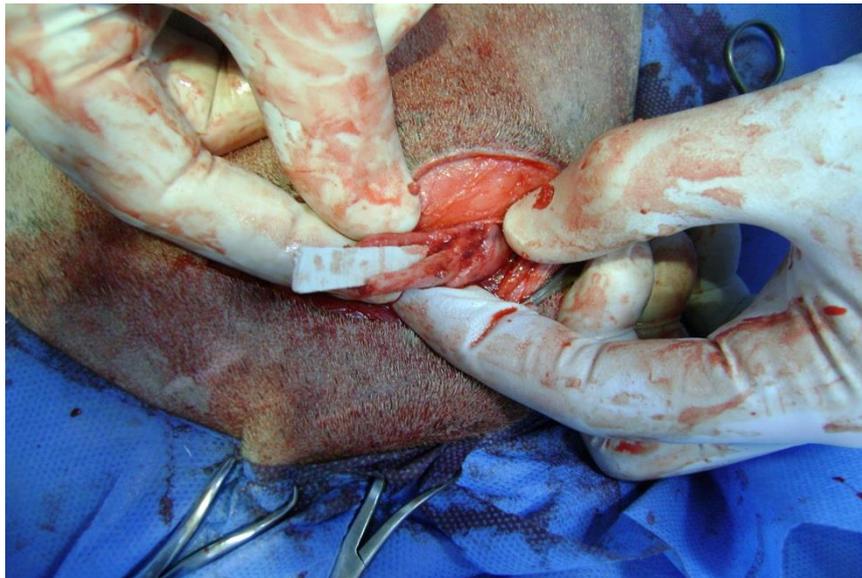


Figura 5. Colocación definitiva del implante en el canal medular del cabo proximal para posteriormente ser introducido en el canal medular del cabo distal.

Se dejaron aproximadamente 3 cm. de implante sobresaliendo del cabo proximal para ser luego introducidos en el cabo distal acompañado de una maniobra de reducción de la fractura. Luego se comprobó la estabilidad del foco de fractura, colocando posteriormente un fijador externo para contribuir a la neutralización de fuerzas. Para este fin se utilizó un fijador tipo Kirschner, con clavos percutáneos, dependiendo su diámetro del tamaño del paciente y tipo de fractura (Fig. 6).

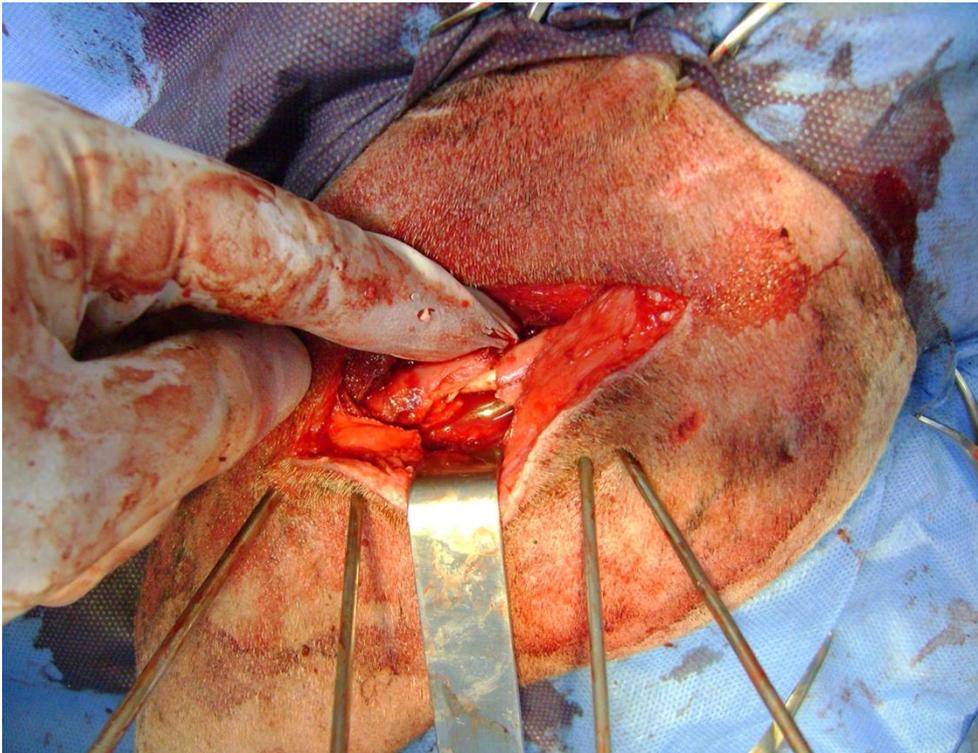


Figura 6. Con el clavo intramedular xenogénico ya colocado en el canal medular de los cabos distal y proximal, se colocan los clavos de fijación externa para otorgar más estabilidad al foco de fractura.

La técnica de colocación de dicho fijador fue la recomendada por Fossum y col (2014) Luego se procedió al cierre de la herida operatoria de manera convencional; los planos profundos con material de sutura absorbible (ácido poliglicólico 0) y la piel con Nylon monofilamento 2-0.

Cuidados post-operatorios

La antisepsia de la herida se realizó con yodofores diluido al 10 %. Se administró amoxicilina asociada a ácido clavulánico a una dosis de 22 mg./kg PV cada 12 horas durante 15 días, tiempo en el que se retiraron los puntos de sutura en piel. En todos los casos se administró como analgésico Carprofeno a una dosis de 2.2 mg/kg cada 12 horas por 5 días.

Controles evolutivos

Los pacientes fueron controlados clínica y radiológicamente a los 15, 30, 60 y 90 días del post-operatorio. Para la evaluación clínica de la claudicación y el retorno a la función se utilizó la escala de Myles, Levine y Taylor (2004) (Lameness score).

- 1- claudicación ligera e intermitente
- 2- claudicación obvia que sustenta el peso
- 3- claudicación severa con sustento del peso
- 4- claudicación intermitente que no sostiene el peso
- 5- claudicación continua que no sostiene el peso

Estudio estadístico

Se trató de un estudio clínico prospectivo. Dado el número de la muestra, se utilizó frecuencia relativa para el análisis de los resultados.

RESULTADOS

Para los 9 casos utilizados en nuestro experimento se pudieron elaborar piezas de hueso bovino desantigenizado y liofilizado, de forma y tamaño adecuado, para ser utilizadas como implante intramedular. Las cuales luego en el quirófano pudieron ser adaptadas al diámetro y largo del hueso afectado en cada paciente.

Se logró estandarizar un método de colocación similar para todos los pacientes logrando estabilidad en el foco de fractura en asociación con el fijador externo.

Todos los casos salvo uno (Caso No.1) evolucionaron favorablemente a la consolidación de sus fracturas, comprobándose a los 90 días del post-operatorio, signos radiológicos de consolidación y ausencia clínica de claudicación (Ver Cuadros I a IX, representativos de la evolución clínica y radiológica de nuestros casos clínicos).

Cuadro I. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 1

Día	Evaluación clínica	Evaluación radiológica
15	Claudicación grado 3	Buena alineación de los cabos fractuarios, visualización dentro del canal medular del xenoinjerto óseo
30	Claudicación grado 2	Visualización de callo óseo en los extremos de los cabos óseos hacia distal del foco. Reacción perióstica
60	Claudicación grado 2	Se observa no unión hipertrófica, cabos no enfrentados, con presencia de callo óseo exuberante
90	Claudicación grado 2	Se diagnostica no unión hipertrófica

Cuadro II. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 2

Día	Evaluación clínica	Evaluación radiológica
15	Claudicación grado 3	Se aprecia conspicuamente el implante xenogénico dentro del canal medular. No se visualiza imagen de reacción de tejidos blandos adyacentes
30	Claudicación grado 2	No hay diferencias radiológicas respecto a los 15 días previos
60	Claudicación grado 1	Formación de callo óseo en la interlínea fracturaria. Cabos óseos bien enfrentados. Todavía se aprecia imagen del xenoimplante
90	Ausencia de claudicación	Callo óseo uniendo los fragmentos

Cuadro III. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 3

Día	Evaluación clínica	Evaluación radiológica
15	Claudicación grado 1	Formación de un callo inmaduro exuberante alrededor de la fractura, brecha fracturaría rellena radiológicamente, con buena continuidad ósea en el defecto. Osteointegración del implante.
30	Ausencia de claudicación	Visualización del callo óseo, buena continuidad ósea anatómica. Signos de remodelación ósea (comparación con RX anteriores)

Cuadro IV. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 4

Día	Evaluación clínica	Evaluación radiográfica
15	Claudicación grado 2	Se visualiza un aumento de la densidad ósea en el tercio medio del húmero.
30	Claudicación grado 1	Callo óseo logrando la unión completa del hueso. Aumento de la radio-densidad ósea en el tercio medio-distal de húmero.
60	Claudicación grado 0	Callo óseo denso
90	Ausencia de claudicación	Imagen compatible con reabsorción parcial del implante.

Cuadro V. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 5

Día	Evaluación clínica	Evaluación radiológica
15	Claudicación grado 2	Signos de osteoformación alrededor del foco. Implante intramedular uniendo fragmentos óseos
30	Claudicación grado 1	Formación de callo óseo uniendo los fragmentos óseos. Se visualiza implante intramedular
60	Claudicación grado 1	Formación de callo óseo cubriendo todo defecto. Aumento de la densidad ósea
90	Ausencia de claudicación	Irregularidad en los bordes del hueso menor que control anterior. Se puede visualizar el implante intramedular dentro del canal medular

Cuadro VI. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 6

Día	Evaluación clínica	Evaluación radiológica
15	Claudicación grado 3	Se visualiza implante intramedular xenogénico dentro del canal medular. Extremos fracturarios bien enfrentados
30	Claudicación grado 1	Interlínea fracturaria rellena totalmente por callo óseo. Fractura consolidada radiológicamente
60	Ausencia de claudicación	Callo óseo de mayor tamaño. El implante xenogénico no se evidenciaba radiológicamente de forma clara, cubierto por el callo óseo
90	Ausencia de claudicación	Se evidenciaba reabsorción del implante xenogénico con buena formación del callo óseo

Cuadro VII. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 7

Día	Evaluación clínica	Evaluación radiográfica
15	Claudicación grado 2	Se visualiza coaptación de los cabos óseos, presencia del clavo intramedular xenogénico. Se observa la línea de fractura
30	Claudicación grado 1	Formación de callo óseo cubriendo toda la superficie del hueso, no permitiendo visualizar la línea fracturaria. Completa unión de los cabos óseos. Se visualiza clavo intramedular xenogénico
60	Claudicación grado 1	Irregularidad en la superficie ósea producto del callo formado. No se visualiza la línea de fractura. Completa unión. Zona de callo con aumento de la densidad ósea
90	Claudicación grado 0	Remodelación ósea. Superficie del hueso sin irregularidades. Patrón trabecular en zona del callo óseo

Cuadro VIII. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 8

Día	Evaluación clínica	Evaluación radiológica
15	Claudicación grado 2	Se visualiza imagen del clavo intramedular uniendo los dos fragmentos óseos
30	Claudicación grado 1	Callo óseo formado alrededor de los cabos óseos, unidos por el hueso xenogénico intramedular
60	Claudicación grado 1	Callo óseo cubriendo toda la línea fracturaria permitiendo la continuidad ósea. No se visualiza la línea fracturaria. Todavía se aprecia la imagen del clavo intramedular dentro del canal
90	Ausencia de claudicación	Se observa callo óseo y signos de reabsorción del implante xenogénico

Cuadro IX. Evaluación clínico-radiológica del caso clínico No. 9

Día	Evaluación clínica	Evaluación radiográfica
15	Claudicación grado 2	Se observa buena aposición de los cabos óseos, y presencia del implante
30	Claudicación grado 1	Se observa formación de callo óseo primario uniendo los cabos fracturarios
60	Claudicación grado 1	Buena formación de callo óseo cubriendo toda la línea fractuaria
90	Ausencia de claudicación	Se observa callo óseo y signos de reabsorción del implante xenogénico

El caso No.1 presentó una pseudoartrosis hipertrófica con claudicación grado 2 a los 90 días del post-operatorio; sin embargo, no se detectaron signos clínicos de rechazo o infección.

A los 60 días del post-operatorio, 8 pacientes mostraban signos radiológicos de callo óseo uniendo ambos cabos de la fractura. Cinco presentaban aún, claudicación grado 1 y tres, grado 0.

A los 30 días del post-operatorio, 7 pacientes presentaban ya radiológicamente, formación de callo óseo uniendo los extremos fracturarios; 6 de ellos, clínicamente mostraban claudicación mínima (grado 1) y uno, nula (Caso No.3).

En ninguno de los casos se presentaron complicaciones en el post-operatorio ni signos de rechazo o infección en su evolución. Ningún paciente tuvo que ser re-intervenido por razones atribuibles a la presencia de los implantes, ni por ninguna otra razón. Ningún paciente presentó secuelas motoras, salvo el caso No.1 que a los 90 días del post-operatorio, aun presentaba una claudicación grado 2.

DISCUSION

La discusión de nuestros resultados se centra principalmente en la performance de los implantes xenogénicos en términos de biocompatibilidad, osteointegración, capacidad mecánica, así como en la valoración referida a los tiempos de consolidación de las fracturas, los de rehabilitación funcional de los pacientes y la presencia de complicaciones.

Biocompatibilidad

En todos los casos de nuestra casuística, la biocompatibilidad de los implantes fue manifiesta, en virtud de la tolerancia por parte del receptor, con ausencia de rechazo, fenómenos inflamatorios o infección. Esto concuerda con los resultados que arrojaran nuestras previas investigaciones cuando utilizáramos clínicamente el mismo material xenogénico para el tratamiento de defectos óseos en caninos (Semiglia y col, 2006)

En efecto, los implantes utilizados en todos los casos no determinaron ninguna reacción endomedular que tuviera efectos indeseables que afectaran el desarrollo esperado del proceso de reparación ósea, observándose el inicio de la osteointegración de los mismos en forma temprana y en todo los casos, lo que no ocurre con los clavos intramedulares de acero inoxidable 316 L (Denny y col 2000).

Esto puede interpretarse como el resultado de una estrecha interacción entre el xenoimplante biológico -cuyo procesamiento permite preservar la actividad BMP- y los elementos celulares, mediadores y factores de crecimiento presentes en la medula ósea del receptor. Aquellas células serían estimuladas por los factores osteoinductores contenidos en el implante, a diferenciarse en células osteoprogenitoras (Urist MR, 1990).

Los reportes publicados en el siglo pasado relativos a la actividad inmunogénica junto con una ausencia de osteogénesis vinculados al implante de huesos xenogénicos (Kienholz y Kempkes, 1956; Elves y Salama, 1974; Begley y col., 1995), si bien en algún caso plantean como determinante la presencia de antígenos celulares remanentes en el hueso procesado, no identifican la causa de la ausencia de osteogénesis inducida. Efectivamente, a la luz de los conocimientos actuales, la razón resulta clara: el método de procesamiento del material óseo era el determinante en todos los casos –mas allá de pequeñas variantes metodológicas- de la eliminación de la actividad de la BMP en los implantes. La preocupación por desantigenizar al máximo el material xenogénico (ebullición, álcalis fuertes, maceración, etc.) derivaba inevitablemente en la desnaturalización de las proteínas bioactivas responsables de la osteoinducción

(Zunino, 2010). Nuestros implantes óseos xenogénicos, acelulares, desantigenizados, fueron procesados de modo de eliminar por completo todo elemento potencialmente antigénico, pero preservando los elementos bioactivos osteoinductores en su matriz.

Capacidad mecánica

En nuestro experimento la capacidad de neutralización de fuerzas del implante como único elemento de fijación de la fractura fue considerada muy insuficiente y por esta razón, en todos los casos se contribuyó a la estabilidad combinándolo con un sistema de fijación externa. Esto puede explicarse por nuestra falta de experiencia en la adaptación y colocación de estos implantes al conducto medular, ya que no hay antecedentes en la literatura de su utilización en caninos en el rango de peso y edades que integraron nuestra casuística.

Salvo en el caso número 1, en los demás casos el fijador combinado con el implante fueron suficientes para fijar los cabos fracturarios y lograr una adecuada estabilización, similar a los estándares aceptados para el uso de materiales tradicionales (Tobías y col 2012).

Osteointegración

Luego de consolidada la fractura en los casos 2 al 9, se comprobó la osteointegración del implante, sin ningún signo de rechazo, tanto clínico (inflamación, fistulas) como radiológico (secuestros). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Zunino y col (2010) en su utilización en el relleno de defectos óseos. Tampoco en el caso 1 donde se instauró una pseudoartrosis, el paciente mostró signos de rechazo, pese a la inestabilidad clínica comprobada del foco de fractura.

La utilización de tetraciclinas en la reconstitución de los implantes óseos durante el acto operatorio (ver Técnica Quirúrgica), ofrece la doble posibilidad de adsorber por un lado un antibiótico al implante, a la vez que inactivar biológicamente las metaloproteinasas de la matriz ósea del receptor (Zunino y col, 2011). Esto conlleva a evitar una temprana bioreabsorción del implante óseo, lo que posibilita la expresión precoz de su capacidad osteoinductora.

Tiempos de consolidación y rehabilitación funcional.

Salvo en nuestro primer caso, en el cual se estableció una no unión hipertrófica (que atribuimos a que se trataba de una fractura expuesta y al comprobado cuidado deficiente del paciente por parte del propietario), en todos los demás casos comprobamos que los mecanismos de formación del callo se vieron favorecidos en relación a los tiempos descritos por Denny y col. (2000) para la osteosíntesis con implantes metálicos.

La rehabilitación funcional de los pacientes, valorada en términos objetivables de claudicación, demostró ser muy aceptable, con un score de 1 para seis pacientes y otro de cero, ya a los 30 días de la cirugía.

Complicaciones post-quirúrgicas

Ningún paciente presentó complicaciones post-operatorias precoces o de mediano plazo durante el seguimiento evolutivo. No hubo infecciones, a pesar de que tres casos correspondieron a fracturas abiertas, así como tampoco complicaciones neuro-vasculares. Ningún paciente debió ser reintervenido. Los implantes metálicos endomedulares son causa ocasional de infecciones diafisarias, particularmente en fracturas expuestas, debiendo ser retirados, a efectos –entre otras medidas terapéuticas- de controlar el proceso infeccioso.

CONCLUSIONES

Si bien nuestra casuística dista de ser exhaustiva, por la consistencia de los resultados obtenidos en los casos tratados, nos es posible extraer algunas conclusiones relevantes.

El implante óseo xenogénico utilizado se comportó como un material biocompatible y osteopromotor, como ya habíamos observado en trabajos anteriores; pero además fue capaz de soportar mecánicamente las fuerzas de compresión y extensión a las que se vio sometido. Otro punto importante es el hecho de que este implante no produjo ningún tipo de rechazo inmunológico clínicamente ostensible en los pacientes, lo cual fue comprobado clínica y radiológicamente, al verificarse sistemáticamente la osteointegración del implante y la consolidación ósea.

También cabe destacar que no hubo ningún caso de infección luego de la colocación de este implante óseo intramedular, ni aún en los casos de fracturas expuestas. Esto podría plantear la factibilidad del uso de este tipo de implante en aquellas fracturas en las que los dispositivos intramedulares no biológicos están contraindicados, ya que éstos en presencia de infección, potencialmente la propagarían a lo largo de todo el canal medular.

Las perspectivas de experimentación deberían orientarse a estandarizar y validar un método de procesamiento de implantes xenogénicos de mayor resistencia biomecánica que los utilizados en nuestro trabajo, menoscabada ésta en parte por el método utilizado de esterilización con radiación gamma. Esto tal vez nos permita en un futuro próximo, utilizarlos como elemento único de fijación mecánica, prescindiendo de los elementos adyuvantes de fijación externa.

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.* 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; Schmidtt, 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. Begley, CT, Doherty, MJ, Mollan, RA et al. (1995). Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. *Biomaterials* 16(15): 1181-1185.
9. Berns, T; Hofmann, C; Gotzen, L (2001). Strength testing of pins made of human femur cortical bone. [Unfallchirurg](http://www.unfallchirurg.de). 104(1):64-68.
10. 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.
11. Blood, DC; Studdert, VP (1988). *Diccionario de Veterinaria*. p.1296. Interamericana, Madrid.
12. Bojrab, J (1996). *Fisiopatología y clínica quirúrgica en animales pequeños*. 2ª ed. Bs. As. Intermédica. 1302 p.
13. Bojrab, MJ; Monnet, E (2011). *Mecanismos de enfermedad en cirugía de pequeños animales*. p.784. 3ª ed. Intermédica.Bs.As.

14. Bojrab, J. Waldron, D. Tooms, J (2014). Current Techniques In Small Animal Surgery. p.1163, 5ta Edición. Teton NewMedia..
15. 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.
16. 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.
17. Caplan, AI (1991). Mesenchymal stem cells. J. Orthop. Res. 9(5):641–650.
18. Chalmers, J (1959). Transplantation immunogenicity in bone homografting. J. Bone Joint Surg. 41(1):160-179.
19. Chalmers J (1967). Bone transplantation. J. Clin. Path. 20:540-550.
20. Chiappe, MA (2004). Mecanismos reguladores de la biología ósea, su importancia en la patogénesis de las osteopatías fragilizantes (primera parte). Rev. Med. Vet., 85(1):8-15.
21. Czitrom, AA (1996). The immune response: the afferent arm. Clin. Orthop. 326:11-24.
22. 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.
23. Denny, R. Butterword, J (2000). A guide to canine and feline Orthopaedic Surgery. p. 634, 4ta edición. Blackwell Scientific.
24. Derubeis, AR; Cancedda, R (2004). Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. Ann. Biomed. Eng. 32(1):160-165.
25. Di Sevo Mallo, V (2014). Utilización de hueso xenogénico como elemento de osteosíntesis en medicina veterinaria. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.
26. Dyce KM; Sack, WO; Wensing, CJG (1999). Anatomía Veterinaria. 2ª ed. p.952 Ed. Interamericana, Mexico.
27. Dongyang, M; Liling, R; Yanpu, L; Fulin, C; Junrui, Z; Zhenxun, X; Tianqi, M (2010). Engineering scaffold-free bone tissue using bone marrow stromal cell sheets. J. Orthop. Res. 28(5):697-702.

28. Einhorn, TA (1998). The cell and molecular biology of fracture healing. Clin. Orthop. Relat. Res. 355:7-21.
29. 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.
30. 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.
31. Fawcett, DW (1995). Bloom, Fawcett: Tratado de histología. 12 ed. p.1044 Ed. Interamericana, Madrid. .
32. 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.
33. Fossum, TW (2013). Cirugía en pequeños animales. 4ta ed. p.1640, Elsevier, Barcelona.
34. Friedlaender, GE (1981). Guidelines for banking osteochondral allografts. En: Osteochondral allografts: biology, banking and clinical applications. pp.177-180 Eds. Friedlaender, GE; Mankin, HJ; Sell, KW. Little Brown, Boston.
35. Friedlaender, GE; Goldberg, V (1989). Bone and cartilage allografts: biology and clinical applications. p.303. Am. Acad. Orthop. Surg. Warrenton.
36. Friedlander, GE (1995). Biology and immunobiology of bone autografts and allografts. Clinical implication of biological events. En: Hollinger, J; Seyfer, AE. Portland Bone Symposium. pp.:289-299. Oregon Health Sciences University. Portland, U.S.A. August 2-5.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.

41. Haje, D; Volpon, J (2006). Bovine bone screws development: machining method and metrological study with profile projector. *Acta Ortop. Bras.* 14(2):87-91.
42. Hallen, LG (1966). Heterologous transplantation with kiel bone. *Acta Orthop. Scand.* 37:1-19.
43. Hancox, NM; Owen, R; Singleton, A (1961). Cross-species grafts of deproteinised bone. *J. Bone Joint Surg.* 43B(1):152-161.
44. Harris, GK; Shi, X (2003). Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. *Mutat. Res.* 533:183-200.
45. Hartwig, A; Schwerdtle, T (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol. Lett.* 127: 47-54.
46. Heiple, KG; Goldberg, VM; Powell, AE; Bos, GD; Zika, JM (1987). Biology of cancellous bone grafts. *Orthop. Clin. North Am.* 18:179-185.
47. 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. *Unfallchirurg.* 106(6):478-482.
48. 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.
49. Janovec, M; Dvorák, K (1988). Autolyzed antigen-extracted allogeneic bone for bridging segmented diaphyseal bone defects in rabbits. *Clin. Orthop.* 229:249-256.
50. Johnson, AL (1995). Bone grafting. En: Small animal orthopedics.pp. 146-151 Ed.Olmstead, ML Mosby. St. Louis
51. Johnson, AL. (1991). Principles of bone grafting. *Sem. Vet. Med. Surg. Small An.* 6(1):90-99.
52. Junqueira, R; Souza, B; Falci, AP; Perez, L (2004). Medula óssea autógena. Uma alternativa de exerto em ortopedia veterinaria. *Ceres.* 51(295):411-418.
53. Kienholz, M, Kempkes, B (1956). Untersuchungen uber den immunobiologischen Wert heteroplastischer konservierter Knochenspane. *Arch. Fur ortopadische und Unfall. Chirurgie.* 48: 623- 632.
54. Kilic, S; Timurkaan, N (2004). Repair of humeral fractures with pins in pigeons. *Indian Vet. J.* 81(9)-995-998.

55. 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.
56. Kraus, KH; Kirker-Head, C (2006). Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.* 35(3): 232-242.
57. Losee, FL; Hurley, LA (1956). Successful cross-species bone grafting accomplished by removal of the donor organic matrix. *US.Nav Med. Res. Inst. Rep.*14:911.
58. 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.
59. 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.
60. Luque de Castro MD, García-Ayuso LE (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta.*(1–2):369. doi: 10.1016/S0003-2670(98)00233-5. [[Cross Ref](#)]
61. Martinez, SA; Walker, T (1999). Bone grafts. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 29(5):1207-1219.
62. 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.
63. McKibbin, B (1978). The biology of fracture healing in long bones. *J. Bone Joint Surg.* 60B:150-162.
64. Millis, DL; Levine, D; Taylor, RA (2004). *Canine rehabilitation physical therapy.* p. 526, Elsevier, St. Louis.
65. 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) p. 81.
66. Miyakoshi, N (2004). Effects of parathyroid hormone on cancellous bone

mass and structure in osteoporosis. *Curr Pharm Des* 10:2615-2627.

67. Morales, B; Sosa, V (2005). Efectos del uso de la luz láser de baja potencia en el proceso de reparación ósea.p.63. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR.

68. Mundy, GR. (1996). Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin. Orthop.* 323: 24-28.

69. 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.

70. Obwegeser, JA (1994). Bioconvertible screws made of allogenic cortical bone for osteosynthesis following sagittal split ramus osteotomy without postoperative immobilization. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 22(2):63-75.

71. Palmer, R. (1999). Biological osteosynthesis. *Vet. Clin. North Am. Small An. Pract.* 29(5):1171-1185.

72. 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 diaphysis osteotomy in the cat. A clinical study. *Resúmenes. XV 2. p. 635. XIII Congreso de la Asociación Mundial de Medicina Veterinaria de Pequeños Animales. Bs.As. Argentina.*

73. 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 diaphysis osteotomy in the cat. A radiographic study. *Resúmenes. V 2. p. 701. XXIII Congreso de la Asociación Mundial de Medicina Veterinaria de Pequeños Animales. Bs.As. Argentina.*

74. 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.

75. Perdomo, E. (2001). Observaciones sobre la encefalopatía espongiiforme bovina o "mal de la vaca loca". *Arch. Inst. Neurol.* 4(1):7-11.

76. Piermattei, D; Flo, G; DeCamp, C (2007). *Manual de ortopedia y reparación de fracturas de pequeños animales.* 4ª ed. Bs.As. Intermédica. 835 p.

77. 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.

78. Porth, CM (2007). Fisiopatología: salud – enfermedad: Un enfoque conceptual. 7ª ed.p. 1582 Edit. Panamericana. Bs. As.
79. Ray RD; Holloway JA (1957). Bone implants. Preliminary report of an experimental study. J. Bone Joint Surg. 39A:1119-1128.
80. Rechenberg, BV; Auer, JA (2006). Bone grafts and bone replacements. En: Equine Surgery. 1030-1036 Eds. Auer, JA; Stick, JA. 3a ed. Saunders, St. Louis.
81. 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.
82. Rodríguez, M. (2001). Bases genéticas de las enfermedades priónicas en el hombre. Arch. Inst. Neurol. 4(1):18-24.
83. 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.
84. Rudy, RL (1981). Principios del enclavamiento intramedular. En: Rudy, RL. Manejo de las fracturas de los miembros de los pequeños animales.pp.75-98 Hemisferio Sur, Bs. As.
85. Rush, LV; Rush, HL (1937). A reconstructive operation for comminuted fractures of the upper third of the ulna. Am. J. Surg. 38:332.
86. Salama, R; Burwell, RG; Dickson, IR (1973). Recombined grafts of bone and marrow. J. Bone Joint Surg. 55B:402-417.
87. Salama, R; Weissman, SL (1978). The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. A preliminary report. J. Bone Joint Surg. 60B(1):111-115.
88. 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.
89. 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.
90. 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.

91. 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 xenogénico intramedular asociado a un fijador externo tipo 3. VIII Congreso Iberoamericano FIAVAC. Punta del Este, Uruguay. 24 – 26 Nov. 57-58 .

92. Slatter, D (2006). Tratado de cirugía en pequeños animales. 3ª ed. p.3156, Intermédica, Bs.As.

93. 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.

94. 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.

95. Toal, RL; Mitchell, SK (2003). Cicatrización de fracturas y complicaciones. En: Thrall, D. Manual de diagnóstico radiológico veterinario. 4ª ed p.758 . Elsevier, Madrid.

96. Trippel, SB; Coutts, RD; Einhorn, TA; Mundy, GR; Rosenfeld, RG (1996). Growth factors as therapeutic agents. *J. Bone Joint Surg.* 78A: 1272-1286.

97. Urist, MR (1965). Bone: Formation by autoinduction. *Science.* 12(150):893-899.

98. Urist, MR; Mikulski, A; Boyd, SD (1975). A chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone Banks. *Arch. Surg.* 110:416-428.

100. Urist, MR (1990). Proteína morfogenética en la generación y regeneración del hueso. *Rev. Ortop. Traum.* 34IB (2): 240-252.

101. 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.

102. Weigel, JP (1993). Bone grafting. En: Disease mechanisms in small animal surgery. 2ª ed. pp.:678-684. Bojrab, MJ; Smeak, DD; Bloomberg, MS, Eds. Lea & Febiger, Philadelphia.

103. Yaneselli K, Filomeno A, Semiglia G, Arce C, Maisonnave J (2012). Implante de células madre alogénicas en un defecto óseo en un canino. Poster. XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, Piriápolis, Maldonado, Uruguay.

104. Zhang, W; Li, G; Deng, L; Qiu, S (2012a). 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.

105. Zhang, Q; He, QF; Zhang, TH; Yu, XL; Liu, Q; Deng, FL (2012b). 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.

106. Zunino, JH (1994). Enxertos e transplantes ósseos osteoderivados. En: Patologia Ossea: Fundamentos. pp.119-128. Eds.:Mendoza, Mendonça & Laurino.Fundo Editorial BYK, Sao Paulo, Brasil.

107. 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 Tissue Banking, 5:141-148.

108. Zunino, JH (2010a). El trasplante óseo xenogénico:reconstrucción biológica del sistema esquelético. pp.21-22. Tesis de Docencia. Facultad de Medicina, UdeLaR.

109. Zunino, JH; Semiglia, G; De Pro, C; Carzoglio, J; Filomeno, A (2011a). 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, p 9-11.

110. Zunino JH , Filomeno A , Cigliutti G , Semiglia G (2011b). Osteogenic effect of Tetracyclin in compound xenogeneic bone implants". (Poster). Sexto Congreso Mundial de Bancos de Tejidos y 20º Congreso de la Asociación Europea de Bancos de Tejidos (EATB). Barcelona, España, 9-11 Noviembre.

111. Zunino JH, Lantero JC, Aguiar S, Deri E (2011c). Biomechanical characterization of a processed, antigen-free bone xenoinplant for skeletal reconstruction. Poster. 6th.World Congress on Tissue Banking, Nov. 9-11, Barcelona, España.

112. Zunino JH, Semiglia G, Filomeno A, Benecch A, Maisonnave J (2012a). Osteogenic capacity of autologous bone marrow-embedded xenogeneic

bone implants. Poster, 21st. Annual Congress of the European Association of Tissue Banks. November 21-23, Vienna, Austria.

113. Zunino JH., Hermida, L., Rodriguez, D (2012b). An osteoinductive xenogeneic bone graft for skeletal reconstruction in oro-maxillo-facial surgery: preliminary results. 21st. Annual Congress of the EATB. Nov. 21-23, Vienna, Austria.

114. Zunino JH, Anastasescu M , Gutiérrez C, Seija V, Semiglia G (2013). Osteoinductive activity of peracetic acid-ethanol sterilized xenogeneic bone for transplants. Poster. 22nd. Annual Congress of the EATB, Nov. 20-22. Bruselas, Bélgica.