

LA ASAMBLEA DE LA ACADEMIA NACIONAL DE VETERINARIA RESUELVE: **Otorgar Mención Especial de carácter honorario al trabajo presentado como aspirante al Premio Academia Nacional de Veterinaria 2005** auspiciado por la Cámara de Especialidades Veterinarias 2005.

Reparación quirúrgica de defectos esqueléticos en pequeños animales mediante implantes óseos xenogénicos desantigenizados: resultados preliminares

Semiglia, G.^{1*}; Izquierdo, D.¹; Zunino, J.H.²

RESUMEN

El autoinjerto óseo para reparar grandes defectos esqueléticos conlleva una alta morbilidad, representando también una fuente de complicaciones a nivel del área dadora. Asimismo, la ausencia de bancos de tejidos animales en nuestro medio dificulta lograr injertos alogénicos seguros.

La reparación ósea por métodos biológicos incluye la utilización de hueso xenogénico procesado, desantigenizado y liofilizado. Este material puede obtenerse en nuestro medio de fuentes seguras y estar fácilmente disponible en grandes cantidades.

Los buenos resultados experimentales obtenidos con implantes xenogénicos en roedores (ausencia de una respuesta inmune significativa junto a osteoinducción local) nos indujo a diseñar un ensayo clínico usando hueso bovino desantigenizado y liofilizado en la reparación de defectos esqueléticos de causa traumática, degenerativa, infecciosa o tumoral en pequeños animales.

La excelente evolución comprobada en nuestros primeros casos tratados –tanto en lo anatómico como en lo clínico y funcional– nos impulsaron a comunicar los correspondientes resultados preliminares del estudio en desarrollo.

Palabras clave: Reparación esquelética, xenoinjertos, banco de tejidos, ortopedia veterinaria, implantes óseos.

SUMMARY

Autografting for bone repair in large skeletal defects carries high morbidity and represents a source of complications at the donor site, as well. Besides, the lack of animal tissue banks in our country renders safe allografting a difficult task to achieve.

Bone repair by biologic methods can include using processed, non-antigenic, freeze-dried bone from a xenogeneic source. Such material can be obtained from a safe source in our country, and be easily available in large quantities.

Our good results in experimental bone xenografting in rodents (absence of significant immune response along with local osteoinduction), induced us to design a clinical trial using antigen-depleted, freeze-dried bovine bone to repair skeletal defects in small animals, due to trauma, infection, degenerative or tumor diseases.

Excellent anatomic, clinic and functional outcome in the first few cases prompted us to disseminate our preliminary results of the ongoing trial.

Key words: Skeletal repair, xenografting, tissue banking, veterinary orthopedic surgery, bone implants.

INTRODUCCIÓN

La reparación de defectos esqueléticos en Medicina Veterinaria por métodos biológicos, se encuentra limitada fundamentalmente por factores de morbilidad y de disponibilidad de material biológico. En efecto, la reparación de defectos esqueléticos con material óseo autogénico implica por un lado, aumento de la morbilidad y eventualidad de complicaciones a nivel del área dadora del paciente, así como alteraciones funcionales en su aparato locomotor.

Por otra parte, la inexistencia en nuestro medio de bancos de tejidos animales impide la disponibilidad de implantes tis-

lares seguros y adecuados, tanto en cantidad como en calidad.

La utilización experimental exitosa (ausencia de rechazo acompañada con aumento de la osteogénesis) de material óseo xenogénico en roedores (Zunino y col 2004) nos estimuló a ensayar clínicamente el uso de hueso bovino procesado (desantigenizado y liofilizado) en casos clínicos de pequeños animales portadores de defectos esqueléticos considerables, cuyo tratamiento convencional implicaba una alta morbilidad y/o trastornos funcionales importantes.

La buena evolución tanto en lo anatómico como en lo funcional observada en

nuestros primeros casos tratados con esta metodología, nos ha estimulado a presentar precozmente los resultados preliminares, en un intento de diseminar un procedimiento de fácil ejecución técnica, bajo costo y hasta el momento carente de complicaciones.

MATERIAL Y MÉTODO

Preparación de los implantes

El fémur y tibia de un bovino joven fueron obtenidos en un matadero sujeto a lo dispuesto por el Reglamento Oficial de Inspección Veterinaria de Productos de Origen Animal (MGAP, 1983). Los huesos fueron inmediatamente congelados

¹ Departamento de Pequeños Animales, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Uruguay.

² Banco de Organos y Tejidos, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Uruguay;

* Autor correspondiente: (e-mail: gsemigli@adinet.com.uy fax: +5982-216 18 70)

(- 80°C) y luego desprovistos de partes blandas y cartilago, para ser finalmente seccionados de forma y tamaño diferentes, sin exceder los 10x4x3 centímetros. Se obtuvo así una variedad de formas y tamaños de material óseo, tanto esponjoso como cortical y córtico-esponjoso. El material fue lavado abundantemente con agua destilada y solución acuosa de azida de sodio. Luego fue procesado de acuerdo a la técnica de Urist (Urist y col. 1975). Los huesos fueron luego pesados e incubados a 37°C por 72 horas en baño con fosfato buffer. Luego, fueron tratados con Pepsina (Pepsina, Sigma) 1:100 peso a peso enzima:matriz y con ácido clorhídrico 0.01N a 22°C por 6 horas. La actividad de Pepsina fue detenida aumentando el pH de la solución a 8.0 con hidróxido de sodio 0.1N por 6 horas a 4°C. Los fragmentos óseos fueron luego lavados con agua destilada, liofilizados (Liofilizador Labconco, Mod. Lyph-Lock 6) a una presión de vacío de 0.13×10^{-3} (Mbar) y temperatura de -50°C por 72 horas. El material fue luego envasado en triple bolsa de polietileno de 60 micrones de espesor e irradiado a temperatura de congelación con dosis de 25 KGy (Kilo gray) de cobalto 60, con fines de esterilización.

Casos clínicos

Cinco animales, cuatro perros y un gato constituyeron nuestros primeros casos, objeto de la presente publicación. Las correspondientes patologías que motivaron las intervenciones quirúrgicas fueron: fractura expuesta conminuta por proyectil, artrodesis fémoro-tibial, malformación congénita de miembro anterior, fractura conminuta carpo-metacarpiana y osteomielitis tibio-astragalina.

Técnica quirúrgica

Luego del abordaje clásico del foco lesional (Bojrab, 2001; Slatter, 2002) y el tratamiento de la correspondiente patología, se procedió en todos los casos a la preparación del lecho del implante, resecaando partes blandas y esqueléticas hasta alcanzar tejidos normales, sangrantes. En el defecto óseo se colocó uno o más fragmentos de hueso liofilizado, reconstituido antes de la cirugía en una solu-

ción de oxitetraciclina en suero fisiológico a temperatura ambiente.

Autosostenidos *in situ* por partes blandas suturadas y en ocasiones por finas agujas de Kirschner al hueso vecino, los implantes óseos fueron recubiertos de tejidos blandos adyacentes. La estabilización de los focos se logró en todos los casos por fijación externa con clavos de Steinmann en montaje cementado (metil-metacrilato).

Controles evolutivos

En todos los casos se obtuvo una radiografía del foco lesional dentro de la primera semana post-operatoria y el control clínico de los pacientes se efectuó a la semana de la cirugía. Los ulteriores controles fueron planificados con una frecuencia quincenal en el primer mes y mensual en los siguientes.

Los montajes de fijación externa fueron retirados una vez lograda la consolidación ósea, promedialmente a los 3 $\frac{1}{2}$ meses del post operatorio.

El tiempo de seguimiento de los casos fue de 5 meses (promedio).

RESULTADOS

Todos los casos tratados evolucionaron favorablemente hacia la consolidación clínica y radiológica del defecto. No se registraron complicaciones, salvo en un caso en que debió sustituirse el sistema de fijación externa por un aparato enyesado, por detectarse importante osteólisis alrededor de los clavos de Steinmann. No se registraron infecciones ni alteraciones de partes blandas.

La función de los miembros involucrados fue muy buena en todos los casos, permitiendo una marcha y apoyo estables y sin claudicación.

El análisis de las imágenes radiológicas de control permitió observar una progresiva remodelación del implante, con una etapa inicial de desmineralización con ulterior pérdida de sus límites e incorporación al esqueleto vecino. Hasta el cuarto mes del post operatorio sin embargo, no se observaron imágenes de trabéculas óseas que conectaran el implante con el hueso huésped.

DISCUSIÓN

Los resultados preliminares de nuestros primeros casos de utilización de implantes óseos desantigenizados de origen bovino en la reparación de defectos esqueléticos en miembros de pequeños animales han sido muy satisfactorios.

En efecto, la evaluación clínica post operatoria demostró -luego de retirados los elementos metálicos de fijación externa-consolidación del foco, permitiendo un apoyo y marcha estables, sin claudicación.

Radiológicamente, los estudios seriados de control mostraron imágenes de disminución de radioopacidad de los implantes óseos luego del primer mes postoperatorio. Sin embargo, en todos los casos la presencia de dichos implantes pudo ser observada hasta los últimos controles.

Lofgren y col. (Lofgren, H. 2000) lograron fusión de columna cervical en humanos utilizando implantes óseos xenogénicos de origen bovino. El concepto clásico de que el uso de hueso bovino determina una fusión de tipo fibroso y no óseo, no fue demostrado en su ensayo clínico; por el contrario, los autores observaron fusión vertebral rígida en la gran mayoría de sus pacientes randomizados para hueso autogénico y hueso xenogénico bovino, aunque el tiempo de consolidación fue algo mayor en el último caso.

Algunos autores no han tenido buenos resultados con el uso de hueso xenogénico (Pieron y col., 1968); otros refieren que el implante de hueso xenogénico en defectos esqueléticos se comporta como conductor de la osteogénesis (osteoconducción) (Harmon, 1964, Hallén 1965, Hancox y col., 1961), sin actuar como osteoinductor del hueso neoformado.

Otros sin embargo, han demostrado clínica y experimentalmente la capacidad osteoformadora del hueso xenogénico procesado como implante simple o compuesto (Salama y col., 1983, Nathan, 1988).

Estas diferencias podrían estar vinculadas a las condiciones de procesamiento del material óseo xenogénico. Con la finalidad de abolir la antigenicidad del hueso xenogénico, la mayor parte de los mate-

riales osteoderivados son totalmente desproteinizados, lo que elimina los factores osteoinductores (proteína morfogénica ósea, o BMP) de la matriz. Esto explica quizá el abandono del uso clínico de hueso xenogénico en humanos que se popularizara en la década de los '70 luego de los trabajos de Salama. (Salama y col., 1973, Salama y col., 1978, Salama y col., 1982).

El material óseo xenogénico utilizado en nuestros casos clínicos fue parcialmente desmineralizado y desprovisto de elementos antigénicos (lípidos, restos celulares, telopéptidos del colágeno), resultando en un material que conserva activos en su matriz los factores inductores de neoformación ósea.

En la última década, fundamentalmente debido a la disminución en la disponibilidad de hueso alogénico por su potencial rol en la transmisión de enfermedades, los implantes óseos xenogénicos han retomado interés. Tanto a nivel experimental como en el escenario clínico humano, se utilizan en diferentes situaciones: relleno de defectos periodontales,

de cavidades quísticas, defectos esqueléticos por trauma o tumores, artrodesis, infecciones óseas, etc.

Sin embargo, y acorde con la bibliografía revisada, hemos encontrado mínima información relativa a su uso en clínica veterinaria.

La epidemiología de las zoonosis y enfermedades transmisibles resulta particularmente favorable en la región y particularmente en nuestro medio para la utilización de implantes óseos de origen bovino.

Asimismo, el procesamiento de los tejidos óseos para implante (tratamiento con solventes, soluciones ácidas y ulterior liofilización e irradiación con dosis radioesterilizantes con rayos gamma) determina la destrucción de todo potencial germen contaminante.

Las enfermedades priónicas por otra parte son de estricta vigilancia en la región (Somoza, 2001) y en nuestro conocimiento, en Uruguay no se han registrado casos vinculados a la encefalopatía espongiiforme bovina (Fernández y col., 2001, Perdomo 2001).

Los resultados iniciales de nuestro proyecto de utilización del material óseo xenogénico en situaciones clínicas reales en pequeños animales han sido muy buenos, por lo que decidimos difundir un reporte preliminar.

En nuestros casos no se observaron complicaciones post operatorias inherentes a la utilización de los implantes: infecciones, rechazo o inestabilidad del foco. Sin embargo, dado el número aún escaso de casos tratados, no podemos emitir conclusiones estadísticamente significativas.

La progresión del ensayo proyectado nos permitirá no sólo incrementar la casuística, sino también aumentar el tiempo de seguimiento evolutivo de nuestros casos.

Agradecimientos

A la Cátedra de Biología Celular de la Facultad de Ciencias y a la Cátedra de Oncología Radioterápica, Hosp.de Clínicas, por su contribución en el procesamiento y esterilización respectivamente, de los implantes óseos.

Referencias Bibliográficas

- Bojrab, M.J.** (2001). Técnicas Actuales en cirugía de animales pequeños. 4ª ed. Inter.-Médica, Buenos Aires (Argentina).
- Fernández M., Mañana, G. y Salama R.** (2001). Enfermedades priónicas. Experiencia clínica en Uruguay. Arch Ins Neurol 4(1):49-53.
- Janovec, M. y Dvorák, K.** (1986). Segmental bone defects of rabbit filled with demineralized autolyzed bovine xenoinplant. Scripta Med.Fac. Med. Univ. Brun. 52:299-306, 1986.
- Hallén LG.** (1965). Heterologous transplantation with Kiel Bone: An experimental and clinical study. Acta Orthop 37(1): 1-19.
- Hancox, N.H., Owen, R. y Singleton A.** (1961). Cross-species grafts of deproteinised bone. J Bone Joint Surg. 43 B (1): 152-161.
- Harmon PH.** (1964). Processed heterologous bone implants (Boplant, Squibb) as grafts in spinal surgery. Acta orthop Scand XXXV, 98-116, 1964.
- Lofgren, H., Johannsson, V., Olsson, T., Ryd, L. y Levander, B.** (2000). Rigid fusion after cloward operation for cervical disease using autograft, allograft, or xenograft; a randomized study with radiostereometric and clinical follow-up assessment. Spine 25(15): 1908-1916, 2000.
- Ministerio de Agricultura y Pesca (1983).** Dir. Gen. De Serv. Veterin. 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).
- Nathan, R.M., Bentz, H., Armstrong, R.M., Piez, K.A., Smestad, T.L., Ellingsworth, L.R. y col.** Osteogenesis in rats with an inductive bovine composite. J Orthop Res 6(3):324-334, 1988.
- Perdomo E.** (2001). Observaciones sobre la encefalopatía espongiiforme bovina o "mal de la vaca loca". Arch Ins Neurol 4(1):7-11.
- Pieron, A.P., Bigelow, D. y Hamonic, M.** (1968). Bone grafting with Boplant. Results in thirty-three cases. J Bone and Joint Surg. 50 B (2):364-368. 1968.
- Rubin, A.L., Drake, P., Davison, D., Pfahl, D., Speakman, P. y Schmitt, F.** (1965). Effects of pepsin treatment on the interaction properties of tropocollagen macromolecules. Biochemistry 4(2): 181-190.
- Salama, R., Burwell, R.G., Dickson, I.R.** (1973). Recombined grafts of bone and marrow. The beneficial effect upon osteogenesis of impregnating xenograft (heterograft) bone with autologous red marrow. J Bone Joint Surg. 55 B(2):402-417.

- Salama, R. y Weissman, L.** (1978). The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. *J Bone Joint Surg.* 60-B (1) : 111-115.
- Salama, R., B.M. y Ch, B.** (1983). Xenogenic bone grafting in humans. *Clin Orthop & Rel Res* 174:113-121.
- Slatter, D.** (2002). Textbook of small animal surgery. 3^{ed}. Saunders, United States of América.
- Somoza MJ.** (2001). Epidemiología y vigilancia epidemiológica de las enfermedades priónicas en Argentina. *Arch Ins Neurol* 4(1): 31-33.
- Urist M.R.** Antigen-extracted surface demineralized autolised allogeneic bone for arthrodesis. *In:* Friedlander G.E., Mankin H., and Sell K.W. (eds.), *Osteochondral Grafts*, Little Brown, Boston, pp. 193-201, 1983.
- Urist, M.R., Mikulski, A. and Boyd, S.D.** (1975). A chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone banks. *Arch. Surg.* 110:416-428, 1975.
- Zunino, J.H., Bengochea, M., Johnston, J., Deneo, H., Hernández, S. y col.** (2004). Immunologic and osteogenic properties of xenogenic and allogeneic demineralized bone transplants. 2004. *Cell and Tissue banking* 5:141-148.