

Incorporación de aloinjertos óseos intercalares corticales. Estudio experimental en conejos

Incorporation of cortical intercalary bone allografts. Experimental study on rabbits

S. Amillo¹, F. González², J.A. Illescas²

RESUMEN

Se realiza un estudio experimental en 40 conejos para valorar la incorporación de grandes aloinjertos óseos intercalares y la influencia de la congelación en el injerto óseo. En 36 conejos adultos se procedió a reseccionar 3 centímetros diafisarios de tibia y el defecto se reconstruyó con diferente tipo de injerto óseo: autoinjerto fresco y autoinjerto congelado, aloinjerto fresco y aloinjerto congelado; la osteosíntesis se realizó con dos agujas de Kirschner intramedulares. Se hicieron estudios radiológicos mensuales hasta el sacrificio, a los 2, 4 y 8 meses. Se hizo un estudio densitométrico, histológico y de diafanización con técnica de Spalteholz de las tibias. En 24 animales se administraron 25 mg/kg de oxytetraciclina al 3º y 6º días antes del sacrificio para estudiar la velocidad de aposición ósea en el injerto. Observamos una consolidación radiológica buena y excelente en el 80% de los injertos (99% en los autoinjertos y 66% en los aloinjertos). La densidad ósea mostraba un descenso hasta el 4º mes debido a la reabsorción ósea excepto en el grupo de los aloinjertos frescos. La revascularización de los aloinjertos fue más lenta y pobre que en los autoinjertos, pero con el mismo patrón vascular. La incorporación y neoformación ósea fueron mayores en los autoinjertos sin diferencias significativas con los aloinjertos congelados. La velocidad de aposición ósea no se modificó con los diferentes tipos de injertos óseos utilizados. La congelación facilita y acelera la incorporación y cantidad de neoformación ósea de los aloinjertos.

Palabras clave. Defecto óseo. Aloinjerto. Autoinjerto. Revascularización. Incorporación.

ABSTRACT

An experimental study was carried out on 40 rabbits in order to evaluate the incorporation of large intercalary bone allografts and the influence of freezing on the bone graft. In 36 rabbits resection of 3 centimetres of diaphysis of the tibia was carried out and the defect was rebuilt with different types of bone graft: fresh autograft and frozen autograft, fresh allograft and frozen allograft; osteosynthesis was carried out with two intramedullary Kirschner needles. Monthly radiological studies were made until the sacrifice of the animals, at 2, 4 and 8 months. A densitometric, histological and diaphanisation study of the tibias was made with Spalteholz's technique. In 24 animals 25 mg/kg of oxytetracycline was administered 3 and 6 days before sacrifice, to study the velocity of bone apposition in the graft. We observed a good and excellent radiological consolidation in 80% of the grafts (99% in the autografts and 66% in the allografts). The bone density showed a fall until the 4th month due to bone reabsorption except in the group of fresh allografts. The revascularization of the allografts was slower and poorer than the autografts, but with the same vascular pattern. Bone incorporation and neoformation were greater in the autografts without significant differences with the frozen allografts. The speed of bone apposition did not change with the different types of bone graft used. Freezing facilitated and accelerated incorporation and the quantity of bone neoformation of the allografts.

Key words. Bone defect. Allograft. Autograft. Revascularization. Incorporation.

An. Sist. Sanit. Navar. 2003; 26 (3): 357-363.

1. Profesor adjunto de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra. Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.
2. Médico residente. Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

Aceptado para su publicación el 4 de julio de 2003.

Correspondencia

Santiago Amillo
Clínica Universitaria
Dpto. de Cirugía Ortopédica y Traumatología
Avda. Pío XII, 36
31008 Pamplona
e-mail: samillo@unav.es

INTRODUCCIÓN

A pesar del amplio uso clínico de grandes injertos óseos de bancos de huesos^{1,8}, los procesos biológicos de su incorporación no están estudiados ni comprendidos en su totalidad. Se desconoce el efecto de la congelación de los injertos en las diferentes fases de su incorporación. La indicación principal de este tipo de injertos óseos se realiza en la cirugía conservadora de los tumores malignos de los miembros^{1,7}. Se han publicado numerosos trabajos clínicos de la utilización de aloinjertos congelados y pocos trabajos experimentales⁹⁻¹⁷.

El objetivo de este estudio es estudiar la secuencia de eventos biológicos de la incorporación de los aloinjertos congelados y determinar la influencia de la congelación en la incorporación de los aloinjertos óseos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 40 conejos raza *Oryctolagus cuniculum*, con un peso comprendido entre 2.800 y 3.200 g. Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina 50 mg/ml en dosis de 40 mg/kg intramuscular y uretano al 2% en dosis de 0,75 g/kg intraperitoneal. Se realizó profilaxis antibiótica

con 500 mg de ampicilina vía intramuscular preoperatoria y a las 24 horas de la intervención. El procedimiento quirúrgico se realizó en quirófano experimental bajo máxima asepsia. En todos los animales se intervino el lado derecho previo rasurado de la pata. Se desperiostizó la tibia en una longitud de 5 cm y se realizó una osteotomía transversal 1 cm por debajo de la tuberosidad anterior de la tibia con sierra fina y otra 3 cm distal a la primera, además se reseco 1 cm de la diáfisis del peroné. Se realizaron dos orificios con taladro manual por debajo de los platillos tibiales en las zonas antero-medial y antero-lateral para insertar las agujas de Kirschner de 1 mm de diámetro. La colocación intramedular de las agujas permitió mantener el injerto bien alineado en el resto del hueso. Se emplearon 4 tipos de injertos: autoinjerto fresco, extraído el fragmento óseo de 3 cm se desperiostizó, se lavó en suero fisiológico y se recolocó; autoinjerto congelado, una vez extraído el hueso se sumergió en nitrógeno líquido durante 15 minutos, posteriormente se introdujo durante 5 minutos en suero fisiológico caliente antes de su colocación; aloinjerto fresco, obtenido de la pata derecha de un conejo intervenido inmediatamente antes. El trozo extraído

Tabla 1. Criterios de evaluación radiográfica de injertos óseos según la sociedad internacional de oncología para el salvamento de extremidades (ISOLS).

Categoría	Consolidación	Reabsorción	Acortamiento	Fractura	Fijación
EXCELENTE	Fusión: línea de osteotomía no visible	Sin reabsorción o cambios geométricos	Sin acortamiento	Sin fractura	Sin cambios
BUENO	≥75% Línea ost. aún visible	< del 25%	≤1cm	Fr. Incompleta	Flexión lateral <10° Lisis alrededor tornillos, placas sin fractura
REGULAR	25-75%	25-50%	1-2 cm	Fr. Sin desplazamiento	Flexión lateral >10° Fr. Montaje sin afectar injerto Aflojamiento partes blandas
MALO	<25% Sin signos de callo	>50%	>2cm	Fr. Simple con desplazamiento Fr. Conminuta	Falla del montaje con afección del injerto
MEDICIONES	% de fusión en Rxs. AP y Lateral Fusión perióstica. Fusión primaria	% de reabsorción	Longitud del acortamiento	Tipo	Fijación con: placas, clavos o agujas

Nota: La falta de consolidación estuvo definida por la persistencia de una zona radiolúcida continua en la unión injerto-receptor. Además se evaluó en términos de porcentaje según la proporción de fusión en la unión injerto-receptor, el tiempo de aparición del callo, el momento en que ponteaba las osteotomías y las características de éste, así como también la densidad ósea tanto del injerto como del receptor a lo largo del tiempo.

pasa directamente a formar parte del banco de huesos, congelándose en nitrógeno líquido y almacenándose en un congelador a -80^o C; aloinjerto congelado, mantenido en el banco de huesos a -80^o C donde se habían almacenado un mes antes fragmentos de 3 cm diafisarios de tibia de conejos en condiciones estériles y en recipientes impermeables y resistentes al frío. La estabilización de los injertos óseos con 2 agujas de Kirschner se comprobó con escopia radiológica y placa radiográfica. Finalizada la intervención colocamos bota de escayola durante 15 días para proteger la pata intervenida. Los animales se agruparon en lotes según el tipo de injerto. Tres animales de cada lote fueron sacrificados al cabo de 2, 4 y 8 meses de la intervención, en total 36 conejos. Se realizaron radiografías en proyección antero-posterior y lateral en todos los conejos con un aparato portátil (Siemens siremobil 4 K) a los: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 y 240 días. La radiografía se hizo con 40 Kv y 0,50 mseg. Para la valoración radiológica se siguió la utilizada por la sociedad internacional de salvamento de extremidades¹¹, especificada en la tabla 1. El estudio densi-

tométrico se realizó mediante cuantificación digital radiológica con el densitómetro "X-ray Bone Densitometer Hologic II QDR TM-1000" que emplea un doble pulso de energía (70-140 Kv) en todas las tibias intervenidas después del sacrificio de los animales. Como parámetro de referencia se tomó el valor densitométrico de la tibia contralateral. En 12 conejos, uno por cada tiempo de evolución, se realizó el relleno manual del árbol vascular por la arteria ilíaca con 30 cc de Azul Berlín al (10%) previo al sacrificio y posterior técnica de Spalteholz¹⁸. En 24 conejos, dos por cada período de evolución se realizó estudio histológico simple y de fluorescencia con cortes longitudinales de la tibia. Se emplearon las técnicas de tinción de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. La valoración histológica simple se realizó con el sistema modificado de Nilsson y col¹⁹ (Tabla 2). Veinticuatro conejos fueron inyectados con una dosis de 25 mg/kg de oxitetraciclina (terramicina IM) por vía intramuscular 6 y 3 días antes de su sacrificio. Las pruebas se procesaron con técnica de Serrano²⁰. Para medir la distancia entre las bandas de tetraciclina hemos

Tabla 2. Evaluación de las características morfológicas de los extremos de unión del injerto, de la médula y del hueso cortical.

Unión:	<ul style="list-style-type: none"> • Sin unión • Fibrosa • Fibrocartilaginosa • Ósea • Completa con hueso cortical
Callo:	<ul style="list-style-type: none"> • Ninguno • Pequeña cantidad • Moderada cantidad • Profuso • Ponteando
Médula ósea:	<ul style="list-style-type: none"> • Necrótica • Reemplazada por tejido fibrinoso • Reemplazada por tejido fibroso nuevo • Reemplazada en < 50% por tejido nuevo • Reemplazada en > 50% por tejido nuevo o médula roja • Médula ósea normal
Injerto:	<ul style="list-style-type: none"> • Hueso necrótico 100% • Hueso nuevo en los extremos de unión • Hueso nuevo perióstico • Hueso nuevo endóstico • Completo reemplazo por hueso nuevo

Sistema modificado de graduación histológica de Nilsson¹⁹, realizando además una valoración cualitativa del hueso neoformado con respecto al necrótico.

empleado un método manual utilizando un micrómetro calibrado. Los datos cuantitativos obtenidos fueron sometidos a un programa estadístico "Start View" con un ordenador "Apple Macintosh Plus" y se aplicó el Test del Chi-cuadrado, con una $p < 0,05$.

RESULTADOS

En todos los autoinjertos frescos y congelados se observó radiográficamente formación de callo óseo en la unión proximal a los 15 días y en los aloinjertos congelados a los 22 días, siendo en los aloinjertos frescos más tardía con una media de 25 días. En el extremo distal la unión fue más tardía, 20 días para los autoinjertos y 28 días en los aloinjertos (Tabla 3). La unión se realizó entre el hueso receptor y el injerto preferentemente por un puente perióstico. La consolidación global de los injertos fue del 80,5%. Los autoinjertos presentaron fusión excelente o buena en el 94% y los aloinjertos en el 66% (Tabla 4). No hubo fracturas y en 3 aloinjertos se produjo una reabsorción del 30% del injerto. La densidad mineral ósea de la tibia control fue de 0,147 g/cm² y los resultados evolutivos del estudio densitométrico de los injertos se observan en la figura 1. No hubo diferencias significativas entre los lotes y la mayor densidad se observó a los

dos meses de evolución de los injertos con una diferencia significativa en los grupos de 4 y 8 meses de evolución. Los estudios de diafanización de las tibias mostraron a los 2 meses de evolución una revascularización de los injertos por vasos procedentes de las partes blandas que rodean a los injertos. Entre el 2° y 4° mes se observó irrigación endomedular y anastomosis con la circulación perióstica. Con el tiempo la revascularización se hizo de predominio proximal y la penetración vascular fue más completa y precoz en los autoinjertos. Los animales con aloinjerto fresco fueron el grupo de menor neoformación de hueso, presentando una médula ósea necrótica. Los aloinjertos congelados tuvieron un patrón similar de los autoinjertos con buena fusión y a los 8 meses el 50% de hueso era de neoformación. El proceso de reabsorción y formación de hueso fue más intenso en el tercio proximal de la tibia. La reabsorción y neoformación ósea sucedió antes en el grupo de los autoinjertos. Los dobles marcajes con tetraciclina fueron más intensos en los puntos de unión con el hueso receptor y en la periferia del injerto. A los 4 meses los autoinjertos tenían dobles marcajes a lo largo de todo el injerto más intensos próximalmente. En los aloinjertos la imagen fue similar aunque con menor captación. A los 8 meses se

Tabla 3. Tiempo medio en días de formación de callo óseo inicial y de unión entre el injerto y el hueso receptor.

CALLO ÓSEO TIPO DE INJERTO	APARICIÓN INICIAL		UNIÓN	
	Proximal	Distal	Proximal	Distal
Auto Fresco	15	21	32	33
Auto Congelado	15	20	38	40
Alo Fresco	22	30	40	50
Alo Congelado	25	28	35	37
Tiempo Medio	19	25	36	40

Tabla 4. Porcentaje medio de consolidación de los cabos proximal y distal a los 2, 4 y 8 meses.

% CONSOLIDACIÓN TIPO DE INJERTO	PROXIMAL	DISTAL
AUTO FRESCO	100	89
AUTO CONGELADO	89	83
ALO FRESCO	75	58
ALO CONGELADO	83	81

apreció una disminución global de los marcajes. La velocidad de aposición ósea varió según el tiempo de evolución y la zona del injerto, pero no hubo diferencia entre los lotes (Fig. 2).

DISCUSIÓN

La demanda creciente de injertos óseos para la reconstrucción de defectos creados después de la resección de tumores en la cirugía conservadora de extremidades, para el rescate de prótesis o para los defectos creados por un traumatismo de alta

velocidad han aumentado el interés por el conocimiento del comportamiento biológico de los aloinjertos, para evitar en lo posible las complicaciones de su uso sobre todo la pseudoartrosis y las fracturas^{16,21-25}.

La radiografía ósea simple ha sido de utilidad en este estudio, para evaluar la incorporación del injerto con una buena correlación histológica y de gran utilidad para conocer la evolución de la incorporación y diagnóstico de las complicaciones. La radiografía simple ofrece una orientación eficaz en el seguimiento del proceso

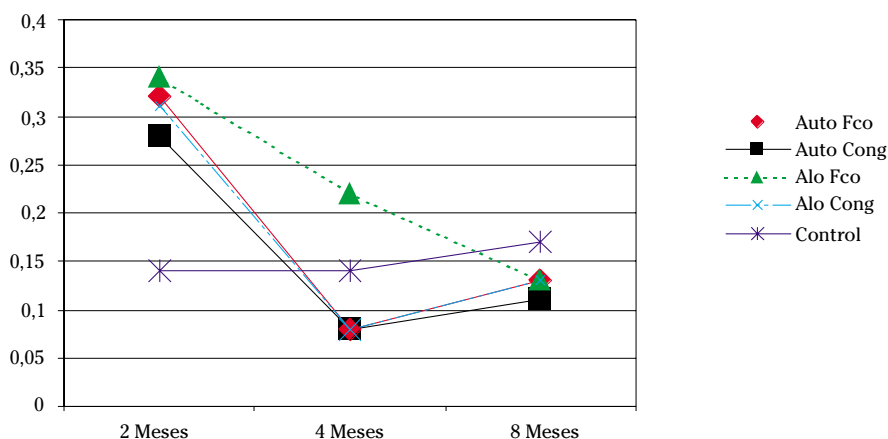


Figura 1. Valores medios de la densidad mineral ósea (BMD) de los diferentes injertos y periodos de evolución (BMD gr/cm² vs tiempo).

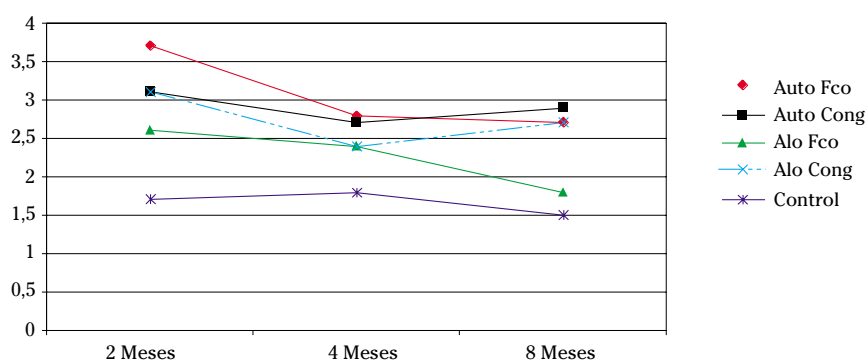


Figura 2. Evolución de la velocidad de aposición ósea (VAO) a los 2, 4 y 8 meses de la implantación de los diferentes injertos óseos (VAO vs tiempo).

de incorporación de los injertos óseos, aunque no es capaz de distinguir entre una unión fibrosa o cartilaginosa ni de valorar objetivamente la densidad mineral ósea de un injerto. Coincidimos con otros trabajos al afirmar que, la densitometría ósea es un método útil en la valoración de la mineralización del injerto y del callo óseo^{6,16,25,26}.

La congelación del injerto no influye en los fenómenos de incorporación del injerto óseo puesto que no hemos observado diferencias entre el autoinjerto fresco y el congelado. La densitometría ósea no es útil para determinar el momento de la consolidación, ni de la incorporación, pero puede determinar la solidez del injerto durante su evolución²⁶. El hecho de no haber encontrado diferencias de densidad mineral ósea entre los injertos indica que el método es poco sensible o bien que el proceso de mineralización no estaría influenciado por la respuesta inmunológica ni por el proceso de congelación.

El patrón de revascularización fue similar en los diferentes injertos óseos corticales intercalares estudiados. La revascularización endomedular y cortical en los aloinjertos fue más tardía y menos cuantiosa, siendo peor en los aloinjertos frescos. La incorporación de un injerto depende en mayor medida de la adecuada vascularización del lecho receptor que de la capacidad osteoinductora del propio injerto²⁷. La localización del lecho receptor en el esqueleto también influye en la incorporación y consolidación de los aloinjertos²⁸, en la tibia del conejo el tercio proximal es mejor que el distal.

El uso de la fluorescencia con doble marcaje de tetraciclina es útil para precisar las zonas de neoformación ósea y para conocer indirectamente la actividad de los osteoblastos en un lugar y momento dados. La reabsorción del tejido óseo necrótico por osteoclastos y posterior neoformación ósea por frentes de osteoblastos se produce inicialmente por los extremos de unión con el injerto y a través de los canales de Havers. Por los extremos y desde el periostio y endostio el injerto es incorporado lentamente y este proceso no ha concluido a los 8 meses de evolución, aunque el autoinjerto fresco es el más pre-

coz. La congelación facilita y acelera la incorporación de los aloinjertos en los que se observa una mayor revascularización y cantidad de neoformación ósea con resultados próximos a los autoinjertos y mejor que los aloinjertos frescos.

Concluimos que los aloinjertos congelados intercalares corticales son útiles para la reconstrucción de defectos óseos cuando no dispongamos de autoinjertos, ya que tienen un buen comportamiento biológico con pocas complicaciones, no obstante tendremos que evitar la transmisión de enfermedades (sobre todo la hepatitis y el SIDA) con controles clínicos rigurosos en los donantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. AMILLO S, CARA JA, VALENTÍ JR. Banco de tejidos del sistema músculo-esquelético. Aplicaciones clínicas. *Rev Med Univ Nav* 1990; 34: 227-234.
2. ANDERSON KJ, LECOCQ FJ, AKESON WH, HARRINGTON PR. End-point results of processed heterogeneous, autogenous and homogenous bone transplants in the human: A histologic study. *Clin Orthop* 1964; 24: 97-105.
3. BONFIGLIO M. Transplantation of massive bone allografts. *N Engl J Med* 1976; 294: 1285-1286.
4. BURCHARDT H, ENNEKING WF. Transplantation of bone. *Surg Clin North Am* 1978; 58: 403-407.
5. CARA JA, GIL J, AMILLO S, CAÑADELL J. Utilización de aloinjertos masivos en la cirugía reconstructiva tumoral. *Rev Ortop Traum* 1992; 3618: 8-16.
6. HEIPLE KG, CHASE SW, HERNDON CH. A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. *J Bone Joint Surg (A)* 1963; 45: 1593-1616.
7. Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. *Clin Orthop* 1983; 174: 69-86.
8. TOMFORD WW, STARKWEATHER RJ, GOLDMAN MH. A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. *J Bone Joint Surg (A)* 1981; 63: 244-248.
9. AEBI M, REGAZZONI P, SCHWARZENBACH O. Segmental bone grafting. Comparison of different types of grafts in dogs. *En: Orthop (SICOT)* 1989; 13: 101-111.

10. ALBREKTSSON T. The healing of autologous bone grafts after varying degrees of surgical trauma. A microscopic and histochemical study in the rabbit. *J Bone Joint Surg (B)* 1980; 62: 403-410.
11. BOHR H, RAVN HO, WERNER H. The osteogenic effect of bone transplants in rabbits. *J Bone Joint Surg (B)* 1968; 50: 866-873.
12. KERRY RM, MASRI BA, GARBUZ DS, CZITROM A, DUNCAN CP. The biology of bone grafting. *Instr Course Lect* 1999; 48: 645-652.
13. BURWELL RG. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. *Clin Orthop* 1985; 200: 125-141.
14. CARA JA, GIL J, AMILLO S, CAÑADELL J. Bone allograft after segmental resection of bone grafting. *Vammale* 1992; 191-192.
15. GONZÁLEZ DEL PINO J, AGUADO MB, RANDOLPH MA, WEILAND AJ. La irradiación del donante como método inmunosupresor en transplantes óseos vascularizados. Efectos sobre el tejido óseo. *Rev Ortop Traum* 1991; 35: 284-293.
16. KÖHLER P, EHMBERG A, KREICBERGS A. Osteogenic enhancement of diaphyseal reconstruction. Comparison of bone grafts in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 1990; 61: 42-45.
17. WEINER SD, SCARBOROUGH M, GRIEND VG. Resection arthrodesis of the knee with an intercalary allograft. *J Bone Joint Surg (A)* 1996; 78: 185-192.
18. SPALTEHOLZ W. *Über das durchichtigmachen von menschlichen und tierischen preparaten: nebst Anhang: Über knochenfarbung.* 1911; Hirzel, Leipzig.
19. NILSSON OS, URIST MR, DAWSON EG, SCHMAZRIED TP, FINERMAN GAM. Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *J Bone Joint Surg (B)* 1986; 68: 635-638.
20. SERRANO S, MARIÑOSO ML. Histomorfometría ósea. En: Serrano S, Aubia J, Mariñoso M.L, (Eds): *Patología ósea metabólica* 1990, Barcelona. Ed. Doyma. 71-89.
21. STEVENSON S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogenic bone grafts. *Clin Orthop* 1998; 355: 239-246.
22. FRIEDLAENDER GE. Current concepts review bone-banking. *J Bone Joint Surg* 1982; 64: 307-311.
23. GOSAIN AK, SONG L, SANTORO TD, AMARANTE MT, SIMMONS DJ. Long-term remodeling of vascularized and nonvascularized onlay bone grafts: a macroscopic and microscopic analysis. *Plastic Reconstr Surg* 1999; 103:1443-50.
24. KLEIN LR, DOLLINGER B, GOLDBERG VM, ZIKA JM, POWELL AE, HEIPLE KG. Effects on bone of vascular interruption. Turnover and morphology in isotope-prelabelled rats. *Acta Orthop Scand* 1985; 56: 47-51.
25. SIMÓN P, BABIN SR, DELLOYE C, SCHMITT D. Multiple perforation in cryogenically preserved bone allografts. Comparative histological and microradiographic study of perforated and non-perforated allograft in sheep. *Int Orthop* 1993; 17: 98-103.
26. FRIEDMAN S, DUBOVSKY EV, DUBOVSKY J. Mineral content of bone measurement by energy subtraction digital chest radiography. *Ann J Radiol* 1987; 149: 1199-1202.
27. CZITROM AA, WINKLER H. 1996. *Orthopaedic Allograft Surgery.* Springer-Verlag. Wien (Austria).
28. FRIEDLAENDER GE. Bone banking. In support of reconstructive surgery of the hip. *Clin Orthop* 1987; 225: 17-21.

