



Injertos de Médula Osea por Aspiración en Defectos Diafisarios*

Doctores: Germán Carrillo, José Navas, Alfredo García,
Mauricio Morales, Orlando Amorochó y Javier Díaz**

RESUMEN

La utilización de injertos óseos busca lograr una mayor consolidación ósea en situaciones clínicas particulares, tales como defectos por trauma, retardos de consolidación, artrodesis y tumores.

Existe evidencia de la capacidad osteogénica de la médula ósea como mecanismo de consolidación y los métodos actuales a partir de injertos autólogos de cresta ilíaca y de banco de hueso, ofrecen aún una disponibilidad muy limitada.

Este trabajo presenta los resultados de un estudio experimental en defectos óseos de conejos, tratados con injertos de médula ósea (MO) e Injertos corticoesponjosos (CE) convencionales, efectuando un seguimiento comparativo radiológico, anatomopatológico y biomecánico al final de la consolidación.

Los resultados obtenidos teniendo en cuenta los parámetros establecidos, mostraron consolidación ósea avanzada, tanto en los defectos con MO, como en los de CE.

Se confirmó la actividad osteogénica propia de la médula ósea y la posibilidad de su aplicación clínica, debe ser tomada en cuenta en casos seleccionados.

INTRODUCCION

El interés por la osteogénesis de los injertos óseos ha sido materia de análisis y experimentación desde mediados del siglo pasado hasta la actualidad, cuando las publicaciones tanto clínicas como de estudios experimentales en modelos de animales han aumentado, generándose controversias aun teóricas, que han sido la base para la búsqueda de soluciones a complejos problemas tales como retar-

dos de consolidación, pseudoartrosis, defectos óseos masivos por trauma, infecciones, malformaciones congénitas y tumores².

* Trabajo presentado en el XXXIII Congreso Nacional de Ortopedia y Traumatología, Cali, Octubre 1988. Segundo Mejor Trabajo Libre.

** Centro Médico de los Andes, Fundación Santafé de Bogotá, Pontificia Universidad Javeriana.

La mayoría de los autores han manifestado que sus experiencias con los injertos de banco de hueso son menos satisfactorias que las realizadas con hueso autólogo^{1, 2}. El injerto óseo autólogo fresco es el material a injertar más efectivo, las otras alternativas son los diferentes métodos de preservación de hueso homólogo, provenientes de los bancos de tejido que suplen la necesidad de disponer de mayor cantidad de hueso para trasplantar, pero que tienen las mismas complicaciones inmunológicas de los demás tejidos homólogos, o sea que por el hecho de ser un tejido muerto no contribuyen directamente con la osteogénesis de la reparación, siendo entonces necesario que el mismo huésped sea quien finalmente reemplace este tejido por hueso nuevo.

Las investigaciones actuales utilizan sustancias osteogénicas, osteoconductoras y osteoinductivas con las cuales experimentan mecanismos alternos en la reparación ósea del injerto⁴.

La osteogénesis es la producción de hueso a partir de células preexistentes diferenciadas o determinadas, las cuales se encuentran en la médula ósea y en el hueso autólogo. La osteoconducción es la diferenciación a osteoblastos a partir de células del tejido conectivo o del mesénquima, ante la presencia de un estímulo inductivo como la proteína morfogénica identificada por Urist¹², a partir del hueso desmineralizado y más recientemente con los injertos osteoconductoras tales como los sustitutos óseos bioinertes de cerámica o biodegradables de hidroxapatita o fosfato tricálcico, los cuales se comportan como un sustrato para la invasión vascular y la migración de componentes celulares formadores de hueso, al ser implantados con proteína morfogénica y médula ósea^{6, 7}.

En la médula ósea se ha encontrado un creciente interés clínico en cirugías reconstructivas con defectos óseos importantes. Es indudable su potencial osteogénico demostrado en los últimos años, utilizándola como injerto único o asociada con injertos autólogos descalcificados, homólogos preservados, heterólogos tratados, o más recientemente asociados con los materiales de cerámica y biodegradables^{1, 5, 7, 11, 12, 13}.

Osteogénesis de la médula ósea

La médula ósea y el tejido óseo están ligados no sólo anatómicamente y circulatoriamente, sino también en los procesos de reparación ósea. En el adulto normal la médula ósea roja se encuentra localizada en el esqueleto axial y proximal de los huesos largos y en el animal joven se encuentra distribuida en todo el esqueleto.

La arteria nutricia del hueso abastece la médula ósea, el hueso cortical, el esponjoso y el cartílago de

crecimiento. En el hueso compacto la dirección del flujo circulatorio es centrífuga del endostio hacia el periostio, existiendo un flujo de retorno de las partes profundas corticales a través de los sinusoides venosos de la médula ósea.

La médula ósea roja está compuesta por células hematopoyéticas y estroma, que consiste en células fibroreticulares y endoteliales que revisten los sinusoides medulares. Burwell postuló la importancia de estas células de recubrimiento de los sinusoides vasculares, describiéndolas como células primitivas osteoprogenitoras; desde entonces, experimentalmente, se han utilizado como autoinjerto para formar hueso a nivel subcutáneo; a nivel intramuscular en cámaras de difusión in vivo y en cultivos in vitro para determinar la secuencia de la diferenciación osteogénica, a partir de células del estroma medular. Igualmente demostró que los injertos que contenían médula ósea, eran más osteogénicos que los que no la contenían^{1, 2}.

McGaw y Harbin, fueron los primeros en demostrar la actividad osteogénica de la médula ósea injertando defectos óseos en peronés de perros, comparándolos con defectos contralaterales sin injertos¹⁰.

Células precursoras osteogénicas

Existen dos teorías respecto a la formación de los osteoblastos, condroblastos, osteoclastos y fibroblastos: la primera afirma que es a partir de una sola línea celular, mientras que la segunda sostiene, que son descendientes de líneas celulares separadas.

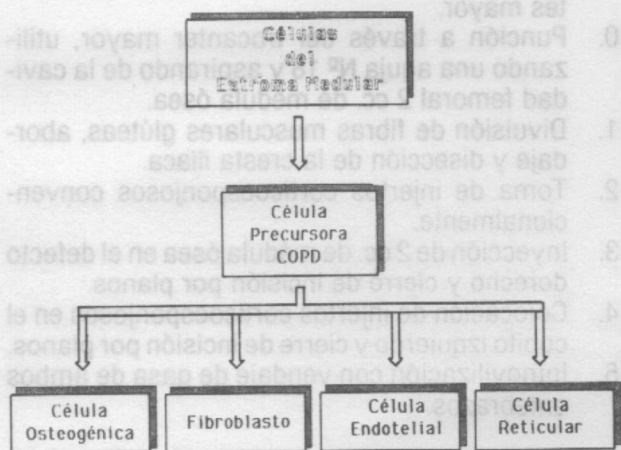
Investigadores como Friedenstein, Owen y Vaughan^{2, 8, 9}, partiendo de estudios in vivo con médula ósea y cultivos de estroma medular en conejos, han manifestado la existencia de dos tipos de células precursoras osteogénicas: la célula osteogénica precursora determinada (COPD) y la célula osteogénica precursora inducible (COPI), las cuales se diferencian a osteoblastos y depositan matriz ósea.

La COPD es una célula primitiva mesenquimal del estroma medular y la superficie del hueso, que es capaz de autoreplicarse y de generar células osteoblásticas diferenciadas, independientemente de un agente inductor. La COPI es igualmente una célula mesenquimal, que se diferencia a osteoblasto, pero solo en presencia de un agente inductor. Se encuentra presente en el tejido conectivo y en la sangre periférica.

Lindholm⁵ y Urist¹², encuentran esta clasificación arbitraria y consideran que las células perivasculares reticulares, son aquellas prediferenciadas que responden al trauma o al trasplante como células del endostio. Estos autores, al igual que Nade,

Cuminee y Wittbjer en publicaciones simultáneas, informan que la asociación de hueso autólogo desmineralizado con médula ósea y de proteína morfogénica combinada con médula ósea, aportan cuantitativamente mayor producción ósea que la suma de los mismos trasplantes por separado^{6, 7, 13}.

Owen, en sus estudios ya mencionados, concluye que el osteoblasto y el osteoclasto derivan de líneas celulares diferentes, del estroma celular y del sistema hematopoyético, respectivamente, sin existir transformación de dichas células de un sistema a otro.



Injertos Medulares Autólogos

La formación de hueso nuevo en trasplantes heterotópicos de médula ósea se ha identificado mediante la utilización de cámaras de difusión *in vitro* a nivel intraperitoneal e intramuscular, estableciéndose que el origen de la diferenciación se efectúa a partir de células endósticas y osteoblásticas, del estroma medular y del tejido del huésped.

El mecanismo por el cual se desencadena la formación ósea se desconoce, Friedenstein y Burwell consideran que las células donantes son las que promueven la diferenciación a tejido óseo; Urist menciona la necesidad de una substancia inductora, bien sea propia del tejido medular o propia del huésped para la diferenciación ósea^{1, 2, 3}.

Cultivos *in vitro* de médula ósea

Utilizando células del estroma medular del conejo, Owen realizó cultivos en medios especiales *in vitro*⁹, en los cuales demostró la formación de grupos de células fibroblásticas conformando colonias que posteriormente desarrollaron nódulos de mineralización. Estas colonias formadoras denominadas unidad formadora de colonias fibroblásticas (UFC-F) desarrollan características osteogénicas a partir de una línea celular única. Tibone y Bernard⁹, encon-

traron colonias osteogénicas, igualmente *in vitro* que llamaron unidad formadora de colonias osteogénicas (UFC-O) con una célula primitiva común.

Cerámicas porosas combinadas con médula ósea

Nade utilizó materiales biodegradables de cerámica; de fosfato tricálcico e hidroxiapatita; solos y en combinación con médula ósea, encontrando formación de hueso a través de la estructura porosa del material, que actúa como base para la aposición ósea⁷.

La experimentación a nivel de materiales biodegradables como substitutos óseos, se encuentra actualmente en una fase investigativa, con grandes perspectivas y su interrelación con médula ósea autóloga depende de dichos avances.

OBJETIVOS

Efectuar un estudio experimental en conejos, tomando médula ósea por aspiración, de la cavidad medular del fémur, para injertarla en un defecto óseo previamente creado en la diáfisis del cúbito. En un defecto similar en el cúbito contralateral del mismo animal, injertar hueso corticoesponjoso tomado de la cresta ilíaca, con el fin de efectuar un seguimiento comparativo de la consolidación ósea en los dos grupos.

Realizar controles radiológicos, anatomatológicos y biomecánicos, sometiendo los dos modelos a fuerzas de doblamiento y torsión, utilizando una máquina Instron previamente calibrada, para evaluar los resultados.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización del estudio, se utilizaron 12 conejos Nueva Zelanda, con edad promedio de 3 meses y 2.500 grs. de peso. Fueron colocados en jaulas aisladas y las intervenciones fueron practicadas en el laboratorio de cirugía experimental de la Clínica Barraquer.

Se empleó la diáfisis del cúbito para la creación del defecto óseo, resecaando por lo menos dos veces el diámetro de la diáfisis del hueso, generando así un defecto que experimentalmente se ha demostrado, no tiene posibilidad de consolidación en ausencia de tratamiento. El radio actuó como tutor de fijación para mantener la estabilidad de los fragmentos.

Una vez creados los defectos bilaterales, se obtuvo médula ósea por aspiración, de la cavidad medular de la diáfisis femoral y a las primeras tomas del aspirado medular, se les practicó un extendido para documentar microscópicamente la presencia de los componentes celulares medulares; posteriormente, de acuerdo al volumen del aspirado, se determinó la cantidad de médula ósea a injertar en

todos los conejos. El aspirado fue inyectado inmediatamente después de su toma, procediendo al cierre de la herida para evitar su extravasación (Fig. 1).

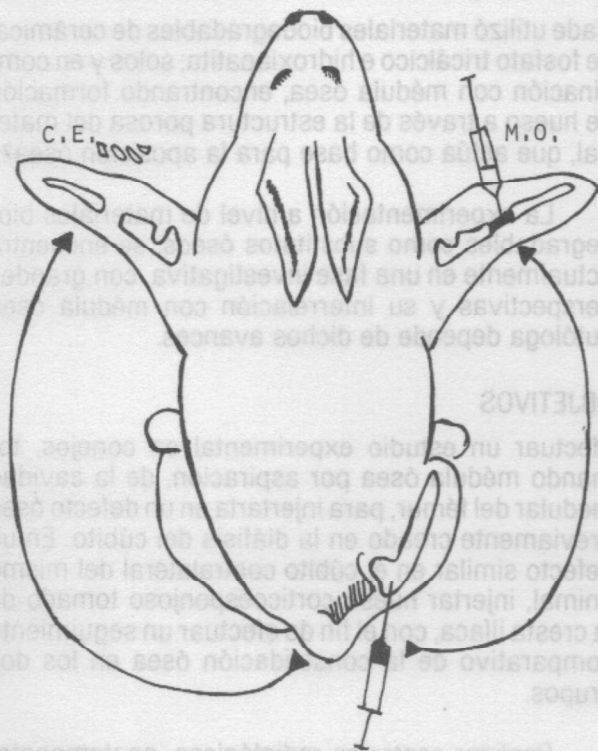


Figura 1. Procedimiento Quirúrgico

Procedimiento quirúrgico

1. Rasurado de ambos antebrazos y de la cadera derecha del conejo.
2. Asepsia del campo quirúrgico con Isodine.
3. Infiltración local subcutánea con Xilocaína a nivel proximal, en el primer antebrazo.

Se practicó la toma de injertos corticoesponjosos de la cresta ilíaca del conejo, tomando fragmentos suficientes para el llenamiento del defecto óseo contralateral.

Previamente a la cirugía se administró profilaxis antibiótica con Penicilina Procaínica de 400.000 unidades/Im.

Procedimiento anestésico

Se utilizó Clorhidrato de Ketamina a razón de 15 mgrs/Kg en dosis única por vía intramuscular como agente inductor, previo a la canalización de la línea venosa. Para el mantenimiento, se aplicó una dilución establecida de Pentotal Sódico por vía endovenosa en el dorso de la oreja del conejo, administrándola de acuerdo a su respuesta al agente anestésico.

4. Incisión posterolateral sobre el tercio medio del antebrazo, de piel y aponeurosis.
5. Divulsión de masa muscular extensora e incisión longitudinal del periostio y resección del mismo.
6. Sección de un segmento diafisario a nivel del tercio medio del cúbito de 1 cm de longitud, con sierra manual de Gigli.
7. Se practica el mismo procedimiento en el antebrazo contralateral.
8. Incisión longitudinal desde la prominencia del trocanter mayor en dirección a la cresta ilíaca derecha.
9. Sección de aponeurosis y abordaje del trocantes mayor.
10. Punción a través del trocanter mayor, utilizando una aguja Nº 18 y aspirando de la cavidad femoral 2 cc. de médula ósea.
11. Divulsión de fibras musculares glúteas, abordaje y disección de la cresta ilíaca.
12. Toma de injertos corticoesponjosos convencionalmente.
13. Inyección de 2 cc. de médula ósea en el defecto derecho y cierre de incisión por planos.
14. Colocación de injertos corticoesponjosos en el cúbito izquierdo y cierre de incisión por planos.
15. Inmovilización con vendaje de gasa de ambos antebrazos.

Evaluación radiológica

Se practicaron controles radiológicos en ambos antebrazos, a la segunda y sexta semanas postinjerto.

Para la evaluación se siguieron los criterios radiológicos establecidos por Lane⁴, que incluyen los siguientes parámetros:

1. Formación ósea

No formación	0
Formación del 25%	1
Formación del 50%	2
Formación del 75%	3
Formación completa	4
 2. Consolidación

Línea de fractura visible	0
Línea de fractura parcial	2
Línea de fractura ausente	4
 3. Remodelación

Sin evidencia	0
Remodelación canal IM.	2
Remodelación de corteza	4
- Puntuación máxima 12

Evaluación histológica

Los animales fueron sacrificados a la séptima semana, obteniendo cortes a nivel del defecto consolidado en los dos grupos, evaluándolos parcialmente de acuerdo a los parámetros histológicos de consolidación de Lane⁴.

1. Consolidación	
Sin consolidación	0
Consolidación fibrosa	1
Consolidación osteocondral	2
Consolidación ósea	3
Puntuación máxima	3

Evaluación biomecánica

Se seleccionaron 2 especímenes de MO y 2 de CE, colocando en la máquina Instron los antebrazos previamente desarticulados y desnudos de todo tejido blando adyacente, preservando el radio intacto. Se registró en un gráfico la resistencia a la fuerza tensional progresiva en kilogramos, hasta el momento de la fractura.

RESULTADOS

Análisis radiológico

Se realizaron controles radiológicos en ambos grupos: médula ósea (MO) y cortico esponjoso (CE), a la segunda, cuarta y sexta semanas post-injerto. Para los resultados se tuvieron en cuenta solamente las series radiográficas de la segunda semana, que se denominó serie 1 y de la sexta semana, que se denominó serie 2. Se analizaron de acuerdo a los criterios de Lane, las radiografías de los doce conejos en ambas series, con un puntaje máximo de 144 para cada serie.

Los injertos de MO de la serie 1 mostraron un puntaje de 11 (7.6%), no evidenciando aún formación importante de hueso nuevo, siendo claramente visible las líneas de resección del defecto. Los injertos CE tuvieron un puntaje de 15 (10.4%), mayor por las características de densidad radiológica propias del hueso cortico esponjoso, siendo también visibles las líneas de resección.

Los controles de la serie 2 mostraron cifras mayores, los de MO 96 (67%), y los de CE 69 (48%) sobre la puntuación definitiva. Esta evaluación radiológica nos permite ver consolidaciones avanzadas, de características similares en ambos grupos, siendo sensiblemente mayor en el grupo de MO por la presencia de remodelación completa del canal intramedular y de la corteza en 6 defectos con MO y en 2 defectos con CE.

El caso 1 y 7 de MO, y el 4 de MO y CE tuvieron un puntaje definitivo bajo debido a la presencia de infección temprana de la herida quirúrgica. El caso 12 de CE obtuvo consolidación, aun cuando presentó un gran desplazamiento del fragmento proximal.

Análisis histológico

Se efectuó a la séptima semana el estudio definitivo anatomopatológico a seis especímenes de cada grupo, realizando cortes transversales y preparándolos con tinción de hematoxilina y eosina.

Con base a los parámetros establecidos, sobre un puntaje total máximo de 18 para cada grupo, se encontraron 14 puntos (78%), para los injertos de MO y 15 puntos (83%), para los CE. La puntuación histológica fue sensiblemente igual en ambos grupos, observando un patrón de consolidación ósea avanzada, con predominio de osteocitos y matriz intercelular madura con lagunas de tejido de neoformación vascular. En algunos casos se evidenció actividad condroblástica como patrón predominante, característico de una osificación osteocondral con consolidación moderada, como ocurrió en el conejo N° 4. En los dos grupos de los conejos 2 y 3 se determinó la presencia de reacción inflamatoria aguda con formación ósea irregular, compatible con un proceso de osteomielitis.

Análisis biomecánico

Se seleccionaron 2 casos de MO y 2 de CE, que fueron sometidos a fuerzas de doblamiento en la máquina Instron, previamente calibrada, a una fuerza máxima de 20 kg., con una velocidad de 1 m.m. por minuto. Se encontró una resistencia al doblamiento similar en todos los grupos.

La prueba se inició sometiendo los especímenes a fuerzas graduales desde 1 kg. La máxima resistencia obtenida antes de la fractura fue de 15 Kg., en el antebrazo 11 de MO, y 12,4 en el antebrazo 11 de CE. En el antebrazo 12 la fractura se presentó a los 11.3 Kg. en MO y 11.4 Kg en CE.

En todos los casos la fractura ocurrió a nivel del sitio de consolidación del defecto.

DISCUSION

Es inobjetable la participación directa que tiene la médula ósea en la génesis de la formación ósea, demostrada a través de la literatura de los últimos veinte años y confirmada una vez más en este estudio. Esta participación se efectúa por la existencia de células osteoprogenitoras formadoras de hueso presentes en la médula ósea, capaces de autorreplificarse y por el mesénquima, susceptibles a diferenciarse a osteoblastos mediante estímulos inductivos. Sin embargo no ha sido posible, por los métodos

actuales de medición cuantificar de manera exacta dicha contribución^{1, 2, 4, 6, 8, 9, 10}.

El estudio comparativo de los dos grupos de injertos, de médula ósea y de hueso corticoesponjoso, pretendió determinar la formación ósea a través de dos vías diferentes de consolidación: el mecanismo medular a partir de células óseas predefinidas y el mecanismo osteoinductivo, a partir de células no diferenciadas del mesénquima, ante la presencia de un estímulo inductor del tejido corticoesponjoso.

En cuanto a la técnica quirúrgica, es importante resaltar que en el presente trabajo el periostio fue resecaado bajo visión directa alrededor del defecto, para eliminar su contribución en la osteogénesis y los injertos colocados en espacios delimitados únicamente por las masas musculares, siendo susceptible la extravasación del injerto medular del sitio del defecto por su consistencia líquida. En la práctica clínica es recomendable la preservación del periostio alrededor de la lesión y la técnica de colocación atraumática, de ser posible debe ser percutánea, cuando se desee su utilización aislada en casos seleccionados.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la apariencia radiológica del estado de consolidación a la sexta semana mostró formación ósea avanzada con remodelación cortical (Fig. 2, 2A) siendo comparativamente similar la incorporación del injerto en ambos grupos. Los resultados histológicos confirmaron consolidación ósea avanzada igual, en ambos grupos, sin poder determinar la presencia de remodelación cortical debido al corte transversal realizado alrededor del segmento consolidado.

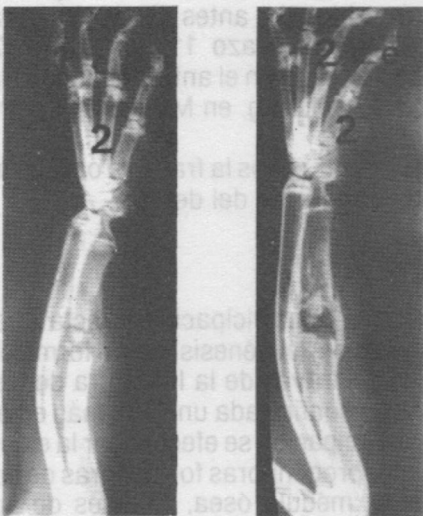


Figura 2. Injerto cortico esponjoso las 2 semanas y 6 meses post-operatorio.



Figura 2A. Injerto de médula ósea por aspiración a las 2 semanas y 6 semanas post-operatorio.

El comportamiento biomecánico de los defectos, aun cuando solo fue documentado en 2 especímenes, nos permitió observar la fractura del antebrazo, a nivel del sitio de consolidación, con fuerzas tensionales de doblamiento similares.

El empleo de los injertos de médula ósea nos permitió obtener consolidaciones de características semejantes a los injertos corticoesponjosos convencionales bajo los parámetros de medición utilizados.

La técnica para obtenerlos clínicamente es posible mediante aspiración percutánea de las cavidades medulares metafisiarias de los huesos largos (femur proximal) e ilíaco. Otra ventaja de los injertos de médula ósea, es el poderlos aplicar percutáneamente, en casos seleccionados, concepto que fue introducido por Herzog y comprobado en estudios experimentales, en defectos óseos por varios autores, entre ellos por Paley.

Son necesarias investigaciones clínicas para comprobar su mayor conveniencia sobre los otros tipos de injertos en casos en los que no se requiera que éstos sean parte fundamental de la estabilización ósea. -

SUMMARY

The use of bone grafts seek for a more sound bone healing in some special clinic conditions like post-traumatic bone defects, delayed unions, arthrodesis and bone tumors.

There is evidence that the osteogenic properties of the bone marrow as a healing mechanism, and the present techniques of autogenous bone grafting

from iliac wing and bone banks offer all a limited capability.

This paper presents the results of an experimental study carried out on bone defects in rabbits, treated with grafts from bone marrow and conventional cancellous and cortical grafts. During the period of graft integration a close roentgenographic follow up was kept; and at the end of the healing, samples for microscopic and biomechanic investigation were taken.

The end results showed and advanced bone healing in both defects. Those treated with bone

marrow and those treated with conventional cancellous and cortical grafts. These findings corroborate the osteogenic activity of the bone marrow. Thereby, its clinical use has to be kept in mind in selected cases.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo expresan sus agradecimientos a la Doctora Carmen Barraquer, al personal de la Sala de Cirugía Experimental de la Clínica Barraquer y a la Doctora Clara Inés Ardila.

BIBLIOGRAFIA

1. BURWELL, R. et al.: Current perspectives and future directions; The 1983 invitational conference on osteochondral allografts. Clin Orthop N° 197 Jul, 141, 1985.
2. BURWELL, R.: The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. Clin. Orthop. N° 200 Nov, 125, 1985.
3. CAYCEDO, F., Alonso G.: Comportamiento del periostio en el medio articular y diseño de un expansor de periostio en conejos. Rev. Col., de Ortop. y Traumatol. Vol 1 N° 1, 9, 1987.
4. LANE, J. et al.: Current approaches to experimental bone grafting. Orthop Clin of N Am. Vol 18 N° 2, 213, 1987.
5. LINDHOLM, S. et al.: Extraskelatal and intraskelatal new bone formation induced by demineralized bone matrix combined with bone marrows cells. Clin Orthop N° 171, 251, 1982.
6. NADE, S.: Osteogenesis after bone and bone-marrow transplantation. Acta Orthop. scand. 48, 572, 1977.
7. NADE, S. et al.: Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. Ceramic materials with bone marrow cells. Clin Orthop, N° 181, 255, 1983.
8. OWEN, M.: Ultrastructure of bone and cartilage formed in vivo in diffusion Chambers. Clin Orthop, N° 187, 243, 1984.
9. OWEN, M. et al.: Mineralization in vitro cultures of rabbit marrow stromal cells. Clin Orthop. N° 213, 251, 1986.
10. PALEY, D. et al.: Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. Experimental study in rabbits. Clin Orthop. N° 208, 300, 1986.
11. SALAMA, R.: The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. J Bone and Joint Surg. Vol 60B N° 1, 111, 1978.
12. URIST, M.: The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. Clin Orthop, N° 171, 224, 1982.
13. WITTBGER, J. et al.: Osteogenetic activity in composite grafts of demineralized compact bone and marrow. Clin Orthop, N° 173, 229, 1983.