

# Formación ósea mediada por mineral de hidroxapatita: Estudio experimental en conejos\*

César Arango Pilonieta\*\*  
Nicolás Restrepo Giraldo\*\*\*  
Camilo Zuluaga Ruiz\*\*\*\*

## INTRODUCCION

Con el aumento de los traumatismos de alta energía que presentan pérdida ósea, así como el cambio radical y más agresivo en el tratamiento de distintas patologías ortopédicas (infecciones, tumores, malformaciones congénitas), la necesidad de encontrar un sustituto óseo adecuado, práctico y económico han motivado la investigación ortopédica.

Inicialmente, se manejaron las técnicas de autoinjertos, definiendo su utilización, ventajas y desventajas; sin embargo, en aquellos pacientes en que se requiere mayor cantidad de hueso para el tratamiento de grandes defectos, se ve con frecuencia cómo sus zonas dadoras no están en capacidad de cubrir las necesidades.

La frecuencia de estos casos ha hecho que se experimente con el uso de aloinjertos; poco a poco, se han creado técnicas de extracción, preparación y conservación de huesos tomados de donantes vivos o cadáveres; en la medida que esta técnica se ha depurado, los costos de producción y mantenimiento también aumentan.

Ya en nuestro país, se puede encontrar servicios con aloinjertos preparados y conservados con técnicas similares a la de los grandes bancos de hueso de Norteamérica; sin embargo, la disponibilidad de los mismos se limita a un pequeño sector de la población colombiana, que posee los recursos suficientes para su consecución.

En la actualidad, y a raíz de las enfermedades de transmisión sexual que generan un riesgo potencial para el uso de aloinjertos, se ha renovado el estudio de sustitutos óseos con diferentes sustancias como las cerámicas, fosfato cálcico e Hidroxi-apatita derivada del coral, como otros recursos disponibles en el armamentario quirúrgico, con el fin de lograr la neoformación ósea.

Sin embargo, a pesar de existir incluso bajo formas comerciales en los países más desarrollados, no se han realizado estudios experimentales en Colombia, que permitan mostrar la viabilidad de su utilización en el medio.

El punto de partida de la investigación básica sobre el uso de estos minerales, debe comenzar con la experimentación para transformar el mineral coralino, con los recursos que se cuenta, en un sustituto óseo capaz de integrarse y reemplazar al hueso cuando existan grandes defectos.

Es por esto, que la presente investigación parte de la toma de segmentos de mineral coralino, que mediante una reacción hidrotérmica con fosfato

\* Premio al Mejor Trabajo de Ingreso XXXVIII Congreso Nacional SCCOT, Hospital Militar Central Departamento de Ortopedia y Traumatología, Santafé de Bogotá, octubre de 1993.

\*\* Residente IV.

\*\*\* Residente IV.

\*\*\*\* Especialista.

puedan transformarse en un mineral de Hidroxiapatita similar al del hueso, para posteriormente ser colocados en forma de segmentos de tamaño constante (6 mm cúbicos), en el tejido esponjoso de huesos largos, para el caso la metafisis proximal de conejos machos de la cepa Nueva Zelanda, cuyas variables en cuanto a peso, edad, características generales y medio ambiente donde van a ser controlados, se mantengan en valores constantes, con el fin de permitir valorar su capacidad de integración, biodegradabilidad y poder de formación ósea, mediante un análisis macroscópico, histo-patológico y radiológico durante tiempos establecidos de dos, seis semanas y cuatro meses.

Estos hallazgos sirven como punto de partida para subsecuentes estudios, cuyo propósito final sea la implementación de esta técnica en el medio, como método alternativo adecuado para el tratamiento de pacientes que por uno u otro motivo requieran de injertos o sustitutos óseos.

### **Tema**

Formación Ósea Mediada por Mineral de Hidroxiapatita: Estudio experimental en conejos:

### **Problema**

Al intentar buscar un sustituto óseo diferente a los aloinjertos, se ha investigado con materiales biológicos inertes, como los equinodermos y el coral. Este último, por sus condiciones de trabeculación similares a las del hueso humano, ha sido fuente de innumerables tratamientos con el fin de lograr unas características biomecánicas similares a las del tejido óseo. Sin embargo, las técnicas de recambio hidrotérmico con altas presiones y altas temperaturas, no permite que sea un método económico ni fácilmente alcanzable en nuestro medio.

Es por esto, que pretendiendo realizar una transformación sencilla y económica, fácilmente realizable con nuestros recursos en cada hospital, se estudiará la capacidad de este mineral coralino para integrarse al hueso dentro de un proceso de formación ósea.

### **Objetivos**

Evaluar la capacidad del mineral coralino, como posible sustituto del mineral óseo, en defectos metafisarios de hueso esponjoso.

Verificar la capacidad del mineral coralino de Hidroxiapatita para integrarse al hueso esponjoso del animal en estudio, mediante el análisis radiológico,

macroscópico e histo-patológico de las zonas intervenidas quirúrgicamente en valores de tiempo constante de dos, seis semanas y cuatro meses.

Evaluar si existe sustitución de este mineral de Hidroxiapatita por un proceso de formación ósea.

Diferenciar los procesos de integración dependiendo de las características trabeculares del hueso (hueso esponjoso vs. hueso cortical).

Evaluar la presencia microscópica de células osteoprogenitoras en los injertos colocados de Hidroxiapatita, así como su diferenciación en el tiempo.

Evaluar radiológicamente la capacidad de integración de los injertos y su comportamiento en el tiempo.

### **Propósitos**

Se pretende mediante este estudio experimental, analizar la viabilidad del mineral coralino como sustituto óseo en los seres vivos; si se puede reproducir una técnica sencilla de preparación y conservación de este mineral, adecuada a nuestros recursos y fácil de implementar, se podrá adquirir un recurso terapéutico diferente a los anteriormente dados por los bancos de hueso o los auto-injertos.

Por otra parte, la comprobación histológica y macroscópica del proceso de formación ósea a partir de un modelo trabecular coralino, basados en la aparición de células y tejido óseo neoformado, así como la evaluación de los cambios radiológicos en el tiempo, que permite valorar la integración y diferenciación trabecular de este sustituto óseo, pueden brindar pautas objetivas sobre la real utilidad y los beneficios de su uso en el ser humano.

La aplicación de sustitutos óseos podría representar un beneficio para aquellos pacientes en quienes no se disponga de auto-injertos, evitando los riesgos de los aloinjertos. Así mismo, la implementación en nuestra institución brindará otro campo abierto en la investigación y en nuestro arsenal terapéutico.

### **Variables**

#### **Variable Dependiente**

Medirá el resultado final en cuanto a integración del injerto de Hidroxiapatita, biodegradabilidad y poder de formación ósea, mediante la presencia o ausencia macroscópica de interfase hueso-injerto al cabo de cuatro meses de implantación.

Disminución en milímetros del tamaño del injerto de hidroxapatita colocado en las metáfisis de tibia proximal de conejos, dado por la invasión del mismo por tejido óseo neoformado.

Aparición histológica de células osteoprogenitoras y tejido óseo, dentro del injerto de Hidroxapatita.

Cambios microscópicos en la trabeculación de la hidroxapatita coralina y su semejanza con la trabeculación ósea normal.

Integración radiológica del injerto de Hidroxapatita coralina, medido en la disminución de su tamaño, continuación de la trama trabecular del hueso adyacente en el mismo injerto y cambios en su radiodensidad.

### **Variable independiente**

En el injerto de coral, modificado por reacción hidrotérmica para su conversión en hidroxapatita similar a la ósea, para ser colocado en los sujetos de la investigación.

### **Variable de control**

Se tratará de mantener constantes los factores de sesgo y error dados por las características propias del mineral coralino, la población de estudio y la locación donde se ha de llevar la investigación:

**Coral:** Se utilizará un tipo de Coral, perteneciente a los "Corales Esponjosos" o Goniopora, con trabeculación similar en sus espacios al hueso esponjoso humano, preparado y cortado en bloques iguales de 6 mm cúbicos, para colocar en la metáfisis proximal de la tibia derecha de los conejos del grupo de estudio; por factores éticos, el coral fue dado por el Inderena, tomado de aguas donde sólo hay coral muerto, es decir sin p162lipos animales, con el fin de preservar el equilibrio ecológico.

**Conejos:** Para mantener valores constantes, se controlarán las variables correspondientes a:

**Cepa:** Se tomarán conejos de la cepa Nueva Zelanda, adquiridos en un criadero de Fusagasugá, donde se garantiza su mismo origen, sin cruces.

**Sexo:** Conejos machos.

**Edad:** De dos meses de nacidos.

**Peso:** Entre 2.500 y 3.000 gramos.

**Extremidad:** Se tomarán las metáfisis proximales de la tibia derecha en cada uno de los sujetos.

**Actividad:** Durante el tiempo de la investigación, serán mantenidos en jaulas que cumplen con el tamaño especificado para tener de a tres conejos por jaula.

**Alimentación:** Tendrán acceso al mismo tipo de alimentación y agua fresca que ingerirán "Ad Libitum".

**Medio Ambiente:** Se mantendrán en situaciones similares de temperatura (15 a 20 grados centígrados). El primer día post-operatorio se mantendrán en un cuarto cerrado para favorecer su recuperación.

**Procedimiento Quirúrgico:** En éste se incluyen variables experimentales dadas por la diferencia inherente a cada procedimiento quirúrgico en sí, y las no experimentales como:

**Antibioticoterapia:** Recibirán dos dosis de cefalosporina de primera generación, la primera una hora antes del procedimiento y la segunda seis horas después del mismo.

**Técnica Anestésica:** Se utilizará el mismo agente inductor y anestésico, a sus dosis establecidas (8 mg/kg de ketamina y goteo intraperitoneal del Pentotal).

**Técnica Quirúrgica:** Se realizará el mismo procedimiento en cada conejo, mediante el mismo abordaje quirúrgico, extracción del defecto con el mismo instrumental y cierre con igual tipo de sutura absorbible (catgut 2-0).

**Medición de Resultados:** Para tratar de objetivar estas variables, se utilizarán valores del mismo métrico decimal, así:

**Valoración macroscópica:** Dada por la disminución del tamaño en milímetros del injerto de hidroxapatita, en la medida que transcurra el tiempo y en los diferentes intervalos de corte de la observación (2, 6 semanas y 4 meses).

**Valoración microscópica:** Con criterios objetivos en valores de número de células osteoprogenitoras y osteoblastos por campo microscópico estudiado, tomando en cada observación el promedio de diez campos al azar y criterios subjetivos del examinador, que determine la aparición de elementos formes del

tejido óseo en el segmento del injerto examinado (fibras de colágeno, vasos, etc.).

Valoración radiológica: Medida mediante proyecciones A.P. y lateral, el tamaño en milímetros del injerto en los diferentes cortes de tiempo (2, 6 semanas y 4 meses), y subjetivamente la aparición de continuidad en la trama radiológica del hueso esponjoso adyacente y el injerto.

### **Hipótesis**

La técnica de transformación del mineral coralino en hidroxiapatita (de características similares al mineral óseo) y la comprobación radiológica, macroscópica e histopatológica de su integración, biodegradabilidad y poder de formación ósea, la utilización de este biomaterial inerte, permite que como sustituto óseo se integre al hueso esponjoso de los conejos en estudio.

### **Metodología**

#### **Tipo de investigación**

Se realizó un estudio de tipo experimental.

#### **Sujetos y muestra**

Se utilizó la metáfisis proximal de la tibia derecha de 15 conejos machos de la cepa Nueva Zelanda, de dos meses de edad y aproximadamente 2.500 a 3.000 kg de peso.

El tamaño de la muestra fue consultado en el Departamento de Investigaciones de la Universidad Militar Nueva Granada, considerado como el mínimo estadísticamente significativo, debido a las restricciones que sobre experimentación en animales ha sentado la Declaración de Helsinki, en conjunto con la Sociedad Protectora de Animales.

Estos animales se mantuvieron en condiciones similares de alimentación y bebida "Ad Libitum", bajo condiciones ambientales estables de temperatura y ruido.

Las características del manejo prequirúrgico, intra y post-operatorio se mantuvieron constantes para evitar errores y sesgos; en cada sujeto se realizó la extracción de un segmento óseo de 6 milímetros cúbicos en la metáfisis proximal de la tibia derecha, que será reemplazado por un fragmento de Hidroxiapatita coralina de iguales dimensiones; se utilizó la metáfisis proximal de tibia izquierda como grupo control.

Tanto en el post-operatorio inmediato como a las dos, seis semanas y cuatro meses, se hicieron estu-

dios radiológicos midiendo el tamaño del injerto, así como su incorporación al hueso esponjoso del conejo, con ayuda de una técnica estandarizada y mediciones secuenciales del mismo.

El estudio se complementó mediante resección de la tibia proximal donde previamente se había colocado el injerto de Hidroxi-apatita coralina, para ser sometido a mediciones y estudios anátomo-patológicos con los mismos intervalos de tiempo.

### **Técnicas y Procedimientos**

Técnica Quirúrgica. Previa limpieza de la región glútea con alcohol, se procede a inyectar una dosis Intramuscular de Ketamina a razón de 8 mg/kg.

Se rasura zona quirúrgica y se realiza asepsia y antisepsia del campo operatorio.

Se canaliza vena de oreja derecha para continuar infusión de Ketamina I.V.

Incisión longitudinal de 2.5 a 3 cm en cara antero-interna de metáfisis proximal de tibia.

Divulsión muscular y sección longitudinal del periostio. Exposición de metáfisis proximal de tibia.

Toma de segmento óseo de 0.6 centímetros cúbicos con ayuda de pieza de mano (Motor tool Dremel haciendo perforaciones con broca de 1.5 mm y regularizando los bordes del defecto).

Comprobación del tamaño de la ventaja y regularización de la misma.

Colocación de injerto de hidroxi-apatita de igual tamaño, rellenando el defecto.

Lavado, hemostasia y cierre de piel con puntos separados en sutura absorbible (Catgut Crómico 2-0).

Transoperatorio. Se administró una dosis prequirúrgica y una dosis seis (6) horas post-operatorio de cefalosporina de primera generación a razón de 100 mg/kjg.

Así mismo, se manejó el dolor P.O.P. colocando una dosis I.M. de Ketorolaco Trometamina (Acidol) a razón de 2 mg/kg.

Controles Radiológicos. Se tomaron en el post-operatorio inmediato, a las dos y seis semanas y al cumplir cuatro meses pop, proyecciones A.-P. y lateral de la tibia, valorando:

Integración radiológica del injerto, dada por el tamaño radiológico en milímetros del mismo y su variación en el tiempo. Aparición de trabéculas óseas que vengan del hueso adyacente normal y pasen al injerto de Hidroxi-apatita.

**Estudio Macroscópico Anatómico.** Se estudiaron las secciones anatómicas macroscópicamente, valorando su integración mediante la desaparición de la interfase existente entre el hueso esponjoso y el injerto de Hidroxi-apatita, así como mediante la medición en milímetros del tamaño del injerto en el momento de realizar los cortes observacionales a las dos, seis semanas y cuatro meses.

**Estudio Microscópico.** Se estudiaron las muestras tomadas en las diferentes etapas de tiempo, mediante cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina, tinciones de Giemsa, Azul de Toluidina y preparación por desgaste, comprobando la existencia de células osteoprogenitoras y de osteoblastos/osteocitos, valorados en número de células por campo examinado, así como determinando la aparición o no de elementos formes del tejido óseo, como son las fibras de colágeno y otros elementos celulares.

Los parámetros de medición adoptados son válidos y confiables, ya que pueden ser fácilmente comprobados por cualquier sujeto y están libres de errores sistemáticos; la sensibilidad es buena, ya que permite establecer las diferencias existentes en relación con los sujetos y durante las diferentes etapas de tiempo dadas por los cortes observacionales a las dos, seis semanas y cuatro meses; así mismo, este estudio es fácilmente reproducible y comparable.

## GENERALIDADES Y ESTUDIOS SOBRE EL CORAL

### Biología del Coral

Este animal invertebrado Celenterado, del "Filo" Cnidario, al que pertenecen por igual distintas clases de pólipos y medusas, se agrupa entre la Clase *Anzozario*, donde se encuentran las anémonas de mar y los Alcionarios o corales valiosos (1, 2, 3).

La formación esquelética que producen mediante la excreción de Carbonato de Calcio, da lugar a formas variadas que semejan hongos, cuernos de animales e incluso el cerebro humano. Su desarrollo se limita a regiones de aguas cálidas, de más de 20 Grados Centígrados, cercanos a la franja ecuatorial (no más de 20 grados de latitud Norte o Sur); su proporción de crecimiento varía entre 2 a 10 cm por año, lo que da lugar a que sólo se encuentren colonias de animales vivos sobre la superficie de una

gran masa calcárea que puede llegar a tener varios metros de altura (1, 4, 5, 6, 7).

Así mismo, las formaciones coralinas no se encuentran a grandes profundidades, generalmente en los primeros 20 metros, aunque ocasionalmente y según la especie, podemos encontrarlos incluso hasta los 20 m. Dichas formaciones se pueden dividir en tres categorías:

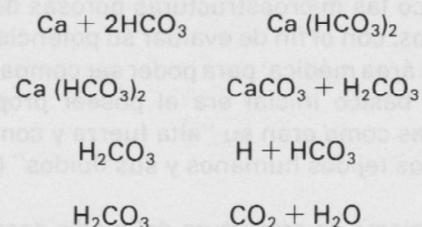
- Arrecifes Costeros
- Grandes Barreras
- Atolones.

De estas, los más conocidos con los arrecifes costeros, de donde se extraen las muestras necesarias para nuestro estudio (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15).

### Formación del exoesqueleto mineral

Dada la admirable simbiosis existente entre pólipos y algas microscópicas captadoras de luz, se puede entender la conformación de un exoesqueleto de carbonato cálcico de diseño trabecular semejante al hueso esponjoso; por medio de la captación de luz solar, el CO<sub>2</sub> producto del metabolismo de la colonia de pólipos, se incorpora, fija y posteriormente se convierte en radicales de carbonato, combinándose luego con radicales de Calcio, captados del medio marino (7, 8).

Estos iones son acumulados en vesículas que posteriormente se fusionan y cristalizan, para depositarse sobre una matriz orgánica protéica, que sirve como molde o templete, dando origen a un exoesqueleto de conformación similar al hueso humano, denominado ARAGONITA, cuya función es proteger a la colonia. La conformación química como tal, queda entonces compuesta por una estructura poliédrica en donde cada ión de Calcio está rodeado por seis iones carbonados, coordinados con nueve átomos de oxígeno; en muchas de las especies, se pueden incorporar en menor proporción otros minerales como el Estroncio, cuya función es mejorar la cohesión de la molécula (1, 2, 6, 7, 9).



Para la Biosíntesis del exoesqueleto mineral, es importante recordar el papel que cumple la tempera-

tura como regulador del proceso de calcificación; existe una correlación entre la tasa de calcificación y las altas temperaturas, encontrando los mayores niveles de calcificación entre los 25 y 31 Grados Centígrados y bloqueándose a temperaturas mayores de 33 y menores de 17 grados (3, 5, 6, 7).

La conformación básica de este exoesqueleto es el CALICE, estructura así denominada por su forma de copa, generalmente de forma circular, con una serie de proyecciones laminares radiadas, dirigidas hacia el centro, llamadas SEPTAS (1, 8).

### **Crecimiento del Coral**

El crecimiento de las colonias coralinas se realiza mediante la formación de "Disepimentos" o tabiques de apoyo; por medio de una pequeña contracción en su borde medial y mediante la secreción de una pequeña porción de Aragonita, se crea un reborde en forma de anillo; es entonces, cuando el pólipo desprende su base del cálice e inicia su movimiento trepando sobre el borde del anillo a la vez que va secretando más aragonita para aumentar la altura de las paredes laterales y cerrar el anillo formando el "Disepimento" sobre el cual reposará durante un tiempo hasta que nuevamente se repita el ciclo (2, 9, 13).

El espacio que ocupa el pólipo, hace que exista un espacio vacío entre cada disepimento, lo cual da las características de porosidad y regularidad de las trabeculaciones a cada especie en particular. La mayoría de los estudios muestran cómo los corales del género GONIOPIORA tienen trabeculación similar al hueso esponjoso humano (Aproximadamente 500 micras), mientras que el género PORITES cuenta con espacios menores (alrededor de 200-250 micras) lo cual lo hace más semejante a la trabeculación del hueso cortical humano, prefiriéndose estos corales para su uso experimental como material sustituto óseo (16, 17, 18, 19).

### **Biomateriales como sustitutos óseos**

Desde inicios de los años 70, se empezó a estudiar con ahínco las microestructuras porosas de ciertos seres vivos, con el fin de evaluar su potencial aplicación en el área médica; para poder ser compatibles, el requisito básico inicial era el poseer propiedades específicas como eran su "alta fuerza y compatibilidad con los tejidos humanos y sus fluidos" (20).

Así mismo, la estructura del medio poroso debe cumplir requisitos básicos, como es el que estos poros deben estar interconectados, tener el tamaño

adecuado, una forma y uniformidad que permitan el crecimiento y unión al tejido corporal. Cumplir al mismo tiempo este sinnúmero de requisitos, implicaba un material en que existiera una combinación óptima entre alta fuerza vs. peso, manteniendo su bioinercia.

Inicialmente, se experimentó con cerámicas, materiales bioinertes, con gran fuerza compresiva, que no sufren corrosión y con un peso similar al del hueso humano (20, 21, 22); sin embargo, la dificultad para crear un poro ideal similar al del hueso humano de manera artificial hizo que se estudiara la microestructura de los elementos de carbonato cálcico en los Equinodermos; sin embargo, este carbonato tiene condiciones de dureza mucho menores a las de la Hidroxi-apatita Osea (escala de dureza de Mohs H= 3 vs. H = 5) además de presentar otros efectos indeseables, como son su alta solubilidad y descomposición en presencia de ácidos. Para obviar estos inconvenientes se utilizaron reacciones de intercambio exotérmico a altas temperaturas y presiones, con el fin de transformar este mineral blando y poco resistente, en Hidroxi-apatita similar a la de los huesos y dientes, permaneciendo química y mineralógicamente idénticas, además de manteniendo sus propiedades bioinertes y trabeculares (23, 24, 25, 26).

Realizando análisis espectrográficos semi-cuantitativos, así como micropruebas de análisis de electrones de Calcio, se pudo comprobar que los valores para estas Hidroxi-apatitas así formadas, eran estequiométricamente similares (22, 25). El espectro de absorción de rayos infrarrojos también confirma esta transformación, quedando unos pequeños picos dados por la presencia de carbonato residual, que no interfieren en las propiedades biomecánicas de los sustitutos (25, 26, 27).

El progreso en el estudio y posterior aplicación clínica de estos implantes, ha hecho que se llegue a un punto de la investigación que se pueda experimentar sin riesgo en el ser humano (22, 26, 27, 28, 29, 30).

### **Estudios en animales con implantes coralinos**

Los primeros estudios experimentales con Hidroxiapatita derivada del coral fueron realizados hacia 1975 por Chiroff (30), quien implantó cilindros coralinos de 1 x 5 mm en metafisis distales de fémur y proximales de tibia en perros, observando que los defectos eran rellenados paulatinamente con hueso nuevo; en ese momento comparando la mejor incorporación de este material con otras cerámicas implan-

tadas, el autor lo atribuyó a la regularidad de las fenestraciones del coral, que permitían una mejor suplencia vascular y nutricional para regenerar la masa ósea (30).

Posteriormente, Flatley, Bucholz y Holmes continuaron investigando, comparando distintos tipos de implantes en ratas, conejos y perros, comparándolos con auto-injertos, haciendo estudios histológicos y mediante microrradiografías (19, 31, 32).

### **Degradación del injerto de Coral**

Durante la bio-reabsorción del implante de hidroxiapatita coralina, se liberan iones de Calcio y Fosfato por un proceso de disolución mediado por células (Fagocitosis osteoclástica).

La tasa de biodegradación depende de la composición química del cristal, su densidad, el área de superficie expuesta y su proximidad al tejido blando adyacente. La tasa de reabsorción del injerto de coral, debería corresponderse con la necesidad biomecánica de la zona injertada; es por esto que la vida media de un implante debería ser mayor en aquellas zonas donde se requiera fuerza mecánica y menor donde sólo se utilice como "espaciador" (33, 34, 35).

Eventualmente la totalidad del implante debería ser biodegradable, permitiendo una adecuada y gradual remodelación de nuevo hueso; sin embargo, ninguno de los implantes estudiados tienen propiedades químicas y estructurales definidas y estandarizadas que permitan predecir de manera precisa la tasa de biodegradación. Aunque ya están comercializados ciertos tipos de implantes de Hidroxiapatita, estos problemas no han sido resueltos (16, 18, 33, 36, 37).

### **Configuración del Coral**

A pesar de la multitud de estudios, todavía existe controversia sobre el tamaño ideal de los poros en los implantes substitutos óseos.

Desde 1970, Klawitter y Hulbert, estudiando cerámicas porosas demostraron que era necesario un tamaño mínimo de 100 micras de diámetro de los poros para que existiese crecimiento óseo; desde entonces se ha recomendado que estas sustancias substitutas tengan un tamaño de poro de más de 150 micras. De igual manera, se han estudiado las distintas configuraciones de estos materiales, con el fin de hallar la ideal, comparando estructuras uniformes vs. al azar y cerradas vs. fenestradas; sin embargo, la mejor opción se desconoce.

En teoría, la Hidroxiapatita derivada del coral tiene ventajas por el tamaño de sus poros, su configuración uniforme y la interconexión de sus fenestraciones; sin embargo, no se han hecho muchos estudios en humanos que soporten estas ventajas teóricas (16, 19).

En cuanto a la diferencia del diámetro de los poros, sus propiedades mecánicas y su tasa de degradación, se pueden identificar dos grupos selectivos de implantes de acuerdo a la semejanza morfológica con el hueso que ha de ser reemplazado.

**GONIOPORA:** con espacios más amplios, similares al hueso esponjoso, en promedio de 500-600 micras, paredes de 130 micras de diámetro, e interconexiones de 220. Comercialmente se puede conseguir en E.E.U.U. con el nombre de Interpore 500.

**PORITES:** con espacios más estrechos, similares al hueso cortical, en promedio de 200-250 micras (16, 17, 19, 21, 38).

### **Osteoinducción**

La Osteoinducción se produce cuando dos o más tejidos de diferente naturaleza y/o propiedades que se han asociado íntimamente, alteran el curso de los resultados interactivos. Según Urist, es el "Reclutamiento de las células de tipo mesenquimal hacia cartílago y/o hueso, bajo la influencia de una proteína morfogénica ósea difusible" (30).

Desde este punto de vista, no existe aún evidencia de que estos implantes sean osteoinductores; en ningún estudio experimental se ha podido mostrar el crecimiento de hueso al colocar implantes en tejido celular subcutáneo o músculo; además, existen limitaciones en el crecimiento de nuevo hueso, de acuerdo al tamaño y profundidad del implante; de ahí que se esté experimentando con dichos materiales, agregándoles factores osteoinductores, tales como colágeno, proteína morfogénica ósea, aspirado de médula y/o estimulación eléctrica (16, 17, 31, 32, 39, 40).

### **Osteoconducción**

Se entiende por Osteoconducción, la similitud morfológica que comparten materiales biológicos e inertes, poseyendo una microestructura tridimensional sobre la cual pueden crecer capilares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras; la Hidroxiapatita derivada del coral, al igual que el fosfato tricálcico, tubos de vidrio, cerámica o plástico y los aloinjertos estériles y desproteinizados, nos sirven como matriz sobre la cual puede crecer hueso nuevo (17, 18, 32, 35).

Valorando las capacidades de estos materiales bio-inertes, nos podemos dar cuenta que existen menos problemas de antigenicidad que con los aloinjertos frescos, que pueden favorecer la producción de anticuerpos e inmunidad mediada celular, con la posterior reacción inflamatoria y destrucción por parte del receptor (17, 31, 32, 35).

#### **RESPUESTA BIOINERTE DE LA HIDROXI-APATITA**

Con el auge de los aloinjertos ha hecho que se empiecen a presentar casos indeseables de transmisión de enfermedades tales como la Sífilis, Hepatitis y Sida. Aún a pesar de estas posibles complicaciones, los aloinjertos presentan propiedades únicas, como su estructura natural, forma, fuerza y la capacidad de osteoinducción (41, 42, 43). Esto hace que ciertamente sean un recurso invaluable que seguirá siendo utilizado en la cirugía Ortopédica; sin embargo, han proliferado publicaciones recientes sobre la inmunogenicidad de los aloinjertos.

Se ha investigado y complementado los mecanismos celulares y moleculares de rechazo a un aloinjerto; este tipo de trasplante, hace que su rechazo sea más difícil de identificar y cuantificar comparativamente con otros órganos del cuerpo humano como el corazón o los riñones, en donde existen marcadores cuantificables de su función, tales como la creatinina sérica o las biopsias, difíciles de interpretar en los injertos óseos, donde el infiltrado celular generalmente no es uniforme.

De manera general, se asume que el rechazo desde el punto de vista óseo se manifiesta como resorción ósea o la falla si el injerto es tendinoso (Tendón Patelar-Hueso, por ejemplo).

La secuencia de eventos histológicos en la incorporación de los injertos óseos se ha estudiado y descrito minuciosamente (40, 42, 43, 44).

La fase inicial de un segmento no vascularizado, inicia con la formación de un hematoma, rico en derivados plaquetarios, factor de crecimiento y otras citoquinas. Se inicia una respuesta inflamatoria con proliferación linfo-histiocitaria, con un pico máximo hacia la segunda y tercera semanas, pero que persiste incluso hasta los 8 meses.

Pasados unos días, el injerto empieza a cubrirse por estroma fibro-vascular, que lleva vasos sanguíneos y células precursoras osteogénicas al mismo. La invasión por estos vasos, se realiza aprovechando en los aloinjertos los canales haversianos preexis-

tentes; estos canales se amplían por la actividad osteoclástica que acompaña a la respuesta neovascular.

La actividad osteoclástica se continúa en la superficie endóstica del injerto, en su superficie perióstica y en la interfase con el hueso del huésped (42, 45, 46, 47).

Una vez que el injerto es revascularizado, se inicia la fase de remodelación, caracterizada por una fase de activación, seguida por resorción y formación de hueso nuevo (41, 45, 47, 48). Esta respuesta depende en definitiva de la solicitud mecánica del injerto, su revascularización y su unión con el hueso del huésped; si persiste la interfase y no hay buena circulación en el injerto, éste fallará, existirá resorción, dolor o fractura (42, 43, 46, 47, 48, 49, 50).

Aunque el mecanismo de integración de los biomateriales inertes ha sido poco estudiado, su secuencia le es completamente similar; en la fase inicial existe el hematoma producto del trauma quirúrgico, y las células osteoprogenitoras (Fibroblastos, linfocitos e histiocitos) van ocupando la celdas de la Hidroxi-apatita (21, 24, 36, 40, 47). El estroma fibrovascular aumenta este aporte y se realiza la neoformación vascular.

Sin embargo, a diferencia de los estudios con aloinjertos, se ve cómo va desapareciendo la respuesta linfocítica, mientras que en estos últimos, su presencia continua, aunada a la presencia de macrófagos, determina una respuesta inmune de tipo desconocido.

Ultimos estudios demuestran como los aloinjertos llevan antígenos que estimulan una respuesta dependiente de linfocitos T y macrófagos, que a su vez secretan citoquinas (Interleuquina 1, Factor Alpha de Necrosis Tumoral y Linfotoxinas), que producen activación de los osteoblastos e inducen resorción osteoclástica antes de que incluso se forme hueso nuevo (41, 46, 48, 49, 50).

Otra ventaja que tienen los biomateriales inertes, como la Hidroxi-apatita derivada del coral, es la ausencia de genes polimórficos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (H.M.C.), que se expresa en las células que viajan con el aloinjerto, y que producen antígenos Clase I y II, que aunque son difíciles de determinar en el aloinjerto, producen mecanismos de rechazo que se pueden evaluar de manera indirecta. Así, los mecanismos del rechazo pueden ser múltiples, bien sea por: Cito-toxicidad mediada celu-

lar, Cito-toxicidad mediada por Anticuerpos y Citoquinas (40, 41, 42, 44, 47, 49, 50).

Todos estos estudios, han hecho que se empiece a tomar en serio la búsqueda de una terapéutica alternativa en aquellos pacientes que requieran el uso de aloinjertos. Los materiales bioinertes empiezan a tener cabida importante en la investigación ortopédica y posiblemente sean en el futuro, utilizados con seguridad y confianza en la gran mayoría de pacientes (40, 42, 46, 49).

#### **ESTUDIOS BIOMECANICOS DE LA HIDROXIAPATITA CORALINA**

##### **Propiedades mecánicas del Coral de Hidroxiapatita**

Para que un implante tenga éxito, debe poseer características mecánicas similares al materia que se va a reemplazar; este es un problema difícil cuando se pretenden utilizar sustitutos del hueso humano, verdadera obra arquitectónica, con propiedades mecánicas específicas.

##### **Propiedades mecánicas del hueso esponjoso**

El hueso esponjoso está compuesto por trabéculas dispuestas en forma de marcos, con espacios entre sí y orientadas siguiendo las líneas principales de stress (4, 5). A nivel microestructural, las trabéculas se componen de hueso lamelar, lo que le da sus características anisotrópicas, es decir, diferentes propiedades estructurales según las distintas orientaciones (4, 40, 50, 51, 52, 53).

A lo largo de los canales principales, el hueso esponjoso posee un comportamiento "Elástico", que falla súbitamente cuando se sobrepasa su resistencia tensil. Cuando se somete a una fuerza tensil cuya línea de acción es oblicua con respecto al eje de los canales del hueso, el comportamiento de la resistencia del hueso se puede asemejar a una curva parabólica, presentando deformidad plástica y una gran capacidad de absorción de energía (52, 53, 54, 55, 56).

Estas propiedades del hueso esponjoso son importantes porque le permite actuar de tal manera que pueda absorber impactos, distribuyendo mejor la carga en la vecindad de las superficies articulares.

Cualquier material que se pretenda utilizar como sustituto del hueso esponjoso, debe ser capaz de permitir una deformidad elástica, así como una óptima distribución de la carga; por otra parte, no debe permitir concentraciones de stress, particular-

mente si éste se centra bajo las superficies articulares, donde el cartílago articular puede llegar a lesionarse (52, 57, 58).

##### **Propiedades mecánicas del coral de hidroxiapatita (goniopora)**

Este material, tiene una estructura similar en dimensiones al hueso esponjoso; diferentes pruebas mecánicas han demostrado una resistencia a la compresión de aproximadamente 412 N/cm<sup>2</sup>, si la carga compresiva se aplica de forma paralela al eje de los canales, y de 84 N/cm<sup>2</sup>, si la carga es aplicada de manera perpendicular (16, 31, 58).

Pruebas adicionales han mostrado que la resistencia compresiva del coral disminuye rápidamente a medida que el ángulo entre el eje longitudinal de los canales y la fuerza aplicada aumenta (31, 52, 57, 58).

El coral posee un comportamiento anisotrópico similar al del hueso esponjoso; sin embargo, no es tan resistente como este mismo, que puede llegar a soportar cargas de hasta 754 N/cm<sup>2</sup>. Así mismo, tampoco posee un comportamiento plástico en ninguna orientación, lo cual es de esperar ya que a diferencia del hueso, que es un compuesto natural mixto, con una matriz de colágeno orgánico que se entremezcla con cristales minerales de hidroxiapatita, el coral es un compuesto de carbonato cálcico que pierde todo su componente orgánico durante el proceso de fosforilación hidrotérmica para su conversión en hidroxiapatita.

La rigidez "Elástica" del Coral es casi igual a la del hueso, cuando la carga se aplica en forma paralela al eje de los canales; sin embargo, la capacidad de absorción de energía es mucho menor que la del hueso esponjoso, déficit que se explica por la falta de colágeno, con sus propiedades mecánicas específicas (53, 56, 58).

##### **Estudios de coral vs. injertos**

Se encuentran estudios realizados en perros, en los que se produjeron defectos de 1.0 x 1.0 x 1.0 cm en las metafisis proximales de ambas tibias, siendo reemplazados por autoinjertos de cresta en un lado, mientras se colocaban implantes de coral derivado de hidroxiapatita (Goniopora) en el lado contralateral (16).

Dichos implantes y autoinjertos se evaluaron a los seis meses, encontrando que ambos eran más fuertes y rígidos que el hueso esponjoso normal; la causa básica, era la formación de hueso nuevo en las

trabéculas de los injertos e implantes, dando origen a una estructura densa, que posteriormente disminuye con el tiempo en su resistencia y rigidez, producto de los fenómenos de remodelación y degradación del implante.

En la medida que ocurre invasión ósea de los implantes de hidroxiapatita coralina, este ha mostrado ser más fuerte que los auto-injertos de esponjosa, pero no tan rígido. La razón de esto aún no es clara; sin embargo, se ha visto que muchos materiales rígidos no son tan resistentes como otros materiales flexibles, ya que cualquier carga en los primeros puede producir un stress localizado que conlleve a la fatiga y posterior falla de un material (16, 17, 19, 32).

El Coral posee 1.68 veces la capacidad de absorción de energía que posee el injerto de esponjosa y esto es debido a su mayor rigidez, lo cual indica que a pesar de ser más fuerte, es también más flexible, permitiéndole mayor absorción de energía, con lo que podría asegurar mayor protección al cartílago articular subyacente (16, 32, 59, 60).

#### **Hueso cortical y sustituto coralino (Porites)**

El hueso cortical se compone de un conglomerado denso de sistemas haversianos; aunque se han realizado infinidad de estudios sobre su comportamiento mecánico, los resultados varían de acuerdo con el tipo de carga (compresiva vs. tensil), su rango de aplicación, factores que aumentan el stress local como la variabilidad en la deshidratación de cada espécimen y multitud de variables más (50, 54).

Se puede decir que, en términos generales, el hueso cortical se comporta como un material con elasticidad lineal, aunque existen estudios que comprueban su capacidad de sufrir deformidad plástica con pruebas de tensión.

#### **Propiedades mecánicas del Porites**

La Hidroxiapatita derivada del coral Porites, al ser sometida a fuerzas compresivas perpendiculares al eje de sus canales, es aproximadamente 4.4 veces más fuerte que la hidroxiapatita derivada del coral Goniopora, sometida a la misma carga. Así mismo, el Porites absorbe 4.7 veces más energía que el segundo; sin embargo, comparado con el hueso cortical humano (Fémur) sólo posee el 2.2% de sus resistencia total (38).

#### **Implantes de Porites vs. injertos de cresta**

En estudios realizados en perros, en quienes realizaron defectos segmentarios de 2 cm en ambos radios,

que posteriormente fueron reemplazados por autoinjertos de cresta iliaca e implantes de hidroxiapatita derivada del coral Porites en el lado contralateral, fijos con placas DCP y evaluados a los 6 meses, se comprobó mediante pruebas torsionales que la rigidez, resistencia y cantidad de energía a la que falló el material fueron mayores en los lados en que se había colocado injerto de creta iliaca (16).

Así mismo, dichos injertos fueron más fuertes y tuvieron mayor capacidad de absorción de energía que el hueso cortical intacto, lo cual indica que el proceso de remodelación ósea no es completo a los seis meses en ninguno de los dos implantes (16, 32).

La inferioridad biomecánica de los implantes de Porites puede ser debida en gran parte a la incompleta invasión ósea del implante en el momento de las pruebas (17, 32, 38, 52).

#### **Aplicación clínica de los implantes de hidroxiapatita**

Los defectos producidos por trauma en los huesos largos, representan una potencial indicación ideal para el uso de sustitutos óseos; en estos casos, la necesidad de una estabilización rígida del hueso circundante y la importancia de conseguir una estrecha aposición del implante al huésped, han hecho que se estudien dos modelos clínicos principales:

- Defectos Metafisarios
- Defectos Diafisarios.

Los resultados preliminares de estos trabajos experimentales son alentadores; en los casos de fracturas metafisarias de huesos largos, secundarios a fuerzas compresivas, en los que con frecuencia quedan defectos subcondrales importantes, luego de la restitución de las depresiones articulares por fragmentos colapsados, hace que se requiera de injertos para rellenar el defecto (16, 17, 19, 31, 32).

En estos casos en las que persisten zonas de trabéculas colapsadas, después de utilizar los principios quirúrgicos básicos de reducción anatómica, elevación de la depresión articular asociada a fijación interna estable, podemos utilizar fragmentos de hidroxiapatita derivada del coral Goniopora como sustituto óseo (16, 17, 35, 39).

Se debe tener cuidado en el moldeamiento y tallado de estos implantes, con el fin de que su acople se haga a presión sobre el tejido óseo sano adyacente, verificando radiológicamente que el defecto se llene por completo, antes de realizar el cierre de la herida quirúrgica. El manejo postoperatorio debe

realizarse de manera idéntica al protocolo establecido para el uso de auto-injertos (16, 19, 39, 50).

En los casos de fracturas diafisarias conminutas, que comprometen un tercio o más de su circunferencia cortical, es casi imperativo el uso de injertos durante el proceso de fijación interna; en estos casos, se han utilizado con éxito los implantes de hidroxiapatita derivada del coral Porites, asociado a multitud de materiales de osteosíntesis; en estos casos, un buen cierre de tejidos blandos, mantiene los implantes en posición, evitando su desplazamiento (19).

En diversos estudios, tanto en animales como en humanos, se ha podido evidenciar la utilidad de los implantes, con adecuada consolidación, sin existir resorción ósea adyacente al coral y sin reacciones adversas tales como infección profunda y/o fracturas del mineral de hidroxiapatita (19, 30, 35, 39).

## ESTANDARIZACION DE TECNICAS

### Preparación de Hidroxiapatita Coralina

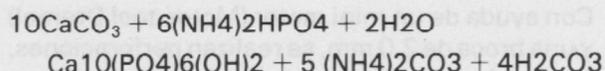
Gracias a los estudios encontrados en la literatura, se pretendió realizar una reacción química de recambio hidrotérmico que se ajustara a los recursos de nuestro medio.

Por intermedio del Inderena en Santa Marta, pudimos conseguir varias especies de coral, sobre las que se realizaron pruebas químicas tratando de lograr hidroxiapatita derivada de coral, que tuviera características óptimas para ser implantada en los conejos del estudio; la técnica, una vez estandarizada se puede condensar en los siguientes pasos:

1. Sección de fragmentos de coral de un (1) centímetro cúbico y seis (6) milímetros cúbicos, con ayuda de pieza de mano (Motor-tool Dremel).
2. Colocación de los fragmentos de coral en Hipoclorito de Sodio al 5% durante 24 horas.
3. Lavado del coral con Solución Salina estéril y secado de la misma en horno a 100 Grados Centígrados durante una hora.
4. Preparación de una solución mezclando a partes iguales Fosfato ácido de diamonio y agua destilada.
5. Colocación de los fragmentos de coral con la solución anteriormente preparada a partes iguales por peso, en un recipiente de laumnio que posea cierre hermético.

6. Colocación del recipiente en autoclave durante 24 horas.

El intercambio hidrotérmico bajo condiciones favorables, puede convertir el Carbonato de Calcio de la Aragonita coralina en Hidroxi-apatita de características físico-químicas muy similares a la del mineral óseo; la reacción química se puede representar así:



De esta forma y gracias a la colaboración del personal de esterilización del Hospital Clínica San Rafael, quienes gentilmente colaboraron en el uso del autoclave, se obtuvo la Hidroxi-apatita derivada del coral que posteriormente fue utilizada como injerto en las metafisis tibiales de los conejos en estudio (20, 24, 25, 26, 30, 34, 35, 36).

### Estandarización de la técnica quirúrgica

Los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo en el Instituto Franklin Delano Roosevelt, donde contamos con la posibilidad de tener una Sala de Cirugía adecuada, además de la infraestructura y experiencia previa en este tipo de trabajos con conejos.

### Técnica Anestésica

En cuanto a la técnica anestésica en sí, tuvimos la colaboración para el manejo anestésico tanto intra como en el postoperatorio, del Dr. Hernán Charris, Instructor de Anestesia del Hospital Militar Central, quien nos asistió en todos los procedimientos quirúrgicos; su invaluable ayuda facilitó en mucho nuestra labor.

Se utilizó sedación con Ketamina I.M., dosis inicial de 8 mg/kg, con lo cual podíamos iniciar el proceso de rasurado, asepsia y antisepsia del campo operatorio. Una vez rasurado, nuestro anestesiólogo procedía a canalizar la vena de la oreja derecha, para mantener una infusión anestésica constante de Ketamina, a razón de 4 mg/kg/min. Sólo en contadas ocasiones y de acuerdo con la respuesta dolorosa del conejo, se hizo necesario aplicar bolos de refuerzo para finalizar los procedimientos quirúrgicos, que duraban en promedio 8 minutos.

### Técnica Quirúrgica

Se prefirió el abordaje antero-medial, ya que ofrece la cara tibial inmediatamente subcutánea, lo que hace más fácil y rápido el procedimiento; una vez rasurada el área quirúrgica, así como realizada una adecuada

asepsia y antisepsia, se inicia el procedimiento quirúrgico, que podemos estandarizar así:

1. Incisión antero-medial longitudinal de 3 cm, que va distal a la interlínea articular y que compromete piel y T.C.S., hasta llegar a periostio.
2. Incisión de periostio en igual sentido, exponiendo la metafisis proximal de la tibia.
3. Con ayuda de un mini motor (Motor-tool Dremel) y una broca de 2.0 mm, se realizan perforaciones, formando una ventana metafisaria de 6 mm sobre la cual se colocará el injerto de Hidroxiapatita derivada de coral.
4. Lavado de la ventana con 30 c.c. de S.S.N.
5. Colocación del injerto a presión en la ventana metafisaria y regularización de sus bordes prominentes con el Motortool.
6. Lavado con 20 c.c. de S.S.N.
7. Cierre en un solo plano con sutura absorbible (Catgut Crómico 2/0), puntos separados.
8. Se coloca apósito de gasa estéril sobre la zona quirúrgica.

#### **Manejo farmacológico**

Se utilizó Antibioticoterapia profiláctica con Cefalosporinas de primera generación tipo Cefazolina Sódica, a razón de 100 mg/k por dos dosis: la primera en la hora previa al acto quirúrgico y la segunda, 6 horas después de realizado el mismo por vía I.M.

Así mismo, se utilizó analgesia post-operatoria con Ketorolaco Trometamina a razón de 2 mg/k dosis única por vía I.M., colocada inmediatamente termina el procedimiento quirúrgico.

Ninguno de los conejos requirió otro tipo de medicación, aparte de estas dosis y las anestésicas.

#### **Manejo post-operatorio**

Utilizamos dos calentadores de ambiente disponibles en el Instituto Franklin Delano Roosevelt, para mantener los conejos a 37° Centígrados durante las dos primeras horas. Una vez ya recuperados, se colocan en sus jaulas y se realiza su transporte hacia el sitio definitivo, donde se mantienen con iguales características de ambiente y comida "Ad Libitum".

La recuperación de los animales ha sido rápida, incorporándose entre media hora y una hora después

de la cirugía, incluso siendo capaces de levantarse sobre sus patas traseras a partir del primer día POP.

No existieron complicaciones postoperatorias en cuanto a infección de la herida quirúrgica (como se pudo confirmar macro y microscópicamente) y/o deshiscencia de la sutura. Los mismos conejos entre sí, retiraban progresivamente el apósito y la herida se evidenciaba cicatrizada hacia el 5º día.

#### **Sacrificio**

Una vez cumplido el tiempo establecido para cada conejo, se envían a su criadero de origen, donde personal especializado les da muerte mediante un golpe en región cervical. Inmediatamente y por parte nuestra, extraemos la tibia derecha, que se coloca en Formol Bufferizado al 10% para realizar los posteriores estudios anatómicos, histológicos y radiológicos.

#### **Análisis y estudio anatómico**

Cada extremidad obtenida se numera, rotula y se toman fotografías, tanto en papel como en diapositiva. Posteriormente, con ayuda de un calibrador milimétrico, se toman 10 medidas del tamaño actual del injerto y se saca su promedio, que se anota en la tabla de datos para su análisis estadístico. De cada medición se valora así mismo la interfase de manera subjetiva (su existencia o no) por tres evaluadores independientes y se anotan los resultados.

#### **Análisis y estudio radiológico**

Se ha contado con la valiosa ayuda del equipo de radiología del Hospital Militar, con sus técnicos y la ayuda inicial de la Dra. María Clara Salguero, para estandarizar la técnica quirúrgica. Una vez ya despiertos los conejos, se toman las proyecciones iniciales que servirán de control; posteriormente, luego del sacrificio, se llevaron las extremidades estudiadas y se toman las proyecciones A.P. y Lateral. De cada radiografía se proceden a realizar las mismas mediciones con el calibrador, tomando el promedio de 10 y anotando su resultado en la tabla. Así mismo, la valoración subjetiva en cuanto a la interfase o no, se logra con la ayuda de tres evaluadores independientes, que examinan las radiografías meticulosamente, tratando de encontrar la existencia de trabeculación ósea que pase hacia el injerto.

#### **Evaluación microscópica**

Contamos con la valiosa ayuda de la Dra. María Helena Astorquiza, quien desde su inicio mostró un gran interés en el trabajo. Ella misma y por su cuenta, recolectó material bibliográfico que soportará las tinciones ejecutadas e hiciera más objetiva la evalua-

ción. Una vez realizadas las preparaciones, tomó cuenta de la medida microscópica, y de cada muestra inició un conteo exhaustivo secuencial en 10 campos de alto poder (100x), con el fin de evaluar el tipo de células y su número, la presencia de tejido conectivo y material forme, así como las etapas en la maduración ósea y la aparición de vasos sanguíneos en la muestra. Todos los datos se presentan en las siguientes tablas.

## **VALORACION ESTADISTICA Y RECOLECCION DE DATOS**

### **Valoración Estadística**

Con la colaboración del Departamento de Investigación Científica de la Universidad Militar Nueva Granada y su personal especializado en estadística, se definieron las variables a tener en cuenta para la recolección de datos. Se asignaron variables cuantificables (Sistema Métrico Decimal o numeración ordinaria), dividiendo el grupo en tres muestras, dadas por los cortes observacionales realizados a las dos, seis semanas y cuatro meses; así conformados, se diseñó una hoja de recolección de datos, teniendo como parámetros:

#### **Valoración macroscópica**

*Objetiva.* Medición del injerto en milímetros en cada corte observacional (promedio de 10 mediciones).

*Subjetiva.* Presencia o ausencia de interfase entre el hueso adyacente y el injerto (3 evaluadores independientes).

#### **Valoración radiológica**

*Objetiva.* Medición del injerto en milímetros en las proyecciones A.P. y lateral.

*Subjetiva.* Presencia o ausencia de trabeculación que pase del hueso normal al injerto de Hidroxiapatita coralina (tres evaluadores independientes).

#### **Valoración microscópica**

*Objetiva.* Número promedio de células propias de tejido óseo normal (Osteocitos, Osteoblastos, Osteoclastos) por 10 campos microscópicos de alto poder tomados secuencialmente.

*Subjetiva.* Presencia o ausencia de elementos formes del tejido óseo normal en los mismos campos estudiados (colágeno, vasos sanguíneos).

Los datos recolectados se presentan en tablas especiales.

## **Análisis Estadístico**

Una vez completada la muestra y recolectados todos los datos, se inicia el análisis de cada variable, con ayuda del Departamento de Investigación Científica de la Universidad Militar Nueva Granada.

Con este fin, se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas que permiten estudiar y comparar mejor muestras pequeñas, como la del presente estudio.

Inicialmente, se recolectaron los datos representativos en una Hoja Electrónica de un programa de computador (Q-PRO); posteriormente, se utilizó el programa de manejo estadístico S.P.S.S. y principalmente dos pruebas:

### **Wilcoxon**

Permite comparar dos muestras relacionadas, con lo que se puede estudiar la evolución del tamaño del injerto en los distintos grupos y determinar su significancia estadística, cuyo valor significativo debe ser menor del 5% ( $p < 0.05$ ).

### **Kruskal-Wallis**

Tanto simple como corregido "por pares", que permite comparar tres o más muestras no relacionadas, con la que se estudió el comportamiento histológico de las muestras tomadas durante su evolución en el tiempo, por medio de los distintos grupos, así como su significancia estadística, que debe ser menor del 5% ( $p < 0.05$ ).

Las variables obtenidas en cada conejo de los diferentes grupos, se unieron para sacar promedios, medianos con su respectiva desviación Standard, así como los rangos que permitían evaluar la significancia estadística.

Sobre estos datos, se elaboraron diferentes gráficos.

## **DISCUSION**

Las necesidades diarias de un servicio de Ortopedia, han hecho que aumente el número de procedimientos en los cuales se requiere la utilización de injertos óseos; la limitación en la cantidad disponible de autoinjerto, así como los costos y la disponibilidad de los aloinjertos, han motivado la investigación en búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento en este tipo de pacientes.

El aumento en las publicaciones recientes sobre los riesgos de transmisión de enfermedades y anti-

genicidad de los aloinjertos que determinan en últimas su resorción y un mal resultado, han incrementado el interés por los biomateriales inertes, como es la Hidroxi-apatita derivada del coral, que transformada por una reacción de recambio hidrotérmico, le da características biomecánicas similares e incluso superiores a las del hueso, favoreciendo su integración como material osteoconductor.

Estas ventajas teóricas, han hecho que se realicen trabajos experimentales en distintos modelos animales a lo largo del mundo con resultados satisfactorios.

Existe incluso una preparación comercial (Interpore) que se está empezando a utilizar con éxito en humanos, con costos similares a los de los aloinjertos masivos, situación que limitaría su uso y difusión en nuestro medio.

Se tomó coral muerto, donado con fines investigativos por el Inderena, y con ayuda de Ingenieros Químicos se pudo reproducir el proceso de recambio hidrotérmico, con recursos que están al alcance de cualquier medio hospitalario, disminuyendo notablemente los costos. El problema consistía en evaluar cuál era la real capacidad de este mineral para integrarse al hueso dentro de un proceso de formación

ósea. Se diseñó un modelo experimental en conejos Nueva Zelanda como primer peldaño en un proceso investigativo que posteriormente permita su evaluación en el ser humano.

Mediante el análisis secuencial desde el punto de vista anatómico, radiológico e histológico, se comprobó la capacidad de integración de la Hidroxi-apatita derivada del coral en defectos óseos metafisarios de manera estadísticamente significativa.

Así mismo, se pudo comprobar la resorción progresiva del injerto en los diferentes cortes según el tiempo, con disminución real de su tamaño y adquiriendo progresivamente características similares a las del hueso sano adyacente.

Microscópicamente, no se observaron cambios inflamatorios que sugirieran infección o una posible respuesta inmune de rechazo, lo cual concuerda con estudios publicados que refuerzan la ventaja de ser un material bioinerte, que por sus mismas características de preparación asegura su esterilidad.

Estas ventajas, así como los resultados positivos hallados en el estudio, abren las puertas para su posible implementación como alternativa en el tratamiento de pacientes que requieran injertos óseos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Villee, Cl. A. Biología. Interamericana. Séptima Edición, p. 240-249, 1978.
2. Webb, J.E.; Wallwork and Elgood: Guide to invertebrate animals. Macmillan, London, 1978.
3. Berquist, P.R.: Sponges. London, Hutchinson, 1978.
4. Cairns, St. D.: Guide to the commoner shallow-water gorgonians of Florida, the Gulf of Mexico, and the Caribbean region. University of Miami, Sea Grant Programa, p. 74, 1976.
5. Colin, P.I.: Caribbean reef invertebrates and plants. T.F.H. Publications, Inc. 1978.
6. Greensberg, J.: The Living Reef. Seahawk Press, Miami, 1972.
7. V. Prah, H. y Erhardt H.: Colombia, corales y arrecifes coralinos. FEN, Colombia, 1985.
8. V. Prah, H.: Arrecifes del Caribe Colombiano. Banco de Occidente; Villegas Editores. Bogotá-Colombia, 1988.
9. Friese, U.E.: Marine Invertebrates. T.F.H. Publications, Inc. 1973.
10. Kaplan, E.H.: A field guide to coral reefs of the Caribbean and Florida. Houghton Mifflin Company, 1982.
11. Ebbs, N.K.: The coral-inhabiting polychaetes of the Northern Florida reef tract. Bull. Mar. Sci. 16, 485-555, 1966.
12. Erhardt, H.: La existencia del coral *Stephanocyathus nobilis* en la costa de la península Guajira. Una demostración primaria para la Costa Atlántica de Colombia. Mitt. Inst. Colombo-Alemán Invest. Cient. 8, 59-62, 1976.
13. Erhardt, H. y Werding. B.: Los Corales de la Bahía de Santa Marta, Colombia, Museo del Mar 7, 3-50, 1975.
14. Manjarrés, G.A.: Nuevos encuentros de actinias en la región de Santa Marta, Colombia. Au. Inst. Inv. Mar., Punta Betín 10, 127-132, 1978.

15. Pfaff, R.: Las Scleractina y Milleporina de las Islas del Rosario. Mitt. Inst. Colombo-Alemán. Invest. Cient. 3, 17-24, 1969.
16. Holmes, R. Bucholz, R. and Mooney, V.: Porous Hydroxiapatite as a bone graft substitute in metaphyseal defects. A Histometric study. J.B.J.S. 68A: 904, 1986.
17. Holmes, R.; Mooney, V. and Bucholz, R.: A coralline hydroxiapatite bone graft substitute: Preliminary report. Clin. Orthop. 188: 252, 1984.
18. Ripamonti, U. The Morphogenesis of bone in replicas of porous Hydroxiapatite obtained from conversion of calcium carbonate exoskeletons of coral. J.B.J.S. 73A: 5, 1991.
19. Holmes, R.E.; Bucholz, R.W. and Mooney, V.: Porous Hydroxiapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: a Histometric Study. J. Orthop. Res., 5: 114-121, 1987.
20. Weber, Jon E.; White, E.W.; Lebiezick, J. New Porous Biomaterials by replication of Echinoderm Skeletal Microstructures. Nature, Vol. 233, pp. 337-339, October 1, 1971.
21. Klawitter, J.J.; Hulbert, S.F.; Talbert, C.D. and Fitts, C.T. Use of Ceramics in Surgical Implants. Gordon and Breach, 1969.
22. Donnay, G. and Pawson, D.L. Science, 166, 1147, (1969).
23. Roy, Della M.; Linnehan, Sari K.: Hydroxy-apatite formed from Coral Skeletal Carbonate by Hydrothermal Exchange. Nature, Vo. 247, pp. 220-222, Jan 25, 1974.
24. White, J.N.; Weber, J.N.; and White, E.W.: Porous Biomaterials formed by Hydrothermal Exchange. Science, N. York, 176, p. 922, 1972.
25. Roy, D.M. and Roy, R.: Structural Properties of Hydroxy-apatite and related compounds. Chap. 16. Gordon Breach ed. N. York, 1974.
26. Dickens, B.: Structural Properties of Hydroxy-apatite and related compounds. Chap. 21. Gordon Breach ed. N. York, 1974.
27. Bhaskar, S.; Brady, J.; Getter, L. et al.: Biodegradable ceramic implants in bone: Electron and light microscopic analysis. OPral Surg, 32: pp. 336-346, 1971.
28. Cameron, R.; Macnab, I.; Pilliar, R.: Evaluation of biodegradable ceramic. J. Biomed 11: pp. 179-186, 1977.
29. Flatley, T.; Lynch, K.; Benson, M.: Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. Clin. Orthop. 179: pp. 246-252, 1983.
30. Chiroff, R.T.; White, E.W.; Weber, J.N. and Roy, D.M. Tissue ingrowth of replamineform implants. J. Biomed. Mater. Res. 6: 29, 1975.
31. Bucholz, R.W.; Carlton, A. and Holmes, R.: Interporous Hydroxiapatite as a Bone Graft Substitute in Tibial Plateau Fractures. Clin Orthop. 240: 53, Marzo 1989.
32. Holmes, R.: Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant. Plast. Reconstr. Surg. 63: 626, 1979.
33. Jarcho, M.: Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin. Orthop.: 157: 259, 1981.
34. Roy, D.M. and Linnehan, S.K.: Hydroxiapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. Nature, 247: 220-22, 1974.
35. Weber, J.N. and White, E.W.: Carbonate minerals as precursors of new ceramics, metal and polymer materials for biomedical applications. Mineral Sci. Engin., 5: 151-165, 1973.
36. White, R.A.; Weber, J.N.; and White, E.W.: Replamineform: A new process for preparing porous ceramic, metal and polymer prosthetic materials. Science, 176: 922-924, 1972.
37. Glucksmann, A.: The role of mechanical stress in bone formation in vivo. J. Anat. 76: 231, 1942.
38. Yamada, H.: Strength of Biological Materials. Baltimore, Williams & Wilkins, 1970. p. 52.
39. Rodrigo, J. and Prolo, D.J. Allografts. In Champman's Operative Orthopaedics. J.B. Lippincott, Philadelphia. Vol. 2, Chapter 71.p. 911-928, 1988.
40. Stevenson, S. and Horowitz, M.: The response to bone Allografts. Current Concepts Review. J. Bone Joint Surg. 74A, N° 6, pp. 939-950, July, 1992.
41. Bonfiglio, M. and Jeter, W.S.: Immunological responses to bone. Clin. Orthop. 87: pp. 19-27, 1972.
42. Burchardt, Hans: The biology of bone graft repair. Clin Orthop. 174, pp. 28-42, 1983.
43. Burwell, R.G.; and Gowland, G.: Studies in the transplantation of bone: II. The changes occurring in the lymphoid tissue after homografts and autografts of fresh cancellous bone. J. Bone Joint Surg. 43B, (4): pp. 820-843, 1961.
44. Czitrom, A.; Axelrod, T. and Fernandes, B.: Antigen presenting cells and bone allotransplantation. Clin. Orthop. 197: pp. 27-31, 1985.
45. Friedlander, G.E.: Current concepts review: Bone Grafts: The basic rationale for clinical applications. J. Bone Joint. Surg. 69(A), pp. 786-790, June 1987.
46. Friedlander, G.E.; Strong, D.M. and Sell, K.W.: Studies on the antigenicity of bone I. Freeze-dried and deep-frozen allografts in rabbits. J. Bone Joint Surg. 58(A), pp. 854-858. September, 1976.
47. Heiple, K.G.; Chase, S.W. and Herndon, C.H.: A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. J. Bone Joint Surg. 45(A) pp. 1593-1612, Dec. 1963.
48. Stevenson, Sharon: The immune response to osteochondral allografts in dogs. J. Bone Joint. Surg. 69(A), pp. 573-582, April, 1987.

49. Owen, R.; Goodfellow, J. and Bullough, P. Fundamentos Científicos de Ortopedia y Traumatología. Salvat Editores, S.A. 1984.
50. Burnstein, A.H. and Frankel, V.H.: A Standard test for laboratory animal bone. J. Biomech. 4: 155, 1971.
51. Currey, J.D. The mechanical properties of bone. Clin. Orthop. 73: 210, 1970.
52. Frost, H.M.: The Laws of bone structure. Springfield, I.L. Charles C. Thomas. 1964, p. 37.
53. Ham, A.W. Tratado de Histología. Interamericana. Séptima Edición, p. 352-417, 1975.
54. Saha, S.: The dynamic strenght of bone and its relevance. In Ghista D.N. (ed.): Osteoarthromechanics. New York, McGraw-Hill, 1982, p. 1-38.
55. Evans, F.G. and Lebow, M.: Strenght of human compact bone under repetitive loading. J. Appl. Physiol. 10: 127, 1957.
56. Pope, M.H. and Outwater, J.O.: The fracture characteristics of bone substance. J. Biomech. 5: 457, 1972.
57. Currey, J.D.: Differences in tensile strenght of bone of different histological type. J. Anat. 93: 87, 1959.
58. Mc Elhaney, J.H.: Dynamic response of bone and muscle tissue. J. Appl. Physiol. 21: 1231, 1966.
59. Panjabi, M.M.; White, A.A.: Mechanical properties of bone as a function of rate of deformation.

---

metal and bone

925-924, 1972

37. Glucksmann, A. The role of mechanical stress in bone formation in vivo. J. Anat. 78: 237, 1942.

38. Yamada, H. Strenght of Biological Materials. Baltimore, Williams & Wilkins, 1970, p. 52.

39. Fritzsche, J. and Fritzsche, D. Allografts in Charnipman's Osteomyelitis. J. Bone Joint Surg. 61: 922, 1988.

40. Fritzsche, J. and Fritzsche, M. The response to bone allografts. Current Concepts Review. J. Bone Joint Surg. 71A: 974, pp. 969-982, July, 1989.

41. Bonfiglioli, M. and Jelic, W. Immunological response to bone. Clin. Orthop. 87: pp. 19-27, 1972.

42. Buchholz, H. The biology of non-grafted bone. Clin. Orthop. 174: pp. 29-42, 1988.

43. Burstein, R.H. and Dowling, D. Studies in the histology of bone. II. The changes occurring in the synovial tissue after allograft and autograft of fresh cancellous bone. J. Bone Joint Surg. 48B: 418, pp. 420-445, 1967.

44. Carter, A., Axelrod, T. and Fernandez, B. Antigen presenting cells and bone allografts. Clin. Orthop. 187: pp. 27-31, 1985.

45. Friedlander, G.E. Current concepts review. Bone Grafts: The basic rationale for clinical application. J. Bone Joint Surg. 68A: pp. 786-789, June, 1987.

46. Friedlander, G.E., Swann, D.M. and Selig, K.W. Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep frozen allografts in rabbit. J. Bone Joint Surg. 68A: pp. 824-828, September, 1976.

47. Heiple, K.G.; Chase, S.W. and Hendon, E.H.: A comparative study of the healing process following different types of bone resorption. J. Bone Joint Surg. 65A: pp. 1883-1872, Dec. 1983.

48. Stevenson, S.H. The immune response to bone allografts in dogs. J. Bone Joint Surg. 69A: pp. 873-882, April, 1987.

30. Weber, J. and White, E.W. Lebedok, J. New Focus: Biomechanics by Revision of Experimental Materials. Microstructure Nature, Vol. 233, pp. 237-259, Oct. 1977.

31. Kivimäki, J.J., Hulth, S.E., Töpel, C.O. and Eriksson, C.T. Use of Calcium in Surgical Implants. Gaskell and Gaskell, 1988.

32. Connor, G. and Fowles, J.L. Science 188: 1147, (1988).

33. Roy, D.M., Lunn, B.K., Harty, G. and Fritzsche, J. The role of Calcium in Surgical Implants. Exchange Nature, Vol. 247, pp. 250-252, Jan. 28, 1974.

34. White, E.W., Weber, J.R., and White, E.W. Porous Biomechanics formed by Hydrothermal Exchange. Science, N. York, 170, p. 922, 1972.

35. Roy, D.M. and Roy, R. Biomechanical Properties of Hydroxyapatite and related compounds. Chap. 18. Gordon and Breach, ed. N. York, 1974.

36. Dixon, B. Biomechanical Properties of Hydroxyapatite and related compounds. Chap. 21. Gordon and Breach, ed. N. York, 1974.

37. Bracker, R., Brack, J., Geyer, J. et al. Biodegradable ceramic implants in bone. Electron and light microscopic analysis. Orthop. Surg. 32: pp. 238-246, 1977.

38. Cameron, R., Marmor, I., Pitter, R. Evaluation of biodegradable ceramic. J. Biomed. 1: pp. 179-186, 1977.

39. Flaxey, T., Lynch, K., Benson, M.: Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit. Spine Clin. Orthop. 178: pp. 246-252, 1983.

40. Gault, R.T., White, E.W., Weber, J.R. and Roy, D.M. Tissue ingrowth of replacement implants. J. Biomed. Mater. Res. 6: 29, 1972.

31. Bucholz, R.W., Carter, A. and Holmes, R.: Interporous Hydroxyapatite as a Bone Graft Substitute in Tibial Plateau Fractures. Clin. Orthop. 240: 83, March, 1989.