

## Sección de Investigación y Ciencias Básicas

Artículo arbitrado

# Epifisiodesis química con quimopapaína Intrafisiaria: modelo experimental en conejos

Gómez A.\*, Turriago C.A.,\*\* Jiménez M. L.\*\*\*

### Resumen

*En la práctica clínica se emplean múltiples métodos de epifisiodesis, todos ellos basados en el daño mecánico provocado en la fisis, con porcentajes variables de errores y complicaciones. No existe un método alternativo en donde la lesión fisiaria sea el resultado de un daño químico. Existe evidencia experimental sobre la degradación fisiaria provocada por sustancias como la papaína (aplicada por diferentes vías) y la utilización efectiva y segura, aunque controvertida, de su derivada, la quimopapaína, en procesos de quimonucleolisis. Se desarrolló un modelo experimental de epifisiodesis química en 25 conejos, a los que se les aplicó en la pata derecha quimopapaína intrafisiaria bajo control fluoroscópico, evaluándose clínica, radiológica e histológicamente hasta el 21 día POP.*

*Se encontraron únicamente cambios histológicos específicos por acción de la enzima hasta el 6º día postoperatorio, después de lo cual desaparecen, indicando efectos temporales reversibles insuficientes para provocar arrestos fisiarios definitivos.*

**Palabras claves:** epifisiodesis química, papaína, quimopapaína, modelo experimental, conejos.

### Introducción

La epifisiodesis es el tratamiento de elección para las discrepancias de longitud entre 2 y 5 centímetros y las deformidades angulares en los miembros inferiores<sup>1, 2, 3</sup>. Tiene como ventajas la facilidad técnica, su alta efectividad y la buena aceptación por parte del paciente. Sin embargo, en nuestra experiencia clínica con la técnica de Bowen el número de complicaciones postoperatorias, principalmente rigidez postoperatoria por dolor, es mayor de la esperada.

Los reportes en la literatura sobre complicaciones y fallas son muy variables dependiendo del autor y la técnica empleada: Tachdjian reporta 5 a 10% de complicaciones significativas (incluyendo disfunción neurovascular, rigidez y

hemartrosis)<sup>1</sup>. Stephens, Herrick y MacEwen reportan 7% (incluyendo lesiones del nervio safeno)<sup>2</sup>, Canale, Russell y Holcomb informan sobre quemaduras en la piel debido al uso incorrecto de las fresas neumáticas<sup>24</sup>. Green y Anderson 9% de complicaciones<sup>1</sup>. Ogilvie y Canale reportan posibles daños al paquete neurovascular por el uso de brocas y buriles de alta velocidad<sup>3</sup> y Liotta y Ambrose, utilizando técnica percutánea fluoroscópica refieren que el 8% de sus pacientes requirió fisioterapia postoperatoria para recuperar movilidad y fuerza<sup>4</sup>.

En las décadas del 50 y 60 se realizaron múltiples estudios experimentales utilizando diferentes sustancias como la papaína<sup>5, 6, 7, 8, 9</sup>, la vitamina A<sup>10, 11</sup> y corticoides<sup>12</sup> para provocar arrestos fisiarios. Las que mayor atención despertaron fueron la papaína y posteriormente la quimopapaína, su derivada, aunque para otros fines terapéuticos. Los estudios reportados encontraron que después de una inyección simple de papaína, por cualquier vía y con dosis tan pequeñas como 2 microgramos por mililitro, se provoca un estrechamiento reversible y tempo-

\* Residente IV. Ortopedia y Traumatología. Pontificia Universidad Javeriana.

\*\* Jefe de Ortopedia y Educación Médica. Instituto F. D. Roosevelt.

\*\*\* Profesor Departamento de Patología Hospital San Ignacio.

ral de las líneas fisiarias con respuestas dosis-dependientes y que pueden desaparecer al 5o día postoperatorio. Con inyecciones múltiples hay cierre fisiario definitivo al tercer ó cuarto día postoperatorio provocando alteraciones longitudinales y angulares en los huesos largos. Con aplicaciones prolongadas, hasta por 70 días, hay pérdida de peso y malformaciones en el tórax y la columna por necrosis del núcleo pulposo, sin provocar alteraciones viscerales<sup>5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13</sup>.

A pesar de estos resultados experimentales no se vuelven a encontrar reportes en la literatura sobre la utilización de la papaína para provocar arrestos fisiarios. Basados en estos hallazgos los estudios posteriores utilizaron su derivada, la quimopapaína. Esta tiene igual mecanismo de acción, con mayor potencia y especificidad para provocar la disolución del núcleo pulposo<sup>14, 15, 16</sup>. Se ha utilizado como tratamiento para hernias discales con indicaciones muy específicas y resultados muy controvertidos<sup>17, 18, 19</sup>.

Aunque no existen reportes sobre la utilización de quimopapaína para provocar arrestos fisiarios, basados en su mecanismo de acción pensamos que podría ser adecuada para provocar una epifisiodesis química. Nuestra hipótesis de trabajo es: la aplicación experimental de quimopapaína controlada fluoroscópicamente en las fisis de conejos inmaduros provocará cambios estructurales en las mismas que originarán un arresto temporal o definitivo en su desarrollo. Los objetivos de nuestro trabajo fueron: a) diseñar un modelo experimental que permitiera aplicar quimopapaína dentro de la fisis bajo control fluoroscópico, y b) evaluar la acción de la quimopapaína en las fisis femoral distal o tibial proximal de conejos inmaduros hasta el 21 día POP, en términos de cambios histológicos, radiológicos y clínicos incluyendo dolor, rigidez articular, daños de piel, anafilaxis e infección.

### Materiales y métodos

Se desarrolló un modelo experimental en conejos, ya que la mayoría de estudios con papaína se realizaron con ellos y el crecimiento de sus fisis está documentado en la literatura<sup>20</sup>. Se utilizaron 25 conejos Nueva Zelanda inmaduros, con peso entre 500 y 800 gramos y edad aproximada de 4 a 6 semanas, con fisis abiertas comprobadas fluoroscópicamente.

Se utilizó quimopapaína soluble y cromatográficamente purificada en forma de

polvo liofilizado para uso experimental (Sigma Laboratories, Chicago IL), a una concentración de 0,62 unidades/mg de proteína. Se mantuvo refrigerada a menos de 0° centígrados durante su almacenamiento y transporte. La enzima se preparó realizando diluciones múltiples en solución salina estéril hasta llevarla a una concentración de 1.0 mg de quimopapaína en 0.1 ml; cada dosis se almacenó por separado en un vial y se esterilizó pasando por filtros Sartorius de 0.45 micras de poro en medio estéril. La dosis empleada de quimopapaína para cada conejo (1.0 mg quimopapaína/0.1 ml solución salina) equivalente a 2000 unidades picoKatal, se determinó teniendo en cuenta que estudios recientes han demostrado que dosis de 500 a 2000 (unidades) pkat son efectivas para lograr la disolución del núcleo pulposo en humanos, cuyo volumen es mucho mayor que el de la fisis proximal de la tibia del conejo<sup>21, 22, 23</sup>.

La aplicación de quimopapaína en la fisis se realizó de la siguiente manera: Bajo anestesia general inhalatoria se localizó fluoroscópicamente la fisis de la tibia proximal o del fémur distal. Se aplicó una dosis de 1.0 mg de quimopapaína con una aguja calibre 0,51 mm originalmente diseñada para punción raquídea. La aguja entró por la cara externa de la rodilla hasta la mitad de la fisis y luego de inyectar la enzima permaneció por 15 segundos para evitar la extravasación de la quimopapaína en los tejidos vecinos Fig. 1. Siguiendo el mismo procedimiento se colocó como control una dosis de 0.1 ml de solución salina normal en la pata izquierda (grupo control). Se realizó el mismo procedimiento para todos los conejos. En el postoperatorio se colocaron en jaulas comunales, con apoyo y movilización inme-

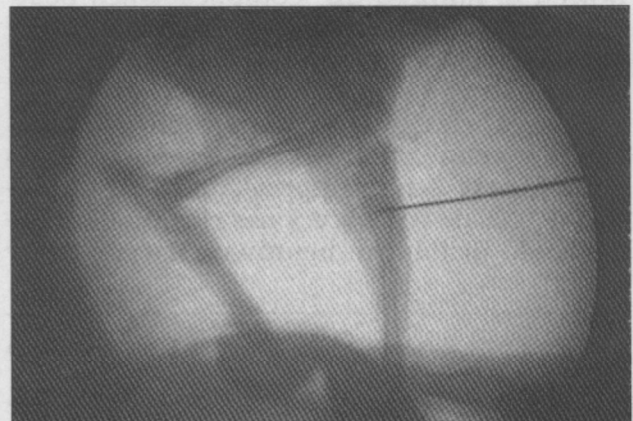


Fig. 1 Aplicación de quimopapaína bajo control fluoroscópico



diata, sin antibióticos o analgésicos y se evaluaron diariamente para detectar la aparición de complicaciones como dolor, cojera, edema, necrosis, infecciones de la piel o signos de intolerancia a la quimopapaína.

Sacrificamos los conejos de la siguiente manera: al 3er día 1 conejo, 5º día 11 conejos, 6º día 2 conejos, 8º día 1 conejo, 14º día 5 conejos, 19º día 1 conejo y 21 días 4 conejos, con el objeto de poder evaluar los efectos de la quimopapaína a corto y mediano plazo. El fundamento teórico para esta secuencia en el sacrificio de los conejos es que existen estudios con papaína (no con quimopapaína) que muestran que su efecto en la fisis puede desaparecer al 5º día de su aplicación si no se colocan dosis repetidas<sup>5,8</sup> y por lo tanto los mayores cambios deberían encontrarse antes del día seis. Los análisis posteriores buscarían encontrar efectos residuales y cicatrización de la fisis. Se tomaron Rx de ambas rodillas en los conejos sacrificados en los días 5 y 21 buscando alteraciones en el tamaño de la fisis, asimetría o cierre de la misma y diferencias longitudinales entre los segmentos derecho e izquierdo. Se desarticularon los especímenes desde la cadera y se examinaron macroscópicamente, buscando el sitio de entrada de la punción, necrosis de piel o músculo, equimosis, edema o sinovitis en la rodilla y se realizaron mediciones longitudinales de los segmentos inyectados con calibrador electrónico eliminando centésimas de milímetro (Mitotuyo Inc). Cada especimen fué desnudado de tejidos blandos, fijado en formol, decalcificado 48 a 72 horas en ácido nítrico e incluido en parafina, realizándose cortes longitudinales a 4 micras. Se procesaron 100 cortes: para cada rodilla, derecha o izquierda, se realizaron dos tinciones de Hematoxilina-Eosina y dos tinciones de Azul de Toluidina; se examinaron con microscopía de luz buscando pérdida de la coloración basófila de la matriz de proteo-glucanos, desorganización de las columnas de condrocitos y alteraciones en su disposición<sup>7, 10</sup>.

## Resultados

### 1. Resultados Clínicos

De los 25 conejos operados ninguno presentó complicaciones intraoperatorias atribuibles a la acción de la quimopapaína ni signos de intolerancia o anafilaxia en el postoperatorio. Diez conejos presentaron cojera y dolor a la palpación en el sitio de punción el primer día, con resolución

espontánea. La actividad en la jaula, ganancia de peso y movilidad activa y pasiva de las extremidades fue normal. En uno de los conejos se encontró la caída de la punta de las orejas el 2º día postoperatorio, la cual revirtió al 4º día Fig. 2.

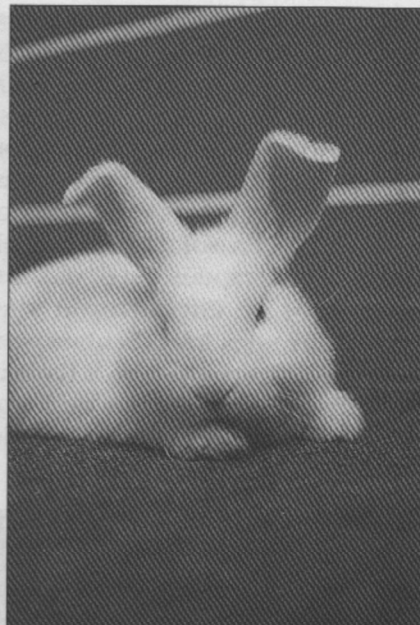


Fig. 2 Efecto de la aplicación de Quimopapaina: caída de la punta de las orejas.

### 2. Resultados radiológicos

En 3 de los conejos sacrificados al 5º día se evidenció el sitio de entrada de la aguja de punción localizado inmediatamente por debajo de la línea fisiaria y rodeada por un halo de esclerosis en las rodillas que recibieron quimopapaína únicamente Fig. 3. No se encontraron cierre, cambios en la altura de las fisis o diferencias longitudinales o angulares en los otros especímenes evaluados al día 5º o al 21 postoperatorio.



Fig. 3



### 3. Evaluación macroscópica

En uno de los conejos sacrificados al 5° día se encontró una lesión ulcerada en la piel de la pata derecha sin signos de infección.

En 7 de los conejos sacrificados antes del 5° día se encontró una zona de equímosis sin necrosis en la masa muscular vecina a la zona de punción en las rodillas a las que se les aplicó quimopapaína; iguales hallazgos se encontraron en los animales sacrificados al 6° y 8° días Fig. 4. No se encontraron cambios de este tipo en las rodillas que recibieron solución salina ni en los que se sacrificaron después del 8° día. En ninguno de los grupos se encontraron signos de sinovitis o hemorragias intrarticulares en las rodillas. No se encontraron puentes fisiarios, alteraciones angulares o diferencias de longitud en las extremidades examinadas comparativamente.



Fig. 4 Evaluación macroscópica

### 4. Evaluación Histológica

Los hallazgos histológicos más relevantes que se encontraron en las rodillas sometidas a la acción de la quimopapaína fueron: al tercer día posoperatorio se encontró pérdida de la coloración basófila de la matriz; en 5 de los 11 especímenes correspondientes al 5° día se encontró más claramente una pérdida de la distribución columnar de los condrocitos con marcada disminución de la coloración basófila de la matriz extracelular en todo el espesor de la fisis, en algunos de ellos con presencia de material fibrinoide, ruptura de los septos de cartílago y unas imágenes de «lagunas» de células con escasa matriz de soporte. En uno de los cortes se observaron escasos fibroblastos e invasión capilar proveniente de la metáfisis Figs. 5, 6. Estos

hallazgos se encuentran también en una de las muestras del 6° y 8° días aunque en menor intensidad Fig. 7. Los cortes realizados en los días 14, 19 y 21 no evidenciaron ningún cambio histológico atribuible a la acción de la quimopapaína.

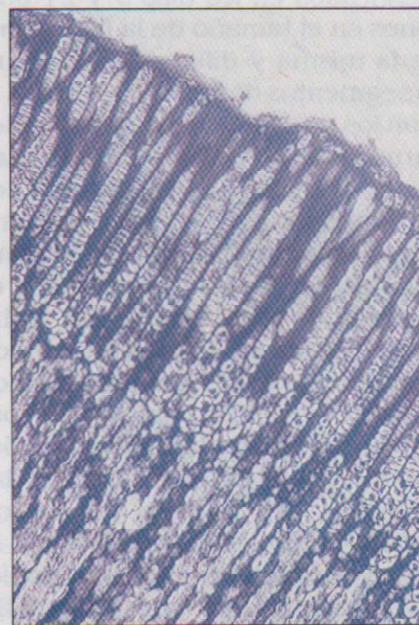
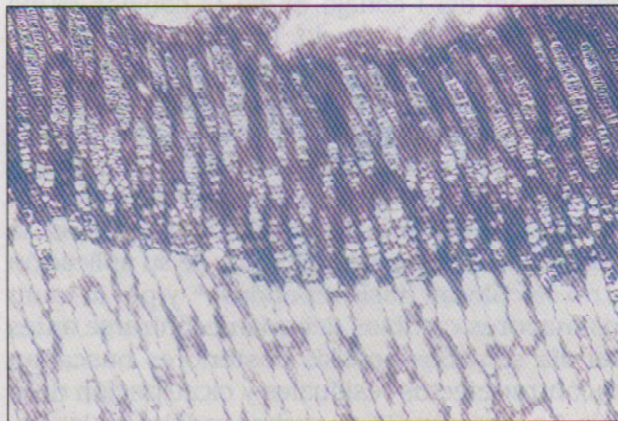


Fig. 5 Aspecto normal de la fisis, coloración azul de Toluidina

En las rodillas izquierdas que se procesaron como control, en una correspondiente al 3er día se encontró una zona de pérdida de coloración y desorganización celular, sin encontrar alteración en los demás especímenes.

En ninguno de los cortes procesados se evidenciaron puentes fisiarios ni otras alteraciones que confirmaran el desarrollo de un arresto definitivo en el crecimiento de la fisis.



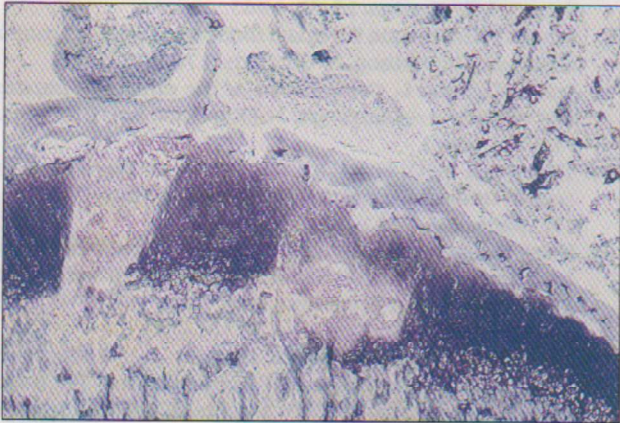
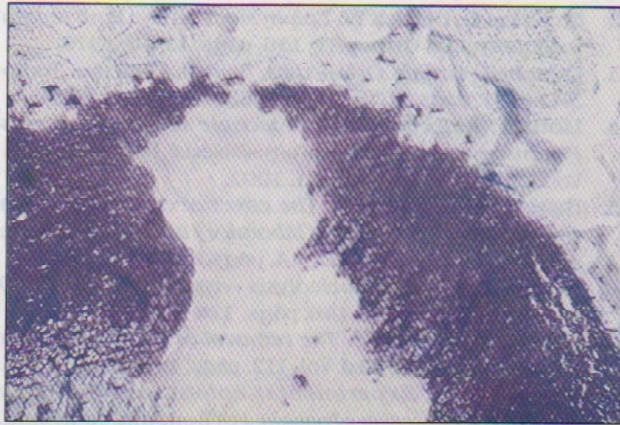


Fig. 6 Hallazgos histológicos 5° día POP.

### Discusión

Los estudios experimentales han demostrado que se pueden provocar arrestos fisiarios utilizando enzimas proteolíticas como la papaína<sup>5, 8, 11, 13</sup>. Esta actúa disolviendo la proteína no



Fig. 7 Hallazgos histológicos 8° día POP.

colagénica que interconecta las cadenas largas de mucopolisacáridos en los proteoglicanos de la matriz de los cartílagos de crecimiento rápido, cuando se aplica intravenosa, intrametatarsiana o intraperitoneal, con dosis únicas o repetidas. Su derivada, la quimopapaína, tiene mayor potencia y especificidad y ha sido empleada para disolver el núcleo pulposo en el tratamiento de hernias discales. Su utilización clínica ha sido ampliamente controvertida ya que se han publicado múltiples estudios con resultados adversos que incluyen efectos neurológicos severos y casos de anafilaxia mortal. Sin embargo, estudios recientes han determinado que la mayoría de estos efectos adversos se deben a inadecuada selección de los pacientes, mala técnica quirúrgica, utilización de medios de contraste o enfermedades severas intercurrentes no evaluadas. La anafilaxia es el único efecto que depende exclusivamente de la aplicación de la quimopapaína con porcentajes de presentación bajos: Kitchel y Brown (1992) reportan 0,4% de anafilaxis<sup>17</sup>, Konings (1993) en 43.662 casos informa 0,44% de complicaciones severas incluyendo anafilaxis<sup>18</sup> y Nordby, Wright y Schofield en el mismo año encontraron 0,0052% de anafilaxia mortal en 135.000 pacientes<sup>19</sup>.

Hasta el momento no se había utilizado ningún tipo de enzima aplicada bajo control fluoroscópico directamente sobre la fisis, ya que los métodos tradicionales de epifisiodesis se basan en la destrucción mecánica de la misma para provocar un puente fisiario, con porcentajes muy variables de complicaciones. Con el presente trabajo hemos desarrollado un modelo experimental de epifisiodesis química utilizando quimopapaína, que puede realizarse y reproducirse experimentalmente; aunque en nuestro trabajo no encontramos alteraciones radiológicas, clínicas o macroscópicas de arresto fisiario, encontramos evidencia histológica de cambios fisiarios



producidos por la acción de la quimopapaína dados por pérdida de la coloración basófila de la matriz de proteoglucanos y desorganización celular entre el 3° y 6° día postoperatorios que son iguales a los encontrados por acción de la papaína aplicada sobre la fisis<sup>7,10</sup>. Sin embargo, estos cambios desaparecen después del 8° día, lo cual sugiere que se trata de cambios temporales, insuficientes para provocar un puente fisiario definitivo. Esto nos lleva a pensar que aún utilizando una dosis única muy alta de quimopapaína intrafisiaria en conejos (equivalente a la máxima necesaria para disolver el núcleo pulposo de un disco intervertebral humano), su comportamiento al nivel de la fisis es igual que el de la papaína, desapareciendo su efecto después del 6° día. Es posible que por lo tanto también se requiera la aplicación de múltiples dosis para provocar un arresto definitivo, que la haría impráctica para uso clínico: si bien está demostrado que el riesgo de anafilaxis con dosis única de quimopapaína es bajo, puede aumentar en forma exponencial con dosis repetidas. Encontramos que aplicada intrafisiariamente la acción de la enzima es puramente local alrededor del sitio de la punción, lo que podría deberse a la relativa avascularidad de la zona fisiaria y a su arquitectura, que impiden la difusión generalizada de cualquier sustancia. No obstante, uno de los conejos presentó caída de las orejas lo que representa efecto sistémico por extravasación probablemente metafisiaria, siendo este un efecto adverso y riesgoso en el humano.

No tenemos una clara explicación al porqué todas las fisis inyectadas no mostraron cambios. Puede ocurrir que aunque la inyección se controló fluoroscópicamente la enzima se extravasa a la metafisis o a la epifisis y allí ocurre una rápida absorción en el torrente sanguíneo.

Aunque nuestros resultados sólo nos permiten deducir que los efectos de la quimopapaína aplicada intrafisiaria en dosis únicas son temporales e insuficientes para provocar un arresto fisiario definitivo en conejos, creemos que se debe continuar investigando con otro tipo de enzimas más potentes y específicas, como la Condroitinasa ABC y la Calpaína I, aún en experimentación, que pudieran provocar este efecto en forma duradera y que permitan ser utilizadas a nivel clínico con seguridad. De esta manera la epifisiodesis química controlada podría plantearse como una alternativa real a los métodos tradicionales.

### Bibliografía

1. **Tadchjian M.** *Pediatric Orthopaedics*. 2a edición. Tomo 4. págs. 2850-2892. 1990.

2. **Stephens D, Herrick W.** *Epiphysiodesis for limb length inequality*. Clin Orthop. N° 136. págs. 41-48. 1978.
3. **Campbell.** *Cirugía Ortopédica*, Séptima edición. Tomo 3. Cap. 61. págs. 2638-2655. 1988.
4. **Liotta F, Ambrose T.** *Fluoroscopic technique versus Phemister technique for epiphysiodesis*. J of Ped Orthop. Vol. 12. N° 2. págs. 258-261. 1992.
5. **Hulth A, Westerborn O.** *The effect of crude papain on the epiphyseal cartilage of laboratory animals*. J of Bone and Joint Surg. Vol. 41-B, N° 4. págs. 836-847. 1959.
6. **McCulloch J.** *Chemonucleolysis : experience with 2000 cases*. Clin Orthop. N° 146. págs. 128-135. 1980.
7. **Potter J, McCluskey R.** *The removal of cartilage matrix by papain*. J of Exp Med. Vol. 112. págs. 1173-1193. 1961.
8. **Schneider M.** *Experimental epiphyseal arrest by intravenous injection of papain*. J of Bone and Joint Surg. Vol. 45-A. N° 1. págs. 25-35. 1963.
9. **Tsaltas T, Greenwald K.** *Papain induced changes in rabbit cartilage*. Clin Orthop. N° 38. págs. 170-178. 1965.
10. **Fell H, Thomas L.** *Comparison of the effects of papain and vitamin A on cartilage*. J of Exp Med. Vol. 111. págs. 719-744. 1960.
11. **Thomas L, McCluskey R.** *Comparison of the effects of papain and vitamin A on cartilage*. J of Exp Med. Vol. 111. págs. 705-712. 1960.
12. **Shaw N, Lacey E.** *The influence of corticosteroids on the normal and papain treated epiphyseal growth plate in the rabbit*. J of Bone and Joint Surg. Vol. 57-B. N° 2 págs. 228-233. 1975.
13. **Merkow L, Lalich J.** *Skeletal changes in suckling rats induced by prolonged papain administration*. J of Bone and Joint Surg. Vol. 43-A. N° 5. págs. 679-686. 1961.
14. **Garvin P, Jennings R.** *Chymopapain: a pharmacologic and toxicologic evaluation in experimental animals*. Clin Orthop. N° 41. págs. 204-223. 1965.
15. **Garvin P, Jennings R.** *Enzimatic digestion of the nucleus pulposus: A review of experimental studies with chymopapain*. Orthop Clin of North Am. Vol. 8. N° 1. págs. 27-35. 1977.
16. **Stern I.** *Biochemistry of chymopapain*. Clin Orthop. N° 67. págs. 42-51. 1969.
17. **Kitchel S, Brown M.** *Complications of chemonucleolysis*. Clin. Orthop. N° 284. págs. 63-74. 1992.
18. **Jabbay G.** *Chemonucleolysis*. Clin Orthop. N° 206. págs. 24-31. 1986.
19. **Nordby E, Wrigth Peter.** *Safety of chemonucleolysis*. Clin Orthop. N° 293. págs. 122-134. 1993.
20. **Seinsheimer F, Sledge C.** *Parameters of longitudinal growth rate in rabbit epiphyseal growth plates*. J of Bone and Joint Surg. Vol. 63-A. N° 4. págs. 627-630. 1981.
21. **Benoist M, Boneville J.** *A randomized, double blind study to compare low dose with standard dose of chymopapain in the treatment of herniated lumbar intervertebral discs*. Spine. Vol. 18. N° 1. págs. 28-34. 1993.
22. **Dando P, Jenner J.** *Low dose, low volume chemonucleolysis. A biochemical study*. Spine. Vol. 17. N° 1. págs. 56-58. 1992.
23. **Kiester D, Williams J.** *The dose related effect of intradiscal chymopapain on rabbit intervertebral discs*. Spine. Vol. 19. N° 7. págs. 747-751. 1994.
24. **Canale S. T., Russell T. A., Holcomb R.** *Percutaneous epiphysiodesis: Experimental study and preliminary clinical results*. Journal of Ped Orthop. Vol. 6. N° 2. págs. 150-156. 1986.