



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFFECTO DE LA IMPLANTACIÓN DE MEMBRANA DE
CÁSCARA DE HUEVO EN LA REGENERACIÓN DE HUESOS
LARGOS

ADENS ALEXANDRA GONZÁLEZ CHIA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: MARÍA SOLEDAD FERNÁNDEZ GARAY

PROYECTO FONDAP 11980002

**SANTIAGO, CHILE
2007**



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFFECTO DE LA IMPLANTACIÓN DE MEMBRANA DE
CÁSCARA DE HUEVO EN LA REGENERACIÓN DE HUESOS
LARGOS

ADENS ALEXANDRA GONZÁLEZ CHIA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

Nota final: _____

		Nota	Firma
PROFESOR GUÍA	: M ^a SOLEDAD FERNÁNDEZ GARAY	-----	-----
PROFESOR CONSEJERO	: JOSÉ LUIS ARIAS BAUTISTA	-----	-----
PROFESOR CONSEJERO	: DANIEL SAEZ VIDALES	-----	-----

SANTIAGO, CHILE
2007

A mis padres.....

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis padres, Hugo y Antonieta, por su incondicional e infinito amor, comprensión, valores y confianza entregados desde siempre. A toda mi familia y novio Denis, gracias por su cariño, apoyo y buenos consejos.

Agradezco en forma especial a mi profesora guía M. Soledad Fernández y al Dr. J. Ignacio Arias por su permanente colaboración durante todo el proceso final de mi formación. Al Dr. Carlos González y Dr. Daniel Sáez, por su tiempo y cooperación.

A mis compañeros y amigos Daniela y Felipe, por los inolvidables y grandes momentos vividos durante los cinco años en nuestra facultad.

A Dios, por poner en mi camino tanta gente especial y rodearme de éxitos y felicidad.

Y a todos los que de alguna manera me ayudaron y participaron en este proceso de convertirme en profesional, ser médica veterinaria.

Muchas gracias.....

ÍNDICE

	Página
Resumen	I
Summary	II
Introducción	1
Revisión Bibliográfica	3
Hipótesis	11
Objetivo General	11
Objetivos Específicos	11
Material y Métodos	12
<u>Material</u>	12
A. Membranas de cáscaras de huevos de gallina	12
B. Animales	12
<u>Métodos</u>	13
A. Procedimiento de implante de membranas	13
B. Análisis descriptivo o cualitativo	14
Resultados	19
<u>Histológicos</u>	19
A. Prueba de membranas <i>in vivo</i> en subcutáneo de ratas	19
B. Prueba de membranas <i>in vivo</i> en osteotomía de ulna de conejos	32
<u>Imagenológicos</u>	45
<u>Microscopía de fluorescencia</u>	54
Discusión	61
Conclusiones	66
Bibliografía	67

RESUMEN

El tejido óseo está constituido por células especializadas, matriz orgánica y fase mineral. Es dinámico ya que está en constante renovación y es uno de los pocos tejidos del organismo capaz de regenerar tras una lesión.

Por otro lado, existen patologías óseas como el *Radius curvus* y la displasia de cadera, entre otras, en cuyos tratamientos se requiere realizar una ostectomía, es decir, retirar un trozo de hueso con el fin de retardar la regeneración ósea. Pero, estos tienen la desventaja de ser muy invasivos, convirtiéndose en procedimientos agresivos, aumentando las posibilidades de infección, inflamación, dolor y lenta recuperación del paciente.

Con la finalidad de evitar el uso de este método y mejorar las técnicas quirúrgicas actualmente utilizadas para solucionar estas patologías osteoarticulares, se utilizó la membrana de cáscara de huevo de gallina como material inhibidor de la regeneración ósea. La membrana de cáscara de huevo está constituida por colágeno tipo I, V y principalmente por colágeno tipo X, al cual se le atribuye el rol inhibidor de la mineralización.

Los resultados de las evaluaciones de los implantes de membrana de cáscara de huevo tanto en tejido subcutáneo como hueso ulnar, indican que la membrana implantada no es reabsorbida ni presenta respuesta a cuerpo extraño hasta por lo menos la octava semana. La reacción inflamatoria y la fibrosis se van incrementando con el transcurso de las semanas hasta producirse reacción de rechazo ya alcanzada la décimo sexta semana. Se observó escasa o nula neoformación ósea en las muestras implantadas.

Se sugiere que la membrana de cáscara de huevo es capaz de inhibir la regeneración ósea.

SUMMARY

The bone tissue is constituted so much by specialized cells, organic matrix and mineral phase. It is dynamic since it is in constant renovation and it is one of the few tissues of the organism which is able to regenerate after an injury.

On the other hand, bone pathologies exist, like the *Radius curvus* and the hip dysplasia, among others, where it is required to carry out an ostectomy, that is to say, to retire a bone piece to avoid or slow down bone regeneration. But these treatments have the disadvantage of being very invasive, since they may become aggressive procedures, increasing the possibilities of infection, inflammation, pain and slow recovery of the patient.

In order to avoid the use of this method and improve the surgical techniques used currently to solve those osteoarticular pathologies, the inner eggshell membrane is used as an inhibiting material for bone regeneration. The eggshell membrane is constituted by type I, V, and mainly by type X collagen, which is attributed the inhibiting roll of the mineralization.

The results of the evaluations of the eggshell membrane implants in subcutaneous tissue and ulnar bone, indicate that the implanted membrane is not reabsorbed and does not present foreing body response at least at the eighth week. The inflammatory reaction and the fibrosis increase with the course of the weeks until a complete rejection is observed at the sixteenth week. New bone formation was not observed in the implanted samples. It is suggested that the eggshell membrane is able to inhibit bone regeneration.

INTRODUCCIÓN

El hueso es uno de los pocos tejidos capaz de regenerarse, es así como naturalmente y en forma constante va formando nuevo tejido óseo que luego es remodelado, esto producto de las numerosas microfracturas que van ocurriendo con el movimiento y el ejercicio. Pero, en ciertos casos patológicos, como fracturas producidas por traumas, se hace necesaria la intervención médica. Esto ha llevado a la ingeniería de los materiales a desarrollar numerosos e innovadores productos biocompatibles para la realización de implantes y nuevos métodos enfocados a favorecer la regeneración ósea en patologías osteoarticulares tanto en humanos como en animales.

Sin embargo, existen ciertas patologías óseas como la displasia de cadera y *Radius curvus*, entre otras, en las cuales como parte de su tratamiento se requiere realizar una ostectomía, es decir, retirar un trozo de hueso y así evitar o retardar la regeneración ósea. Un ejemplo de esto lo constituye la ostectomía de cabeza y cuello femoral para los casos de displasia de cadera, con el fin de lograr una pseudoartrosis al permitir que el espacio articular sea ocupado por tejido fibroso. Y en el caso del *Radius curvus*, la ostectomía ulnar para desestresar y proporcionar libertad de crecimiento al radio y permitir que éste vuelva a su aplomo normal.

Pero esta técnica tiene la desventaja de ser muy invasiva, ya que requiere de la intervención de otros sitios del organismo, removiendo tejidos para interponer entre los cabos óseos. Por lo tanto, es un procedimiento agresivo, que aumenta las posibilidades de infección, inflamación, dolor y un tiempo más prolongado para la recuperación.

Para evitar el uso de este método, se requiere contar con un material que impida o retarde la regeneración ósea y que sea reabsorbible a mediano o largo plazo, sin la necesidad de una ostectomía.

Es así como la membrana de cáscara de huevo se convierte en un interesante y prometedor biomaterial para ser usada con estos fines, ya que posee muchas ventajas, entre ellas, ser muy disponible, biocompatible y ser un material de desecho, obteniéndose a bajo costo. Además, se ha evidenciado que el colágeno tipo X presente en la membrana de cáscara de huevo, es capaz de inhibir la mineralización, formando áreas protegidas del depósito mineral y por lo tanto actuaría impidiendo la regeneración ósea.

El conocimiento del rol de la membrana de cáscara de huevo en la regeneración ósea y tejidos adyacentes, nos podría permitir proponer una metodología innovadora, eficiente y menos invasiva, de posible aplicación, para tratar aquellas patologías ortopédicas que requieran el retardo de la regeneración ósea.

Por los antecedentes anteriormente expuestos y, dada la importancia de los potenciales beneficios de este biomaterial, parece interesante saber que efectos tiene la membrana de cáscara de huevo en la regeneración de huesos largos y en el tejido subcutáneo, en un modelo animal como el conejo y la rata, para así en el futuro poder incluso introducir esta técnica en otras especies animales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. Su unidad estructural es la osteona y está formado por células especializadas, matriz orgánica y fase mineral. Entre las células óseas, podemos decir que coexisten varios tipos celulares, como células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. La matriz orgánica o sustancia osteoide está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90%), sobre todo tipo I (>95%), tipo V (<5%) y pequeñas proporciones de colágeno tipo III y tipo XII, como también otras proteínas no colágenas, como proteoglicanos y glicoproteínas, entre otras. El componente mineral del hueso está formado por calcio, fosfato y carbonato en forma de pequeños cristales de hidroxapatita, y en menor proporción otros minerales (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006).

El hueso es un tejido dinámico en equilibrio, ya que está en constante formación y reabsorción permitiendo su renovación en condiciones normales (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006). Además, es uno de los tres tejidos del organismo capaz de regenerarse tras una lesión (Caplan, 1990), es decir, la formación de hueso nuevo que, tras un proceso de remodelado, sea idéntico al preexistente (Behn, 1993); a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial, con características diferentes al original (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006; Dasso *et al.*, 1998).

Básicamente, la curación de una fractura comprende tres etapas, la primera es una fase inflamatoria, luego una reparativa y por último la fase de remodelación (Cruess y Dumont, 1985).

Ocurrido un trauma o fractura, se forma un coágulo que interrumpe la nutrición de los osteocitos, produciéndose la muerte de los mismos. El daño del tejido adyacente, periostio y o médula, da lugar a la fase inflamatoria, con la consecuente vasodilatación, exudación de plasma, edema en la región de la fractura e invasión de células inflamatorias, como polimorfonucleares y macrófagos. Pronto se inicia la fase reparativa, en la cual el hematoma se organiza y se forma tanto cartílago como hueso primario en el subperiostio. El hematoma inmoviliza la fractura, permitiendo la actividad de células reparativas que son de origen mesenquimal pluripotenciales, y a través de señales moleculares se promueve la

diferenciación de ellas hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un nuevo tejido fibrovascular, que reemplazará al coágulo inicial. El ambiente alrededor de la fractura es ácido, pero el pH se vuelve paulatinamente neutro y finalmente alcalino. El periostio forma inmediatamente hueso, con la participación de células mesenquimales. Las células reparativas y brotes capilares entran a la zona de fractura. El origen de los vasos puede ser desde el periostio como desde los lugares sobrevivientes. Luego se forma el callo, que está constituido por tejido fibroso, cartilaginoso y hueso inmaduro, otorgando a la zona mayor estabilidad. Posteriormente se inicia el ingreso de osteoblastos. El inicio de la aparición de mineral ocurre por la interacción de calcio, fósforo y aminoácidos específicos. El resultado son fibras de colágeno organizadas sobre las cuales se depositan cristales de hidroxiapatita. La inmovilización es cada vez mayor. La fase de remodelación, es prolongada, y está comandada por la reabsorción osteoclástica, dejando un trabeculado que luego es invadido por osteoblastos (Cruess y Dumont, 1985).

Histológicamente, durante la fase de regeneración ósea luego de ocurrida una fractura, es posible observar formación de neo hueso en forma de islotes que luego son removidos y reemplazados por hueso definitivo mediante remodelación osteoclástica (Gartner *et al.*, 2002).

Radiográficamente es posible observar la regeneración ósea a través de placas, pudiendo evidenciar la formación de callo óseo primario, aumento de la radiodensidad ósea en el sitio de la lesión y continuidad de las corticales diafisarias (Morgan y Leighton, 1995).

La curación de una fractura, está influenciada tanto por factores locales como sistémicos. Dentro de los primeros, se encuentra el grado del trauma local, y la zona afectada. Dentro de los factores sistémicos podemos nombrar, la edad del paciente, los efectos hormonales, el ejercicio y estrés local, el grado de pérdida de hueso, el tipo de hueso comprometido, el grado de inmovilización, infecciones, malignidad local, entre otras (Cruess y Dumont, 1985).

En ciertos casos, como fracturas producto de un trauma, se hace necesaria su intervención médica. Esto ha llevado al desarrollo de la ingeniería de los materiales a introducir el empleo de numerosos e innovadores productos para la realización de implantes

e injertos y nuevos métodos enfocados a favorecer la regeneración ósea, pero todos ellos son relativamente caros. Debido a esto, los investigadores han enfocado sus esfuerzos en el desarrollo de nuevos materiales biocompatibles de origen animal (Durmus *et al.*, 2003; Pérez, 1993). La biocompatibilidad es la habilidad que tiene un material, injerto o dispositivo, de conducir a una respuesta apropiada por parte del receptor. Se debe determinar que no presente daños potenciales, para esto resulta necesario conocer sus componentes y realizar una serie de pruebas (Anderson y Schoen, 2004).

Un ejemplo de métodos favorecedores de la regeneración ósea lo constituye la técnica de regeneración de hueso en forma guiada (RHG). Esta técnica, primero descrita por Nyman *et al.*, (1982), consiste en favorecer la regeneración ósea usando un sustrato para ello y una membrana que actúe como barrera a través de la inhibición de la infiltración de tejidos blandos, ya que la presión que éstos ejercen sobre el hueso es la mayor complicación para una eficiente regeneración ósea. Este estudio fue realizado en defectos craneales en conejos, cuyos defectos fueron rellenados con polvo de cáscara de huevo de avestruz como sustrato para dicha regeneración y luego aplicada la membrana de cáscara de huevo como barrera o frontera. Así, la membrana de cáscara de huevo ayudaría a que los tejidos blandos no interfieran en el proceso de regeneración de los defectos, obteniéndose resultados satisfactorios. Además, se evidenció que la membrana de cáscara de huevo de avestruz posee la mayoría de las propiedades físicas requeridas para RHG. Entre ellas está la rigidez, que es fundamental en el éxito de la regeneración, otorga mínimo efecto de cuerpo extraño y su tratamiento con glutaraldehído al 2,5% aumenta la unión y mejora la rigidez, disminuyendo la degradación e inflamación, mientras que el tratamiento enzimático tiene los efectos contrarios (Durmus *et al.*, 2003).

La cáscara del huevo posee muchas ventajas, como por ejemplo, ser cortada fácilmente, de fácil esterilización sin que se produzcan alteraciones biológicas, ser muy disponible y biocompatible como sustituto de hueso (Dupoirieux, 1999).

También se han usado membranas no bioabsorbibles como la membrana de titanio y de politetrafluoroetileno (e-PTFE), pero requieren de una segunda etapa quirúrgica. Es por esto que se prefieren las membranas bioabsorbibles (colágeno, cartílago, membrana y cáscara de huevo, entre otras), aunque éstas también pueden causar problemas dependiendo de su origen. Por ejemplo, el uso de membranas de colágeno puede dar como resultado

alguna reacción inflamatoria o inmunológica dependiendo de las proteínas constitutivas, pero, es poco probable ya que el colágeno posee baja inmunogenicidad. Se debe evitar el uso de membranas biológicas de origen bovino por el riesgo de transmisión de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB). Tejidos de otras especies animales pueden ser la solución ya que esto no se ha visto en las aves, por eso el uso de cáscara de huevo y su membrana como material bioabsorbible ha sido usada en investigación (Durmus *et al.*, 2003).

Las principales características que debe tener una membrana para una adecuada recuperación es ser rígida debido a que su rol fundamental es mantener el espacio para que el coágulo de sangre sea progresivamente reemplazado por hueso, además la membrana debe ser oclusiva para prevenir interposición de tejido fibroso que interfiera con las células osteogénicas (Dupoirieux *et al.*, 2001).

Al comparar la eficiencia de tres tipos de membranas para RHG, entre ellas una no reabsorbible de politetrafluoroetileno (PTFE), otra reabsorbible de poliglactina y de colágeno de membranas hidrolizadas de cáscara de huevo de gallina, los mejores efectos se obtuvieron con la no reabsorbible a pesar de que requiere de una segunda cirugía. Los resultados obtenidos con la membrana de colágeno desde membranas hidrolizadas de cáscaras de huevos aviares, no fueron satisfactorios para RHG, ya que se evidenció mínima regeneración ósea (Dupoirieux *et al.*, 2001).

Se han usado diferentes materiales para la realización de implantes como sustituto óseo, entre ellos, los no reabsorbibles como el titanio y el PTFE citados anteriormente, pero se prefieren los materiales compósitos bioabsorbibles que consisten en la mezcla de un fosfato cálcico (hidroxiapatita) con algún polímero absorbible como el quitosano, colágeno hidrolizado, polilactonas o ácido poliglicólico. El quitosano que es un polisacárido biodegradable y semicristalino, resultado del tratamiento de la quitina, obtenida del exoesqueleto de crustáceos marinos, también ha sido probado en animales y se ha encontrado que es altamente biocompatible y que es un prometedor biomaterial, ya que es un acelerador de la curación de heridas, otorga mínimo efecto inflamatorio, estimula la normal angiogénesis, posee alto grado de incorporación y presenta estabilidad por lo menos de tres meses en implantes *in vivo* (Vande Vord *et al.*, 2002).

Los implantes no reabsorbibles pueden impedir la recuperación normal en el sitio de implantación, más aun si son materiales porosos. Por otro lado, los materiales densos son menos propensos a la reabsorción en comparación que los porosos. Pero la falta de porosidad previene la invasión de red fibrovascular la que puede anclar el implante hacia el tejido bajo él (Dupoirieux, 1999).

Al probar nuevos injertos o dispositivos, se hace necesario considerar la magnitud del defecto a utilizar, entre otros aspectos. Como ejemplo, se ha establecido que al realizar cortes de seis milímetros de ancho en hueso craneano en ratas e injertarlos con membrana de cáscara de huevo de gallina, se obtiene mínima regeneración ósea. En este caso, el tamaño del defecto utilizado es crítico, ya que no recupera espontáneamente en la vida del animal y el hueso calvario es selectivo para la regeneración ósea, debido a la baja irrigación y a la estructura, lo que impide la recuperación natural. Por lo tanto, los resultados de este estudio no son consistentes (Dupoirieux *et al.*, 2001).

Por otra parte, existen ciertas patologías óseas como el *Radius curvus* y la displasia de cadera, entre otras, en las cuales como parte de su tratamiento se requiere realizar una osteotomía, es decir, retirar un trozo de hueso y así evitar o retardar la regeneración ósea. A continuación se explicará la génesis, desarrollo y tratamiento del *Radius curvus*. (Degner, 2004; Newton, 1985; Schepler y Kennel, 2004).

En condiciones normales, el crecimiento longitudinal de los huesos largos en perros, está comandado por las placas de crecimiento situadas en los extremos de las diáfisis de los huesos que se encuentran en animales menores de un año. La mayor parte del crecimiento ocurre entre los cuatro y ocho meses de edad y generalmente al año las placas de crecimiento se cierran, no son visibles en radiografías y por lo tanto el animal cesa su crecimiento. La placas de crecimiento son mucho más propensas a lesiones que otras partes del hueso (Degner, 2004). La placa de crecimiento distal ulnar, es cónica y crece más activamente que la del radio (Newton, 1985).

Bajo condiciones fisiológicas, las placas de crecimiento distales, tanto de la ulna como del radio, son responsables de aproximadamente el 80% de su crecimiento, por lo tanto si cualquiera de ellas es afectada por un trauma, detendrán su crecimiento (Milovancev y Ralphs, 2004).

La mayoría de las alteraciones de las placas de crecimiento ulnares distales, son originadas por un trauma. Si un trauma afecta sólo a la ulna en un animal a temprana edad, la placa de crecimiento ulnar distal cerrará, cesará su crecimiento y no crecerá a su longitud apropiada, sin embargo, el radio continuará haciéndolo. Este crecimiento desigual puede forzar al radio a arquearse. Esta es la patología llamada *Radius curvus*, deformidad angular del miembro o encierro prematuro ulnar, que es una de las patologías más comunes radio-ulnares. El animal llevará el peso hacia el miembro afectado, provocando dolor, incongruencia del codo y cojera. Esto da como resultado un carpo torcido (Degner, 2004; Newton, 1985; Schepler y Kennel, 2004).

La deformidad comienza con el acortamiento ulnar, debido a su retardado crecimiento, el radio se arquea cráneo medialmente, forzando al miembro a desviarse lateralmente. El radio comienza a rotar externamente y con ello se produce la rotación externa de la mano. La ulna acortada comienza a subluxarse. Cuanto más temprano ocurra el cierre de la epífisis distal de la ulna, mayor será la deformidad (Newton, 1985).

El diagnóstico definitivo requiere de radiografía, exploración con TAC, o resonancia magnética (Schepler y Kennel, 2004).

La severidad de la desviación y la técnica usada para la corrección de ella, dependen de la lesión y de la edad del animal. Cuando se reconoce en un animal inmaduro, aún con potencial crecimiento, el tratamiento es profiláctico, es decir minimizar la deformidad mientras madura, esto puede llevar a múltiples cirugías. Si se trata de un animal viejo y se reconoce el problema, éste puede ser totalmente corregido. Pero si se espera que el animal madure sin ninguna corrección, puede llevar a subluxación o luxación del codo o carpo (Newton, 1985).

El tratamiento temprano puede conservar la articulación normal del codo y reducir al mínimo la curvatura del radio. La sección ulnar es la medida más eficaz y por lo tanto la más usada. El tratamiento quirúrgico establece realizar una ostectomía de ulna de 5mm a 1cm aproximadamente para desestresar al conjunto radio-ulna e impedir que se produzca regeneración de la ulna permitiendo de esta manera que el radio pueda crecer en forma normal quitando la restricción que hace la ulna sobre él (Newton, 1985).

Si el perro aún esta en crecimiento y el carpo no se ha torcido más de 25°, entonces se secciona la ulna para que el miembro crezca derecho. Pero, si el perro ya detuvo su

crecimiento, tanto el radio como la ulna se deben seccionar; adicionalmente debe usarse un fijador circular para mantener los huesos alineados y así tener mayores posibilidades de corrección (Degner, 2004). Sin embargo, el cuidado postoperatorio y la recuperación son difíciles y muy prolongados (Schepler y Kennel, 2004).

Por lo general, los tratamientos que actualmente se practican para solucionar aquellas patologías óseas en las cuales se requiere retardar o evitar la regeneración, tienen la desventaja de ser muy invasivas ya que se requiere de la intervención de otros sitios del organismo removiendo tejidos, pudiendo ser tejido muscular o adiposo, para interponer entre los cabos ostectomizados (Preston *et al.*, 2001). Por lo tanto se convierte en un procedimiento agresivo, aumentando las posibilidades de infección, con la consecuente respuesta inflamatoria, dolor y lenta recuperación del paciente (Newton, 1985; Schepler y Kennel, 2004).

Para evitar el uso de este método, se requiere contar con un material que impida o retarde la regeneración ósea y que sea reabsorbible a mediano o largo plazo, sin la necesidad de una ostectomía. Es así como la membrana de cáscara de huevo se ha convertido en un buen candidato para ser usada con estos fines, ya que posee la ventaja de ser biocompatible y bioabsorbible, además de tener alta disponibilidad y ser un material de desecho por lo que se obtiene a bajo costo (Dupoirieux, 1999).

La membrana de cáscara de huevo está constituida por colágeno tipo I, V y principalmente por colágeno tipo X, además, algo de queratan sulfato (Arias *et al.*, 1991 a y b). La membrana de cáscara de huevo de gallina no se calcifica naturalmente, pero es la base de la mineralización dirigida para la formación de la cáscara. Así, el carbonato de calcio se deposita en las mamilas de la parte externa de la membrana. Si bien es cierto, la membrana no mineraliza, posee el control para la formación de la cáscara. Esto último se demuestra al poner una membrana de cáscara de huevo sobre una concha de caracol rota y se evidencia que mineraliza de acuerdo a una cáscara de huevo y no a una concha de caracol (Meenakshi *et al.*, 1974).

El rol del colágeno tipo X en la mineralización experimental de membranas de cáscaras de huevo de gallina también ha sido estudiada. Se postula que el colágeno X ejerce un importante control de las últimas etapas de la formación endocondral de hueso, pero el mecanismo propiamente tal se desconoce. Los resultados del cultivo de células

osteogénicas de calvaria de embrión de pollo sobre membrana de cáscara de huevo de gallina, indican que los dominios no helicoidales del colágeno X de las membranas de cáscaras de huevo son capaces de inhibir la mineralización y así formar fronteras de áreas protegidas del depósito mineral. Sin embargo, estos dominios son susceptibles de ser removidos a través de tratamiento enzimático con pepsina y entonces poder llevar a cabo la mineralización (Arias *et al.*, 1997).

HIPÓTESIS

Considerando que el colágeno X presente en la membrana de cáscara de huevo, inhibe su mineralización, así como la mineralización mediada por células osteogénicas, su interposición experimental en la ulna osteotomizada debería inhibir la regeneración ósea.

OBJETIVO GENERAL

- Demostrar que la membrana de cáscara de huevo inhibe la regeneración ósea y determinar posibles procesos inflamatorios.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Probar la respuesta inflamatoria a membrana de cáscara de huevo en el tejido subcutáneo a diferentes tiempos.
- Probar el rol inhibitor del colágeno X, presente en la membrana de la cáscara del huevo, en la regeneración ósea a distintos tiempos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

A. Membranas de cáscaras de huevos de gallina

La preparación de las membranas se llevó a cabo bajo cámara de flujo laminar, donde 24 huevos de gallina fueron vaciados y lavados, llenados con ácido acético al 1%, dejando actuar por 10 minutos para luego extraer las membranas de las cáscaras de huevos, las cuales fueron lavadas, secadas y cortadas de un tamaño de 2x2cm aproximadamente. Posteriormente, las membranas se colocaron en bolsas de esterilización individuales y fueron expuestas a Óxido de Etileno por 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente se dejaron aireando por 72 horas.

B. Animales

- Ratas:

Se utilizaron 10 ratas *Ratus ratus* (Sprague-Dawley), machos, de 200 a 300 g, divididas en 5 grupos de 2 individuos cada uno, fueron evaluadas en pares las semanas 1, 2, 4, 8 y 16 post implante. Se mantuvieron en jaulas en grupos de 2 individuos y se alimentaron con pellet y agua de bebida *ad libitum*.

Las ratas se usaron siguiendo la norma ISO 10993, que protocoliza la evaluación biológica de dispositivos médicos.

- Conejos:

Se utilizaron 10 conejos *Oryctolagus cuniculus* (Blanco Neocelandés), machos, entre 3 a 5 meses de edad, de 3,0 a 3,5 kg, divididos en 5 grupos de 2 individuos cada uno, fueron evaluados en pares las semanas 1, 2, 4, 8 y 16 post implante. Además, se utilizó otro individuo representando el tiempo 0. Se mantuvieron en jaulas individuales y se alimentaron con pellet y agua de bebida *ad libitum*.

Se usó este modelo animal, debido al tamaño del defecto óseo a realizar en cada una de las ulnas.

Métodos

A. Procedimiento de implante de membranas

- Pruebas de membranas *in vivo* en subcutáneo de ratas:

Se trabajó bajo protocolo anestésico mediante Ketamina-Diazepam en dosis de 75mg/kg y 5mg/kg i.p. respectivamente (Cutter, 2004). Se depiló el sitio de incisión y desinfectó con Clorhexidina 0,5%. Se realizaron 4 incisiones sagitales de 1cm sobre el lomo, formando bolsillos subcutáneos mediante debridación roma. En 2 de los bolsillos se colocaron las membranas tratadas, fijándolas mediante sutura de nylon 4/0, para posteriormente cerrar piel con el nylon mencionado a través de puntos simples discontinuos (experimental). Los 2 bolsillos restantes fueron cerrados sin membrana en el subcutáneo (control).

- Pruebas de membranas *in vivo* en osteotomía de ulna de conejos:

Se trabajó bajo protocolo anestésico general, que consistió en la sedación con una asociación de acepromacina (Acedan)-Atropina en dosis de 0,05mg/kg y 0,01mg/kg i.m. respectivamente, para luego inducir y mantener anestesia inhalatoria mediante Isoflurano (Cutter, 2004). Se depiló la zona de la diáfisis del segmento radio-ulnar derecho e izquierdo y desinfectó con Clorhexidina 0,5%. Se realizó una incisión longitudinal de 3cm tanto en piel como en el tejido muscular hasta llegar a hueso. En seguida, se realizó una osteotomía total transversal en una de las ulnas de cada conejo con sierra oscilatoria de 0,5mm de grosor y se interpuso la membrana de cáscara de huevo previamente tratada, fijándola al periostio mediante sutura de nylon 4/0 (experimental). En la otra ulna, se realizó el mismo procedimiento, pero no se interpuso nada entre los cabos osteotomizados (control). Posteriormente, se procedió a suturar tanto tejido muscular como subcutáneo con sutura reabsorbible de ácido poliglicólico 4/0 con punto simple discontinuo, para luego cerrar piel con nylon 4/0 con el mismo punto. La selección de la ulna a implantar (izquierda o derecha) se realizó en forma aleatoria. Como manejo post operatorio, cada conejo recibió ketoprofeno (Ketofen 1%) en dosis de 1mg/kg i.m. durante 3 días, esto para aliviar el dolor e inflamación. Además los conejos fueron inyectados con oxitetraciclina (Oxilen 20%) en dosis de 25mg/kg i.m. partiendo el día 0 (día de la cirugía) y luego cada 7 días hasta su eutanasia (Frisch *et al.*, 1998).

B. Análisis descriptivo o cualitativo

- Evaluación histológica:

I. Subcutáneo

Se realizó eutanasia de los pares de ratas en las semanas 1, 2, 4, 8 y 16 post implante, mediante una cámara saturada de anhídrido carbónico (CO₂) y luego inyectados con una solución de Cloruro de Potasio al 20% vía intra-cardiaca.

Se tomaron muestras de los bolsillos subcutáneos del lomo de cada rata. Las muestras fueron fijadas en formalina 10% durante aproximadamente una semana, luego lavadas por dos días. Posteriormente se procesaron bajo técnica histológica de rutina. Para esto se deshidrataron gradualmente con alcohol en concentración ascendente, para luego ponerlas en xilol, enseguida se realizó la inclusión en parafina quedando bloques aptos para su corte de 5µm de espesor siendo posteriormente pegados en un portaobjeto. A continuación se realizó el proceso inverso, pasando las muestras primero por xilol, alcohol y agua, para finalmente teñirlas, tanto con Hematoxilina Eosina (H-E) como con Mallory (M).

Así las muestras fueron analizadas bajo microscopio para determinar posibles procesos inflamatorios, neoformación ósea o cartilaginosa, reabsorción o integridad de la membrana, vascularización o posible fibrosis de la zona intervenida.

Para esto se digitalizaron las imágenes correspondientes en aumentos 4x, 10x, 20x y 40x con una resolución de 512 x 480 pixeles, mediante una videocámara digital (Cool Snap-Pro CF, Media Cybernetic, USA) montada en un microscopio óptico científico (Nikon Eclipse E-600) y conectada a una computadora con un software morfométrico (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA).

Se describieron y cuantificaron los cambios inflamatorios considerando la intensidad de la inflamación a través del grado de infiltración celular del sector comprometido, midiendo el área infiltrada en µm² en aumento de 10x en las muestras teñidas con H-E (figuras 1a y 1b). Esta medición fue realizada a través del software antes mencionado, que permite seleccionar un tipo celular y darles un color (rojo) que permite medir el área ocupada por ellas.

En el caso de la fibrosis, se midió la severidad o grado según el grosor de la capa fibrótica expresada en µm, alrededor de la membrana de cáscara de huevo implantada y en

el caso del control, el grosor de la capa fibrótica en la zona debridada, en aumentos de 10x en muestras teñidas con M (figura 2). Esta medición también fue realizada a través del software morfométrico.

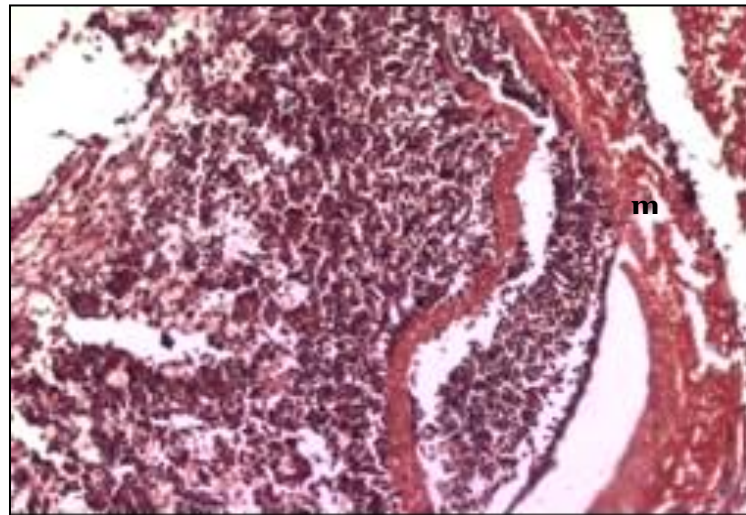


Figura 1a. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante de membrana de cáscara de huevo (m). Proceso inflamatorio (i) alrededor del implante. Hematoxilina-Eosina, 10x.

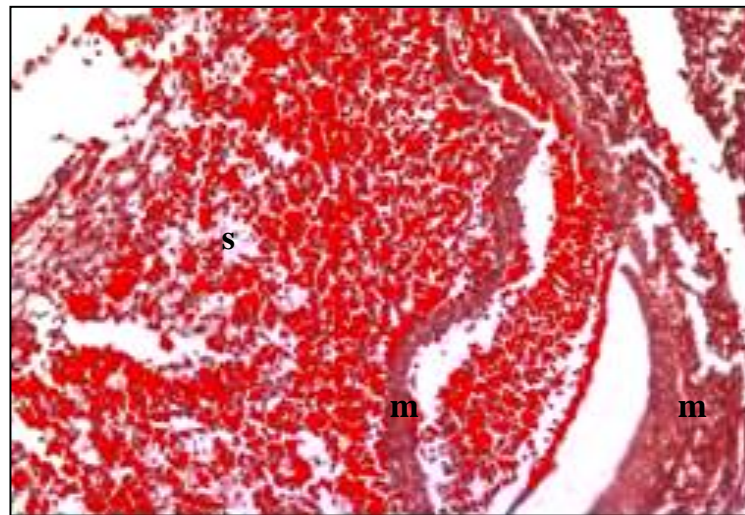


Figura 1b. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante de membrana de cáscara de huevo (m). Área conformada por células inflamatorias teñidas de color rojo con software morfométrico (s). Hematoxilina-Eosina, 10x.

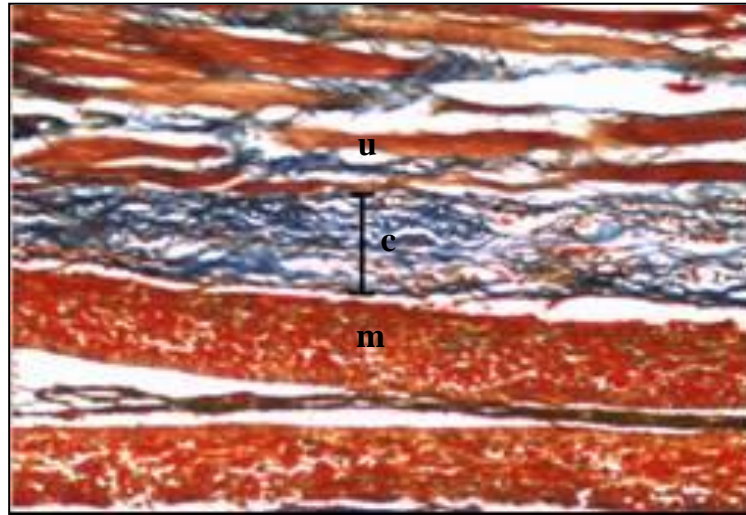


Figura 2. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante de membrana de cáscara de huevo (m). Medición del grosor de la fibrosis (c) entre el tejido muscular (u) y el implante de membrana con software morfométrico. Mallory, 10x.

II. Ulnares

Se realizó eutanasia de los pares de conejos en las semanas 1, 2, 4, 8 y 16 post implante, mediante inducción anestésica (Isoflurano) y luego se inyectaron con una solución de cloruro de potasio al 20% vía e.v. Además se consideró un individuo para el tiempo cero de la osteotomía y tiempo cero sin osteotomía.

Se extrajeron las ulnas de cada conejo, para ser cada una dividida en dos partes iguales a través de un corte sagital. Una de las mitades constituye una muestra histológica, la cual fue fijada en una solución de formalina 10% aproximadamente por una semana, para su posterior lavado por dos días. Luego se descalcificaron con ácido fórmico 10% por diez días, y finalmente fueron lavadas durante cuatro días para ser procesadas bajo técnica histológica de rutina de forma similar a lo realizado con el tejido subcutáneo de ratas. Fueron cortadas en forma longitudinal en cortes de 5 μ m de espesor y teñidas con Mallory. Así las muestras de ulnas fueron analizadas bajo microscopio, para evidenciar la presencia o ausencia de neoformación ósea y continuidad de cabos osteotomizados en cada una de las muestras, tanto en las muestras experimentales como en las controles.

Se digitalizaron las imágenes correspondientes en aumentos 4x, dado el tamaño de las preparaciones, con una resolución de 512 x 480 pixeles, mediante una videocámara

digital (Cool Snap-Pro CF, Media Cybernetic, USA) montada en un microscopio óptico científico (Nikon Eclipse E-600). Además, se fotografiaron con una cámara digital (Nikon Coolpix 5200), directamente desde el lente del microscopio en aumentos 4x, 10x y 40x.

- Evaluación imagenológica:

Se tomaron radiografías del segmento radio-ulnar izquierdo y derecho de cada conejo, las semanas 1, 2, 4, 8 y 16 post implante, para determinar la presencia o ausencia de continuidad de corticales diafisarias o unión de cabos, reacción periosteal y/o endosteal, línea de fractura, remodelación ósea y evaluación de tejidos blandos. Además se radiografió el tiempo cero de la osteotomía y el tiempo cero sin osteotomía. La técnica radiográfica fue de 46 kiloVolts, 100 miliAmperes y 0,12 segundos de tiempo de disparo.

Las radiografías fueron observadas en negatoscopio y fotografiadas con una cámara digital (Nikon Coolpix 5200).

- Evaluación por Microscopía de Fluorescencia:

La otra mitad de la ulna, fue sometida a un fijador rápido, ALFAC, compuesto por 5ml de formol 100%, 5ml de ácido acético 100% y 100ml de alcohol etílico 100%, por una semana aproximadamente. Posteriormente fueron deshidratadas en alcohol 100% por dos días. En seguida, cada mitad ulnar fue colocada en un tubo Eppendorf de 2ml para ser impregnadas en Lowicryl puro por 48 horas a 4° C, realizando dos cambios. Posteriormente las muestras se incubaron durante 7 días a 4° C en una nueva mezcla de Lowicryl. Se realizó la inclusión en Lowicryl nuevo que se polimerizó por 24 horas a temperatura ambiente con luz UV.

Cada mitad de ulna incluida en el molde de Lowicryl ya polimerizado fueron sacadas de cada Eppendorf y puestas en moldes de silicona envaselinados para ser rodeadas con acrílico dental transparente autocurable Marche (Félix Martín y Cía. Ltda.). Se dejó polimerizar durante diez minutos, para luego ser cortadas longitudinalmente en cortes de 1mm de espesor con cuchilla de diamante en una cortadora Isomet (Buehler), luego pegadas a un portaobjeto con Eukitt (O. Kindler GmbH y Co.) para su posterior desgaste con lija de agua de grano 400, 600 y 1200, Norton. Se analizaron por microscopía de fluorescencia. En este último proceso se evidenció si hubo o no regeneración o

neoformación ósea, ya que la tetraciclina inyectada semanalmente desde el primer día de cirugía, se fija a los tejidos en fase de calcificación bajo la forma química del complejo cálcico llamado quelato, de gran estabilidad, y fluorescente al ser observada con luz UV (Izarbe y Ortiz, 1995).

Se digitalizaron las imágenes con una cámara digital (Nikon Coolpix 5200), directamente desde el lente del microscopio de fluorescencia en aumento 4x y 10x.

RESULTADOS

Resultados Histológicos

A. Prueba de membranas *in vivo* en subcutáneo de ratas

Al implantar la membrana de cáscara de huevo en el subcutáneo de rata, se observó a la semana una inflamación crónica con predominio de linfocitos y macrófagos, escasos mastocitos y células gigantes (figura 3). Por su parte, la membrana de cáscara de huevo (m) se encontró encapsulada por diez capas de fibroblastos (f), se observó angiogénesis (a) y fibroplasia que corresponde a una fase inicial de fibrosis (figura 4). Esto corresponde a una intensidad de inflamación de $109,23 \mu\text{m}^2$ y una magnitud de fibrosis de $34,68 \mu\text{m}$.

Por otra parte, el control al cual no se le implantó membrana de cáscara de huevo, presentó una inflamación crónica mayor con la presencia de algunos linfocitos, macrófagos y polimorfos, y algunas fibras musculares condensadas y en degeneración (d) (figura 5). La capa muscular intervenida presenta un proceso de cicatrización con reemplazo de fibras musculares por fibras colágenas (c), con pérdida de la continuidad normal del músculo cutáneo. Se observó el tejido conectivo desplazado por fibroplasia (fibroblastos organizados), iniciándose la fase reparativa y activación de fibroblastos (núcleos de fibroblastos redondos) (figura 6). Esto corresponde a una intensidad de inflamación de $262,07 \mu\text{m}^2$ y una magnitud de fibrosis de $73,84 \mu\text{m}$.

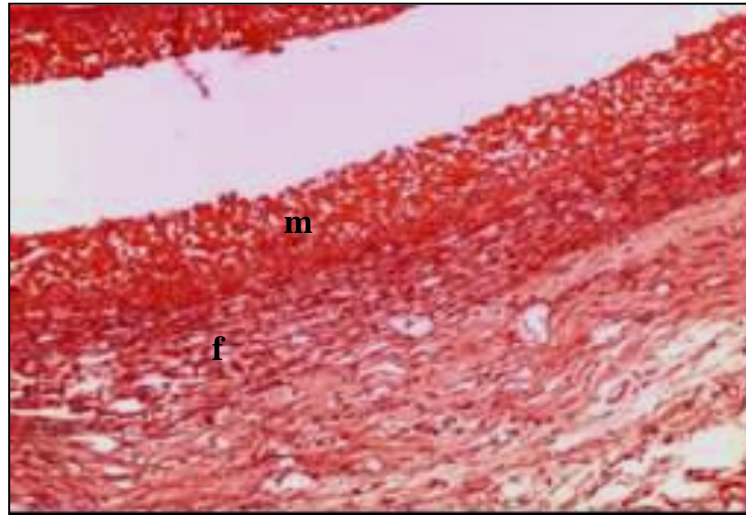


Figura 3. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (experimental) 1ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) rodeada de capas de fibroblastos (f). Hematoxilina-Eosina, 10x.

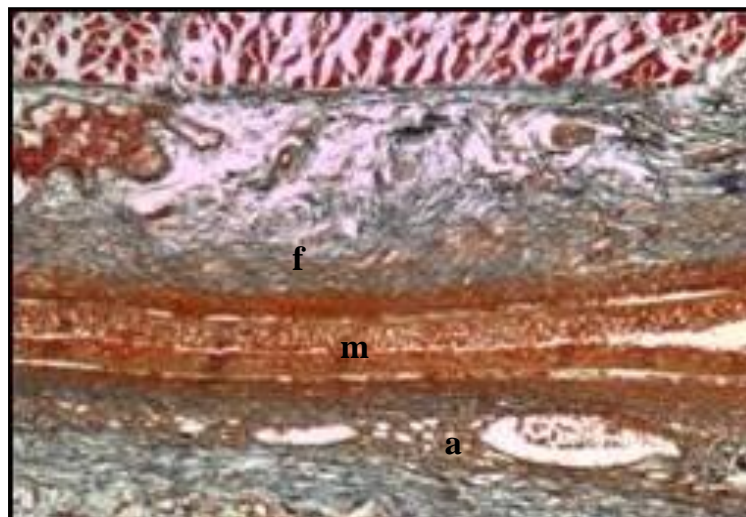


Figura 4. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (experimental) 1ª semana post quirúrgica. Se observa implante de membrana de cáscara de huevo (m), fibroblastos (f) y angiogénesis (a). Mallory, 4x.

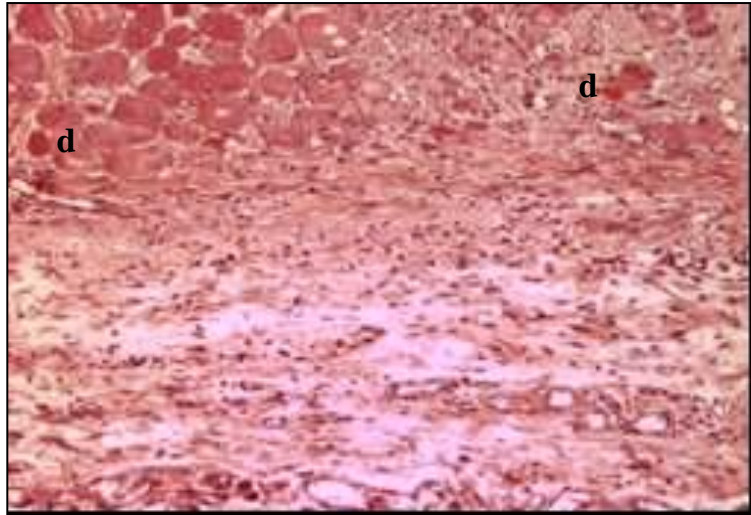


Figura 5. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata sin implante (control) 1ª semana post quirúrgica. Presencia de fibras musculares condensadas en degeneración (d). Hematoxilina-Eosina, 10x.

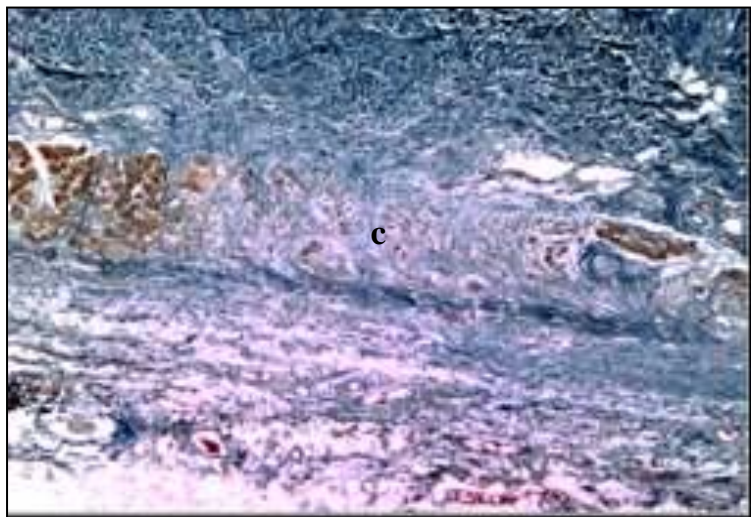


Figura 6. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata sin implante (control) 1ª semana post quirúrgica. Se observan fibras colágenas (c) reemplazando tejido muscular. Mallory, 4x.

En la segunda semana posterior a la implantación de la membrana, se observaron células leucocitarias y escasa presencia de células gigantes debiéndose a una inflamación crónica. El implante de membrana de cáscara de huevo (m) se encontró intacto y dispuesto en capas (figura 7), rodeado de tejido conectivo colagenoso (c), pero con menor cantidad de fibroblastos (más fibrótico que fibroplásico), estando frente a un proceso fibrótico establecido, por lo tanto, podemos decir que los fibroblastos demoran aproximadamente una semana en producir su colágeno (figura 8). Esto corresponde a una intensidad de inflamación de $126,55 \mu\text{m}^2$ y una magnitud de fibrosis de $51,32 \mu\text{m}$.

Por su parte, el control durante la segunda semana post cirugía se mostró con un mayor infiltrado de células inflamatorias que su par experimental, también se pudo notar la presencia de algunos macrófagos (figura 9). Se observaron fibras colágenas (c) en la zona muscular intervenida correspondiendo a un proceso reparativo ya instaurado (figura 10). Esto corresponde a una intensidad de inflamación de $204,99 \mu\text{m}^2$ y una magnitud de fibrosis de $41,61 \mu\text{m}$.

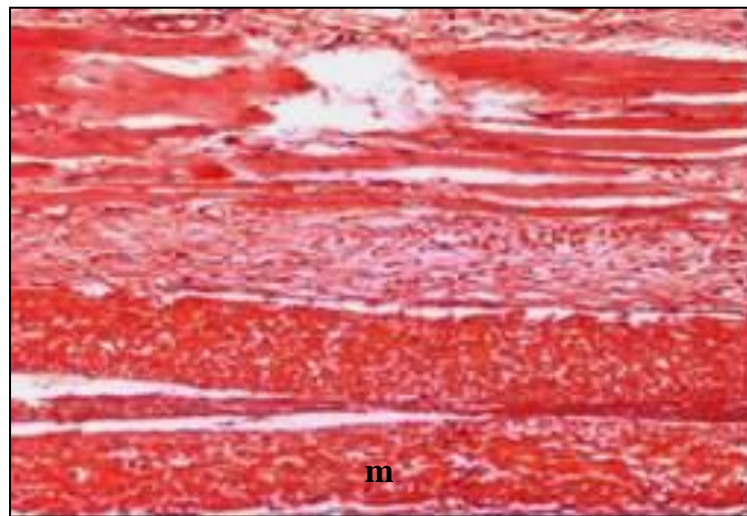


Figura 7. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (experimental) 2ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) dispuesta en capas. Hematoxilina-Eosina, 10x.

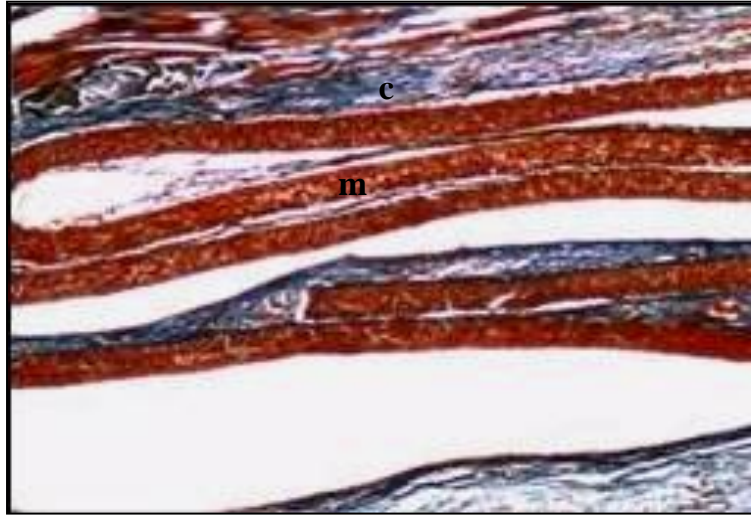


Figura 8. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (experimental) 2ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) dispuesta en capas rodeada de abundante tejido colagenoso (c). Mallory, 4x.

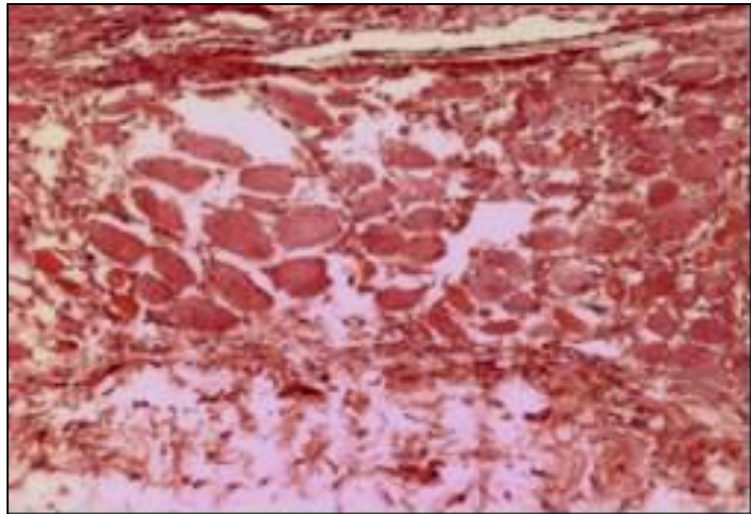


Figura 9. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata sin implante (control) 2ª semana post quirúrgica. Hematoxilina-Eosina, 10x.



Figura 10. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata sin implante (control) 2ª semana post quirúrgica. Se observa fibrosis (c) en la zona intervenida. Mallory, 4x.

Ya alcanzada la cuarta semana post implante, se encontró un considerable aumento en el número total de células infiltradas con respecto a las semanas anteriores, con predominio de linfocitos, macrófagos y un leve aumento de la cantidad de células gigantes. El implante de membrana de cáscara de huevo se observó íntegro en toda su extensión (figura 11). Además, se observó tejido colagenoso muy denso (c) en la zona intervenida y en la membrana implantada, separándola en sus capas interna y externa (m). Las fibras colágenas infiltradas pueden diferenciarse de las fibras colágenas propias de la membrana de cáscara de huevo por el color azul al ser teñidas con Mallory y su disposición sin un orden determinado (figura 12). Esto corresponde a una intensidad de inflamación de $3285,53 \mu\text{m}^2$ y una magnitud de fibrosis de $45,09 \mu\text{m}$.

Por otra parte, en el control se evidenció poca cantidad de células inflamatorias observándose algunos macrófagos y abundantes vasos sanguíneos (a) (figura 13). Se notó la presencia de fibras colágenas (c) estableciéndose la fibrosis en la zona muscular intervenida, correspondiendo a un proceso reparativo instalado. También fue posible observar angiogénesis y fibroplasia (figura 14). Esto corresponde a una intensidad de inflamación de $250,53 \mu\text{m}^2$ y una magnitud de fibrosis de $27,88 \mu\text{m}$.

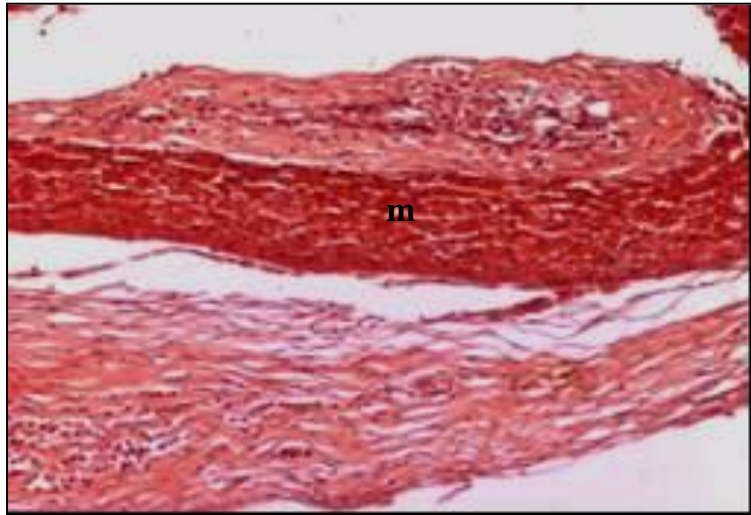


Figura 11. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (experimental) 4ª semana post quirúrgico. Se observa implante de membrana de cáscara de huevo (m). Hematoxilina-Eosina, 10x.

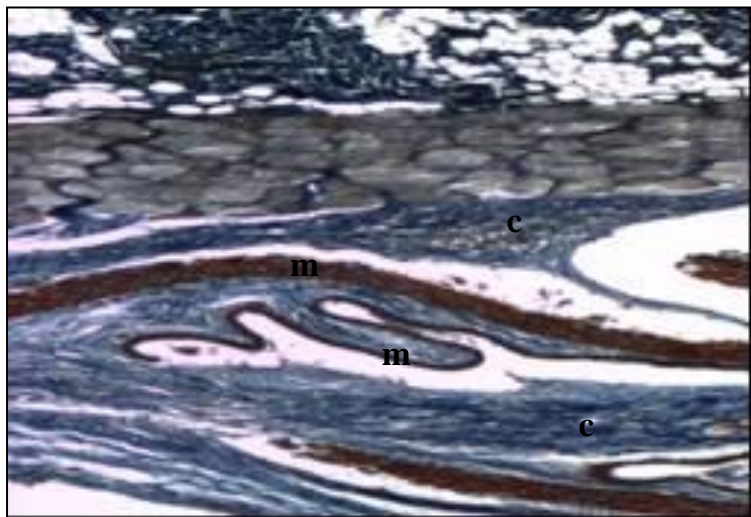


Figura 12. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (experimental) 4ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo separada en sus capas interna y externa. Se observa gran cantidad de tejido colagenoso (c) denso. Mallory, 4x.

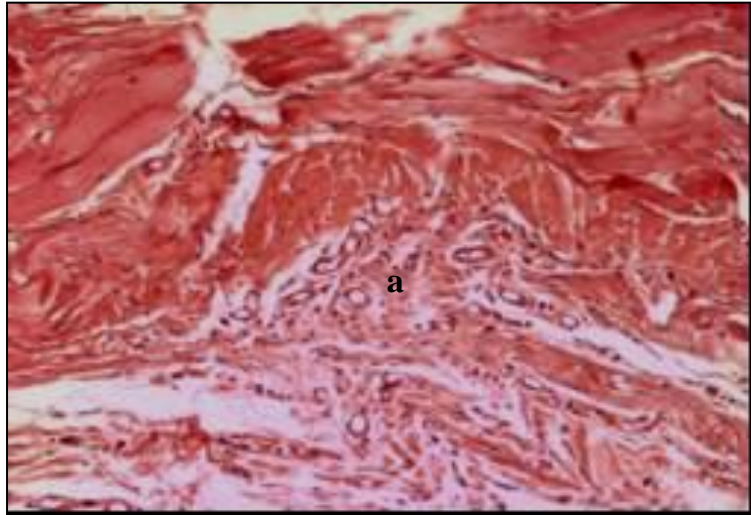


Figura 13. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata sin implante (control) 4^a semana post quirúrgica. Se observan abundantes vasos sanguíneos (a) en la región intervenida. Hematoxilina-Eosina, 10x.

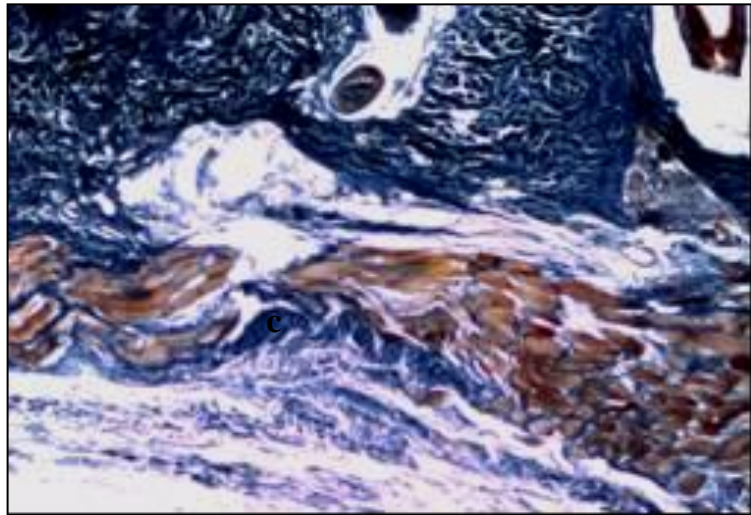


Figura 14. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata sin implante (control) 4^a semana post quirúrgica. Aumento de fibras colágenas (c) alrededor del tejido muscular interrumpido. Mallory, 4x.

En la semana ocho post implante, se encontró una disminución en la cantidad total de células infiltradas (i) en comparación a la cuarta semana posterior a la implantación de la membrana, entre ellas se pudieron distinguir células gigantes, linfocitos, macrófagos y plasmocitos, ubicadas entre las capas de la membrana de cáscara de huevo (m) (figura 15). Se observó la presencia de pigmentos hemosiderínicos y fibras colágenas (c) dentro y fuera del implante (figura 16). Esto corresponde a una intensidad de inflamación de $1815,49 \mu\text{m}^2$ y una magnitud de fibrosis de $32,83 \mu\text{m}$.

En el control se observó escasa cantidad de vasos sanguíneos y pocas células infiltradas alrededor del tejido muscular (u) y en toda el área intervenida (figura 17). Se distinguieron fibras colágenas muy densas (c) en zona muscular reparada, evidenciando un proceso fibrótico (figura 18). Esto corresponde a una intensidad de inflamación de $235,14 \mu\text{m}^2$ y a una magnitud de fibrosis de $5,11 \mu\text{m}$.

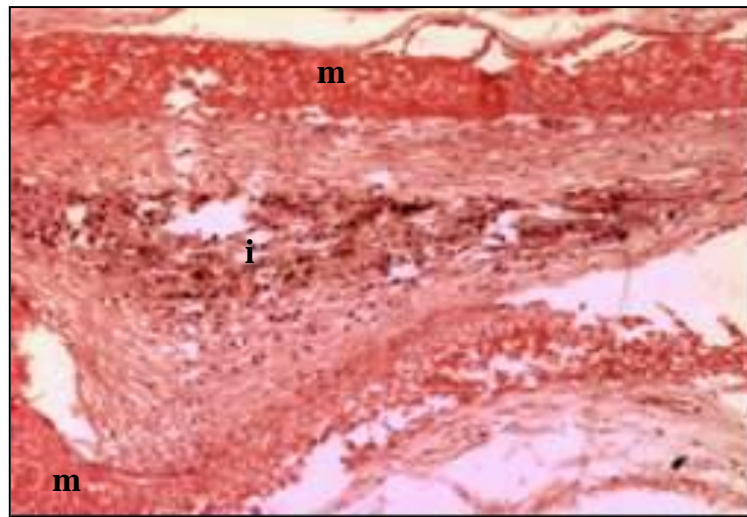


Figura 15. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (experimental) 8ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) y aumento en la cantidad de células infiltradas (i). Hematoxilina-Eosina, 10x.

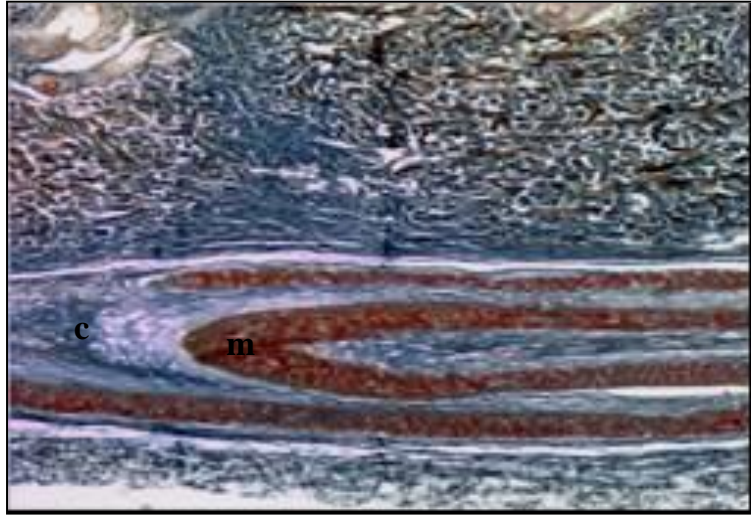


Figura 16. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (experimental) 8ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) y aumento de la fibrosis (c). Mallory, 4x.

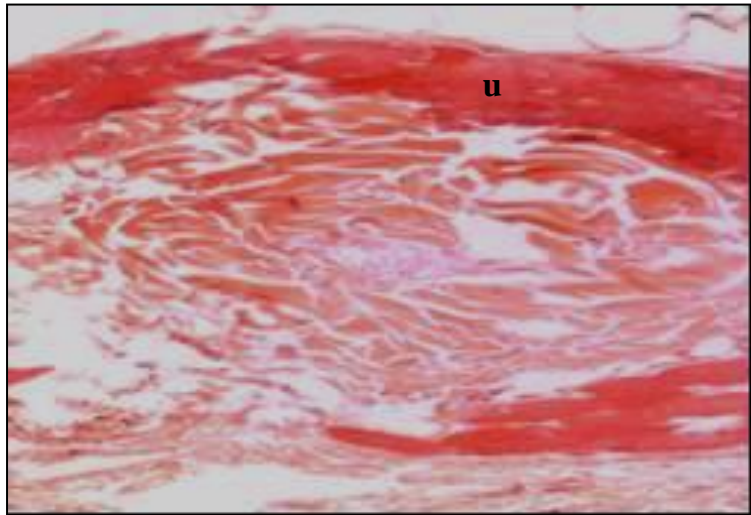


Figura 17. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata sin implante (control) 8ª semana post quirúrgica. Escasa cantidad tanto de vasos sanguíneos como de células alrededor del tejido muscular (u). Hematoxilina-Eosina, 10x.

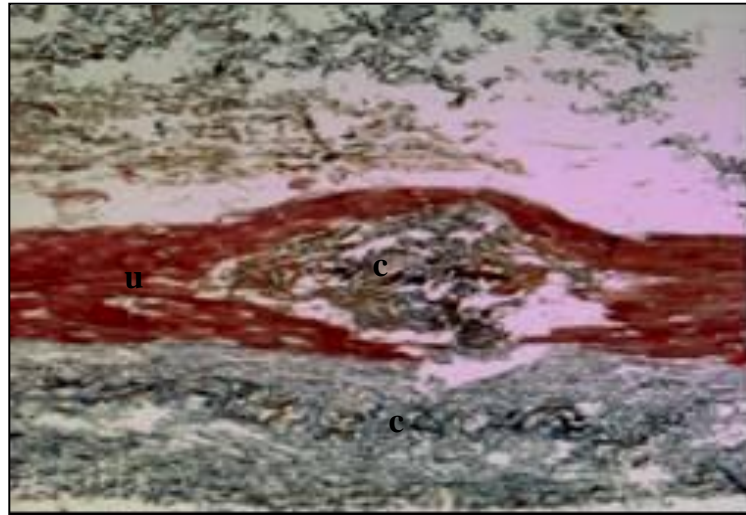


Figura 18. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata sin implante (control) 8ª semana post quirúrgica. Abundantes y densas fibras colágenas (c) en zona muscular (u) reparada, proceso fibrótico establecido. Mallory, 4x.

En la décimo sexta semana post implante, se encontró un considerable aumento en el número total de células presentes, destacando la participación de linfocitos y plasmocitos. Por su parte, el implante de membrana de cáscara de huevo (m) aún se observa íntegro, pero se ha iniciado la degradación de sus fibras colágenas. Se observó la presencia de células gigantes alrededor y dentro de la membrana de cáscara de huevo provocando, al parecer, una reacción de rechazo hacia el implante (figura 19). Se encontró poco tejido fibrótico alrededor y entre las capas de la membrana (c) (figura 20). Esto corresponde a una intensidad de inflamación de $5396,86 \mu\text{m}^2$ y una magnitud de fibrosis de $13,03 \mu\text{m}$.

En esta semana, en el control se observó una inflamación crónica con un número de células infiltradas mayor con respecto a los controles de las semanas anteriores y se distinguió la presencia de células musculares picnóticas (células con núcleos centrales) (p) (figura 21). Se advirtió reparación epitelial, fibras musculares continuas y degeneradas (d), estranguladas por el tejido cicatricial; lo anterior se debió a una reparación por primera intención (r) (figura 22). Esto corresponde a una intensidad de inflamación de $478,19 \mu\text{m}^2$ y a una magnitud de fibrosis de $24,83 \mu\text{m}$.

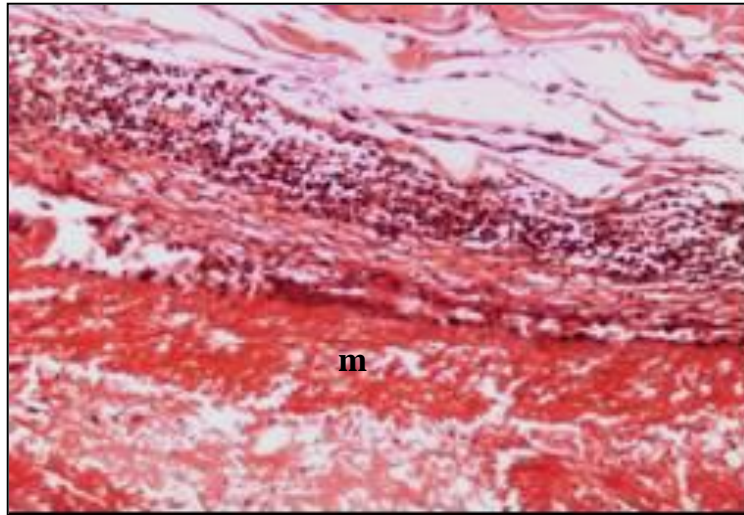


Figura 19. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (experimental) 16ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) ya iniciada la degradación de sus fibras colágenas. Hematoxilina-Eosina, 10x.

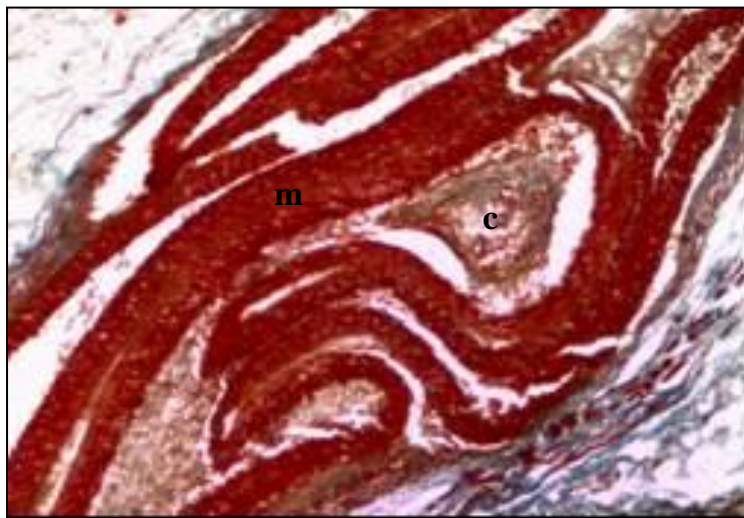


Figura 20. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (experimental) 16ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo dispuesto en capas y denso tejido fibrótico (c) entre ellas. Mallory, 4x.

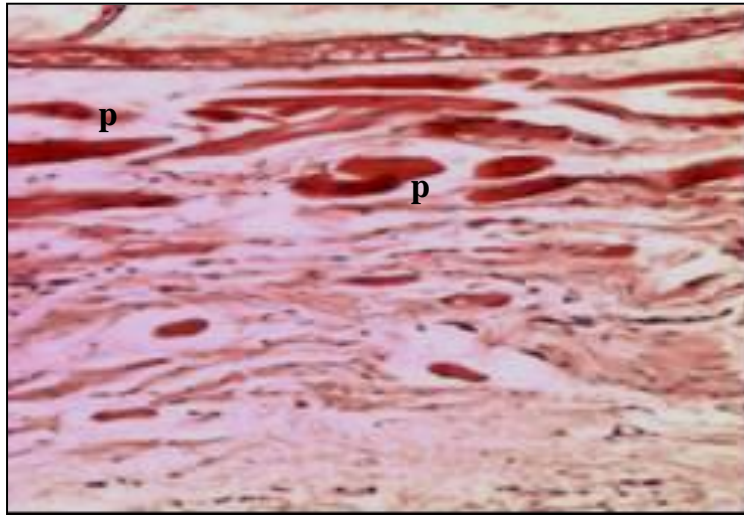


Figura 21. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata sin implante (control) 16ª semana post quirúrgica. Presencia de células musculares picnóticas (p) y mayor número de células inflamatorias. Hematoxilina-Eosina, 10x.

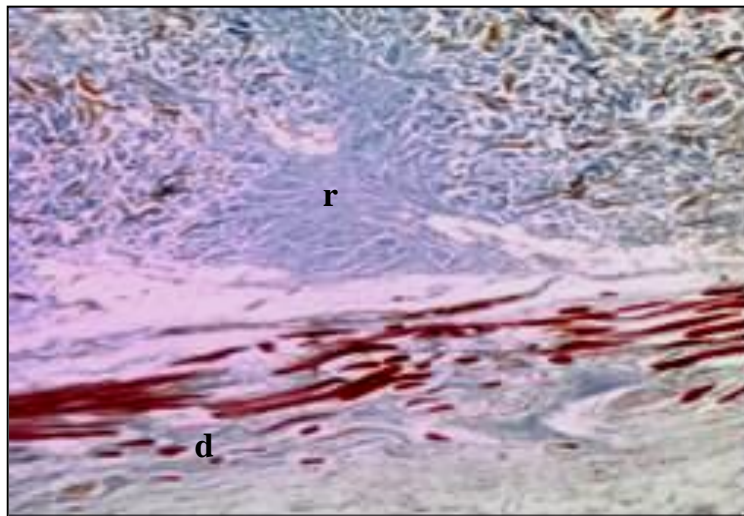


Figura 22. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata sin implante (control) 16ª semana post quirúrgica. Fibras musculares continuas y degeneradas (d), reparación por primera intención (r). Mallory, 4x.

B. Prueba de membranas *in vivo* en osteotomía de ulna de conejos

Al implantar la membrana de cáscara de huevo entre los cabos osteotomizados de ulna de conejo, la primera semana post implante se encontró la membrana (m) completa, acompañada de tejido inflamatorio (i) y bien posicionada entre los cabos (j). Se observó reacción perióstica y formación de trabéculas osteogénicas en los extremos óseos, no así en la zona intervenida. No hubo formación de cartílago (figuras 23a y 23b).

Por otra parte, el control al cual no se le interpuso entre los cabos osteotomizados membrana de cáscara de huevo como implante, presentó formación de callo primario cartilaginoso (k), observándose también trabéculas óseas (t) en el área afectada. Se evidenció fuerte actividad osteoblástica osteogénica desde el periostio produciéndose osificación tanto directa como indirecta, la formación de tejido cartilaginoso se encontró predominantemente en fase proliferativa. Además se visualizaron fenómenos vasculares como angiogénesis (figuras 24a y 24b).



Figura 23a. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo con implante (experimental) 1ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) y tejido inflamatorio (i) a su alrededor. Mallory, 4x.

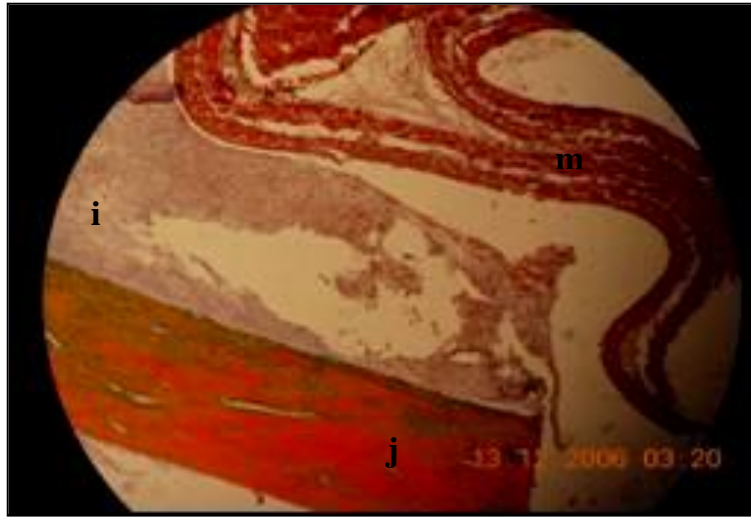


Figura 23b. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo con implante (experimental) 1ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) acompañada de tejido inflamatorio (i) ubicada entre los cabos óseos (j). Mallory, 10x.

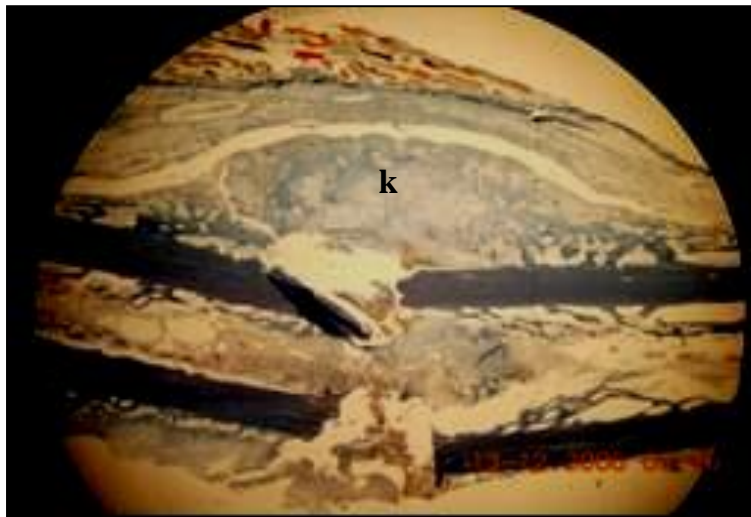


Figura 24a. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo sin implante (control) 1ª semana post quirúrgica. Formación de callo primario cartilaginoso (k). Mallory, 4x.

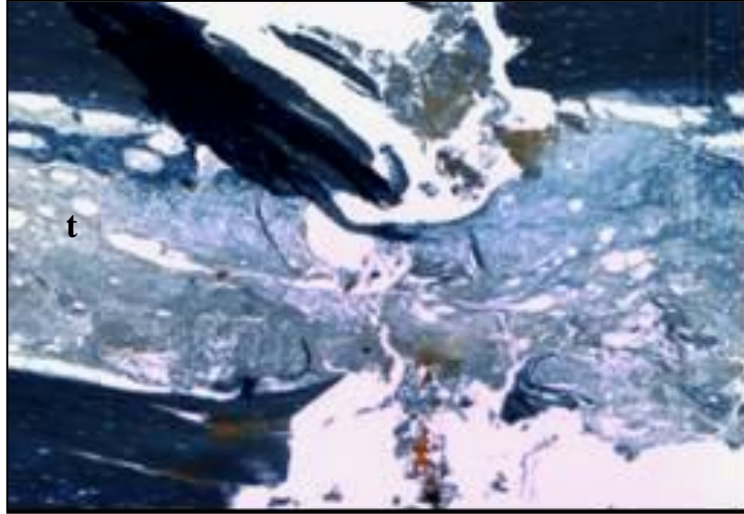


Figura 24b. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo sin implante (control) 1ª semana post quirúrgica. Trabéculas óseas en formación (t). Mallory, 40x.

En la segunda semana posterior a la implantación de la membrana de cáscara de huevo (m), ésta se observó íntegra separando los cabos óseos (j) y rodeada de tejido inflamatorio (i) similar al experimental de la semana anterior (figuras 25a y 25b). Cabe destacar, que se visualizó osteogénesis directa activa, sin formación de cartílago hacia los extremos de la zona intervenida, por lo que no se alcanza a observar en las figuras 25a y 25b.

En esta misma semana, en el control se observó osificación (o) inicial del modelo cartilaginoso, aproximación de corticales diafisarias (j) y avance del periostio cubriendo el defecto con abundante vascularización (a). Se notó la presencia de condrocitos hipertróficos y erosionados con depósito de matriz ósea (reemplazo) (figuras 26a y 26b).

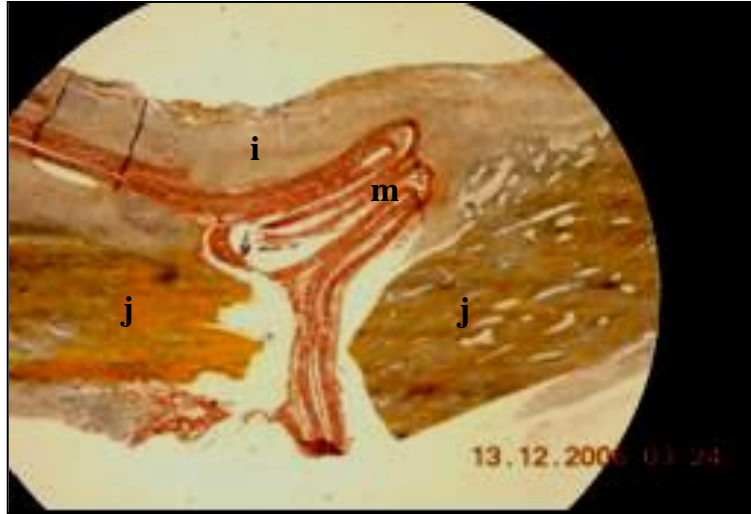


Figura 25a. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo con implante (experimental) 2ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) entre los cabos óseos (j) y tejido inflamatorio (i) a su alrededor. Mallory, 4x.

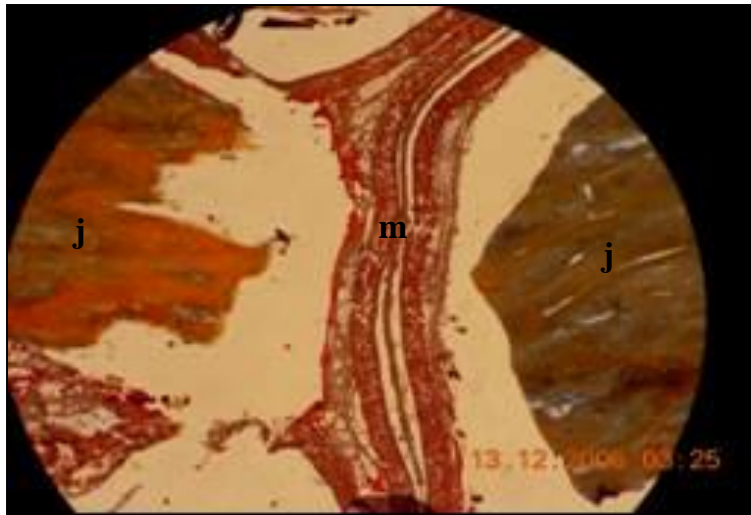


Figura 25b. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo con implante (experimental) 2ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) entre los cabos óseos (j). Mallory, 10x.

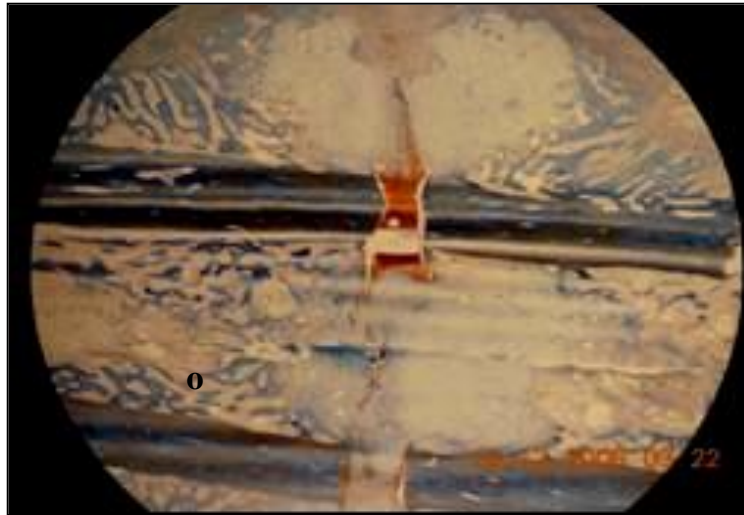


Figura 26a. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo sin implante (control) 2ª semana post quirúrgica. Inicio de osificación del modelo cartilaginoso (o). Mallory, 4x.

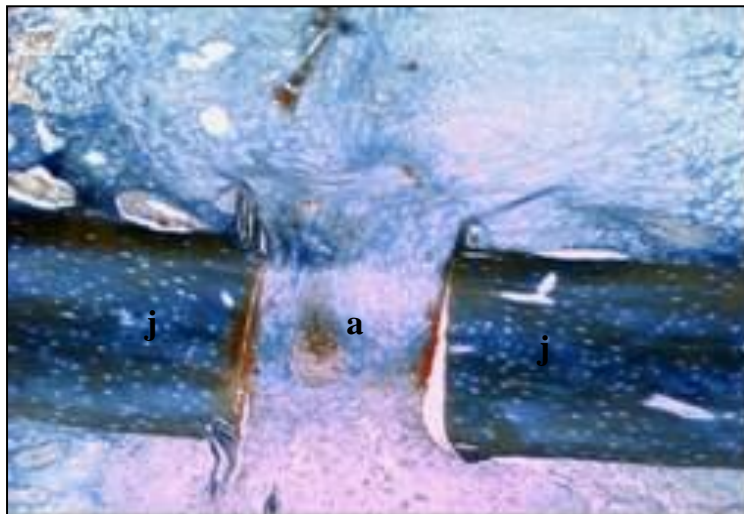


Figura 26b. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo sin implante (control) 2ª semana post quirúrgica. Se observa el defecto con abundante vascularización (a) y aproximación de corticales diafisarias (j). Mallory, 40x.

A la cuarta semana, en la muestra de ulna experimental se encontró que la membrana de cáscara de huevo (m) continuaba intacta y acompañada de tejido inflamatorio (i). Se advirtió la formación de un diminuto núcleo condroide (k) en uno de los extremos de los cabos, observándose también un proceso de osificación (o) periférico activo (figuras 27a y 27b).

En el control fue posible observar reemplazo del modelo cartilaginoso en su mayor parte por tejido óseo, pero quedando un pequeño remanente condroide (k) en la zona central. Se evidenció aproximación de las corticales (j) y continuidad medular (figuras 28a y 28b).

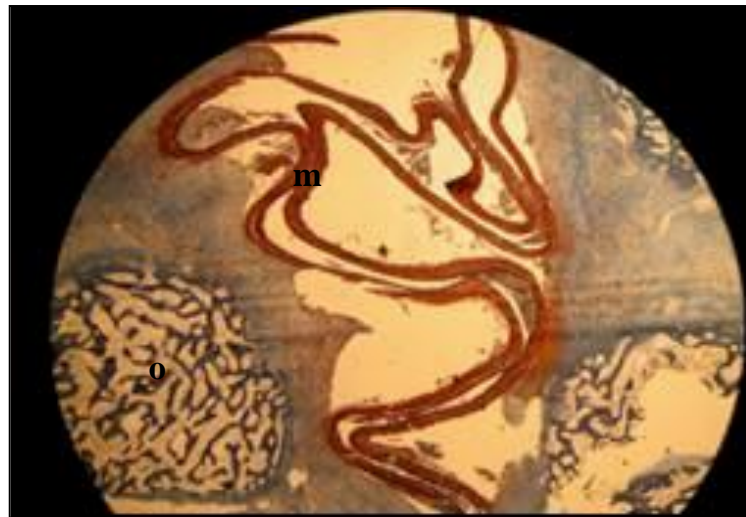


Figura 27a. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo con implante (experimental) 4ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) y osificación (o) periférica activa. Mallory, 4x.

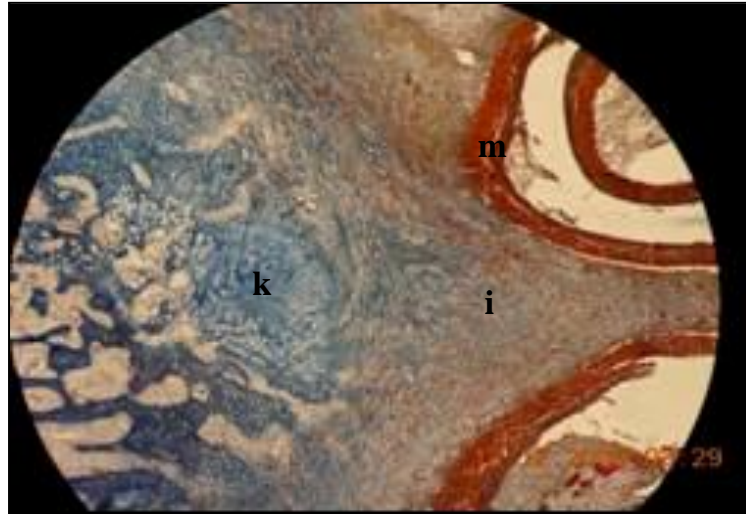


Figura 27b. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo con implante (experimental) 4ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) acompañada de tejido inflamatorio (i) y formación de pequeño núcleo condroide (k). Mallory, 10x.

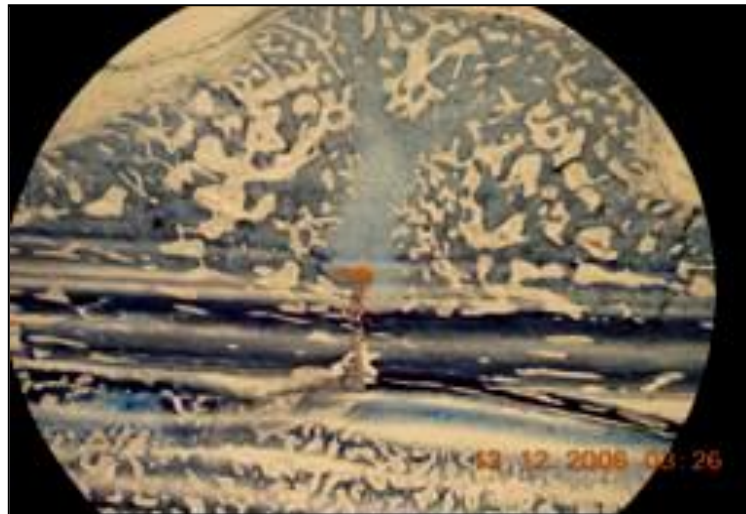


Figura 28a. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo sin implante (control) 4ª semana post quirúrgica. Mallory, 4x.

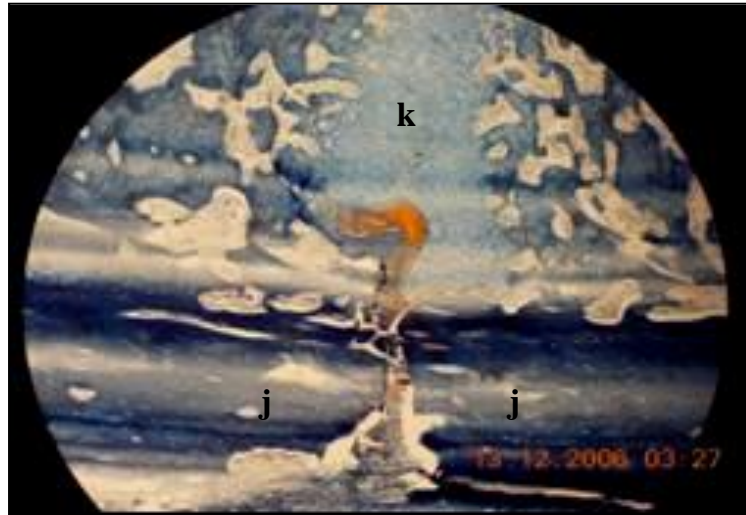


Figura 28b. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo sin implante (control) 4ª semana post quirúrgica. Remanente cartilaginoso (k) y aproximación de corticales (j). Mallory, 10x.

Entrada la octava semana luego de la implantación de la membrana de cáscara de huevo (m), ésta aún se encontraba presente, pero algo fragmentada y con mayor tejido inflamatorio (i) desorganizado a su alrededor. No se observó desarrollo de tejido cartilaginoso ni proceso de osificación directa (figuras 29a y 29b).

En esta misma etapa, la ulna sin implante al ser observada microscópicamente se distinguieron abundantes células osteogénicas (osteoblastos), además de la presencia de matriz ósea (o) principalmente (no matriz osteoide) y continuidad de corticales diafisarias (j) (figuras 30a y 30b).

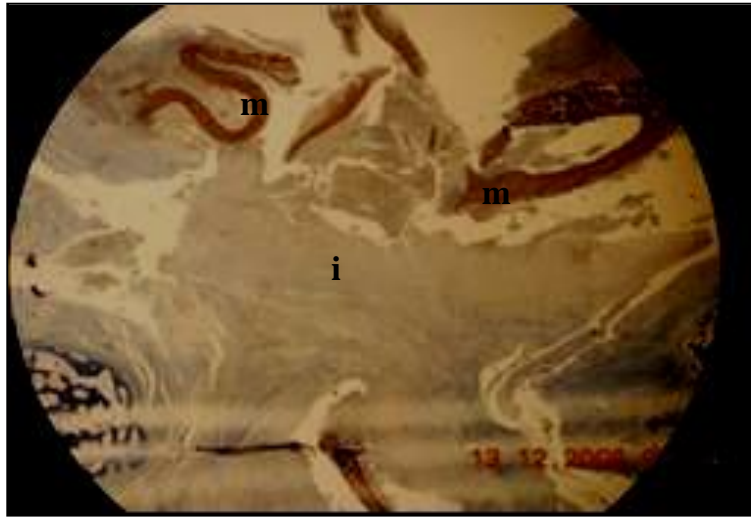


Figura 29a. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo con implante (experimental) 8ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) fragmentada y acompañada de tejido inflamatorio (i). Mallory, 4x.

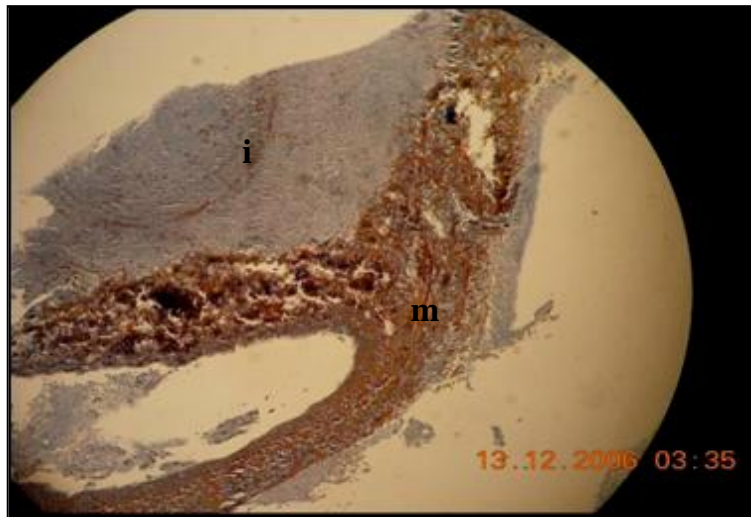


Figura 29b. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo con implante (experimental) 8ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) fragmentada y acompañada de tejido inflamatorio (i). Mallory, 10x.



Figura 30a. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo sin implante (control) 8ª semana post quirúrgica. Continuidad de corticales (j). Mallory, 4x.

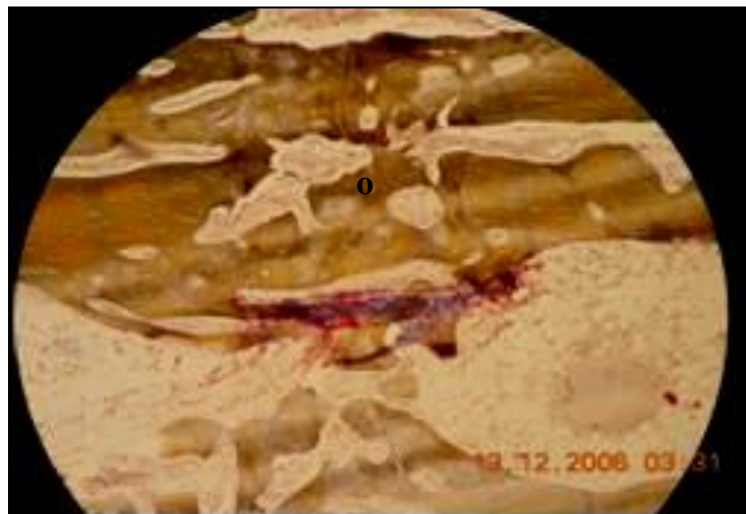


Figura 30b. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo sin implante (control) 8ª semana post quirúrgica. Presencia de matriz ósea (o). Mallory, 10x.

En la última semana de estudio, vale decir, en la décimo sexta semana post cirugía, la membrana de cáscara de huevo (m) se mantuvo en su lugar, acompañada de tejido inflamatorio necrótico y amorfo (i). El hueso (h) se mostró muy vascularizado y consolidado en sus extremos (figuras 31a y 31b).

Por su parte, el control en esta semana se observó en la fase de remodelación con la formación de la cavidad medular (e) y de hueso compacto laminillar (h) (figuras 32a y 32b).

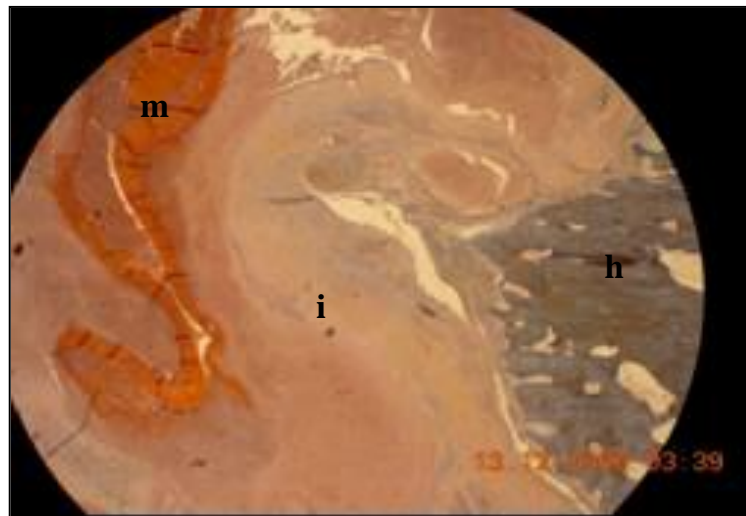


Figura 31a. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo con implante (experimental) 16ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) acompañada de tejido inflamatorio (i) y tejido óseo (h) consolidado en sus extremos. Mallory, 4x.

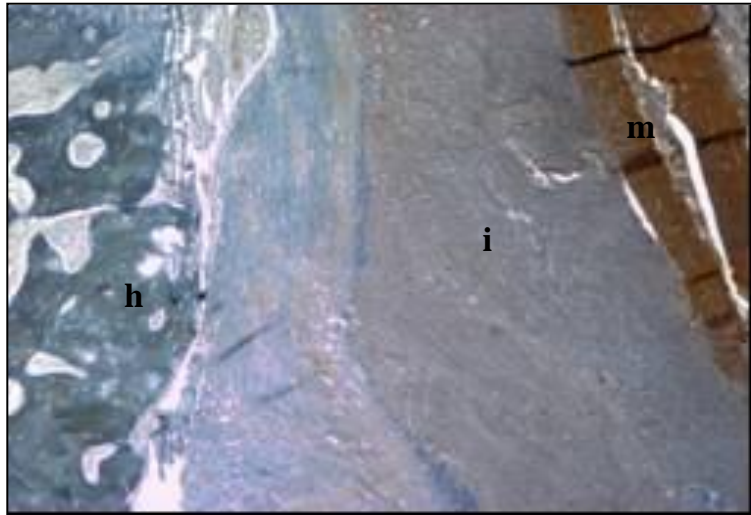


Figura 31b. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo con implante (experimental) 16^a semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) acompañada de tejido inflamatorio (i) y tejido óseo (h) consolidado en sus extremos. Mallory, 40x.

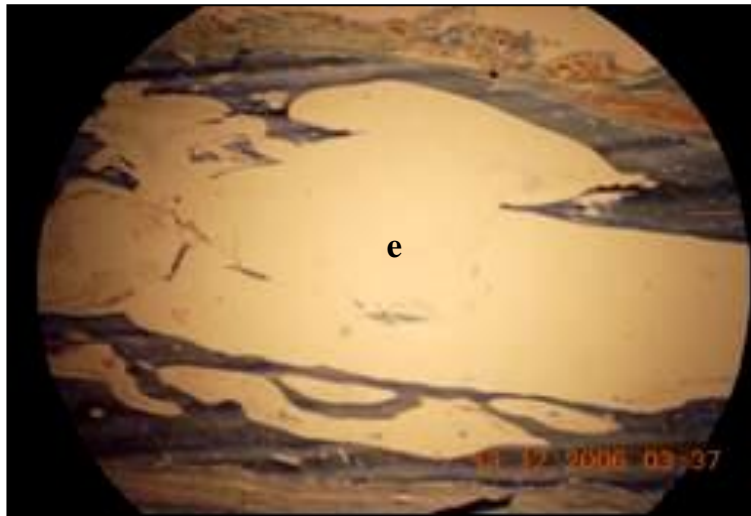


Figura 32a. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo sin implante (control) 16^a semana post quirúrgica. Fase de remodelación con formación de cavidad medular (e). Mallory, 4x.

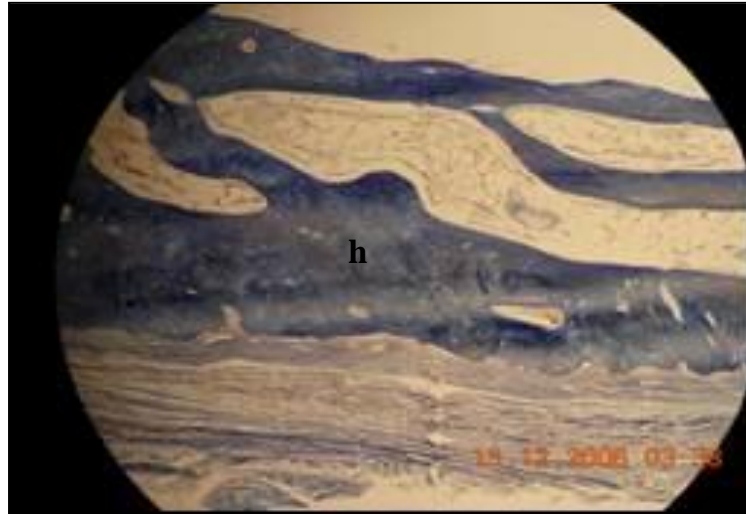


Figura 32b. Corte histológico longitudinal de ulna descalcificada de conejo sin implante (control) 16ª semana. Fase de remodelación con formación de hueso compacto laminillar (h). Mallory, 10x.

Resultados Imagenológicos

Las radiografías del segmento radio-ulnar de ambos brazos de cada conejo fueron evaluadas tomando en consideración los siguientes parámetros: línea de fractura, reacción tanto periosteal como endosteal, tejidos blandos, unión de cabos y nivel de remodelación ósea.

La radiografía que representó el tiempo cero del estudio fue tomada luego de concluida la cirugía. El segmento radio-ulnar derecho fue osteotomizado para implantar la membrana de cáscara de huevo (experimental), mientras que el izquierdo no se intervino, es decir, no se le realizó osteotomía.

El miembro experimental al ser observado en el negoscopio se vio que la línea de fractura, es decir, la línea producto de la reciente osteotomía, se encontraba muy definida, ausencia de reacción periosteal y endosteal, los tejidos blandos se mostraron levemente enfisematosos y no se observó unión de cabos óseos ni remodelación de hueso ulnar.

Por otra parte, en el miembro control, el cual no fue intervenido, no se visualizó la línea de fractura, no hubo reacción periosteal ni endosteal, los tejidos blandos se observaron conservados y no se evidenció unión de cabos y tampoco remodelación ósea.

CONEJO N° 0 TIEMPO 0			
Izquierdo (sin osteotomía)		Derecho (experimental)	
Línea de fractura	Ausente	Línea de fractura	Presente
Reacción periosteal	Ausente	Reacción periosteal	Ausente
Reacción endosteal	Ausente	Reacción endosteal	Ausente
Tejidos blandos	Conservados	Tejidos blandos	Enfisema leve
Unión de cabos	Ausente	Unión de cabos	Ausente
Remodelación	Ausente	Remodelación	Ausente



A la primera semana post implante, las ulnas experimentales de ambos conejos mostraron una línea de fractura evidente, sin embargo, se observó de forma incompleta en uno de los individuos. Las reacciones periosteal y endosteal se mantuvieron ausentes y los tejidos blandos se notaron aumentados; tanto la unión de cabos como la remodelación del tejido óseo no se observaron.

En las ulnas controles de la primera semana post cirugía se observó la línea de fractura, ausencia de reacción periosteal y endosteal, los tejidos blandos se notaron aumentados, no observándose unión de cabos y tampoco remodelado óseo.

CONEJO N° 10 SEMANA 1			
Izquierdo (experimental)		Derecho (control)	
Línea de fractura	Incompleta	Línea de fractura	Presente
Reacción periosteal	Ausente	Reacción periosteal	Ausente
Reacción endosteal	Ausente	Reacción endosteal	Ausente
Tejidos blandos	Levemente aumentados	Tejidos blandos	Levemente aumentados
Unión de cabos	Ausente	Unión de cabos	Ausente
Remodelación	Ausente	Remodelación	Ausente



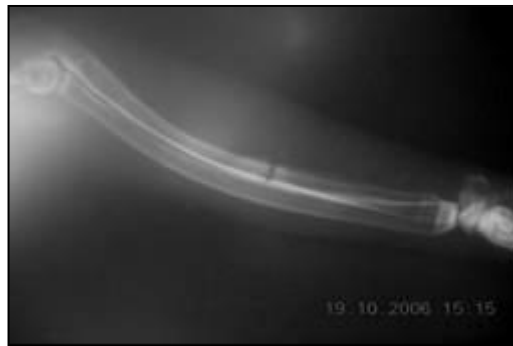
CONEJO N° 9 SEMANA 1			
Izquierdo (control)		Derecho (experimental)	
Línea de fractura	Presente	Línea de fractura	Presente
Reacción periosteal	Ausente	Reacción periosteal	Ausente
Reacción endosteal	Ausente	Reacción endosteal	Ausente
Tejidos blandos	Aumentados	Tejidos blandos	Aumentados
Unión de cabos	Ausente	Unión de cabos	Ausente
Remodelación	Ausente	Remodelación	Ausente



La segunda semana posterior a la implantación de la membrana de cáscara de huevo, se observó la línea de fractura, se encontró un nivel de reacción periosteal y endosteal leve y con un ligero aumento de los tejidos blandos. La unión de cabos y la fase de remodelación ósea no se presentaron.

Por su parte, en las radiografías controles se advirtió la presencia de la línea de fractura, la reacción periosteal fue moderada en un conejo y ausente en el otro, mientras que la reacción endosteal varió de moderada a leve. Los tejidos blandos se observaron levemente aumentados en una de las placas controles y conservados en la otra. No se encontró unión de cabos óseos ni fase de remodelación.

CONEJO N° 8 SEMANA 2			
Izquierdo (experimental)		Derecho (control)	
Línea de fractura	Presente	Línea de fractura	Presente
Reacción periosteal	Leve	Reacción periosteal	Moderado
Reacción endosteal	Leve	Reacción endosteal	Moderado
Tejidos blandos	Levemente aumentados	Tejidos blandos	Levemente aumentados
Unión de cabos	Ausente	Unión de cabos	Ausente
Remodelación	Ausente	Remodelación	Ausente



CONEJO N° 7 SEMANA 2			
Izquierdo (control)		Derecho (experimental)	
Línea de fractura	Presente	Línea de fractura	Presente
Reacción periosteal	Ausente	Reacción periosteal	Leve
Reacción endosteal	Leve	Reacción endosteal	Leve
Tejidos blandos	Conservados	Tejidos blandos	Conservados
Unión de cabos	Ausente	Unión de cabos	Ausente
Remodelación	Ausente	Remodelación	Ausente



Luego de cuatro semanas de implantada la membrana de cáscara de huevo, las placas radiográficas que corresponden a los segmentos radio-ulnares experimentales se observaron y se visualizó la presencia de la línea de fractura, la reacción periosteal varió de moderada a muy abundante, mientras que la reacción endosteal fue moderada. Los tejidos blandos variaron de levemente aumentados a conservados, la unión de cabos no se presentó y hubo leve remodelación del tejido óseo.

La radiografía del miembro control se observó con la línea de fractura presente, moderada reacción periosteal y leve reacción endosteal. Los tejidos blandos se presentaron conservados, la unión de cabos fue ausente y se vio un leve remodelado óseo.

CONEJO N° 6 SEMANA 4			
Izquierdo (control)		Derecho (experimental)	
Línea de fractura	Presente	Línea de fractura	Presente
Reacción periosteal	Moderada	Reacción periosteal	Moderada
Reacción endosteal	Leve	Reacción endosteal	Moderada
Tejidos blandos	Conservados	Tejidos blandos	Conservados
Unión de cabos	Ausente	Unión de cabos	Ausente
Remodelación	Leve	Remodelación	Leve



CONEJO N° 5 SEMANA 4	
Izquierdo (experimental)	
Línea de fractura	Presente
Reacción periosteal	Muy abundante
Reacción endosteal	Moderada
Tejidos blandos	Levemente aumentados
Unión de cabos	Ausente
Remodelación	Leve

(*)



En la octava semana después de la implantación de la membrana de cáscara de huevo entre los cabos osteotomizados, se distinguió claramente la línea de fractura, se encontró moderada reacción tanto periosteal como endosteal y los tejidos blandos se observaron conservados. No se evidenció unión de cabos y se presentó moderada remodelación de hueso ulnar.

En esta misma semana, las imágenes que corresponden a los controles mostraron una línea de fractura leve a discreta, la reacción periosteal fue de leve a escasa y la endosteal escasa. Conservados se observaron los tejidos blandos, la unión de cabos se notó levemente en una de las placas y avanzada en la otra. Se evidenció un nivel avanzado de remodelación del tejido óseo

(*) Fractura total del miembro derecho (control)

CONEJO N° 4 SEMANA 8	
Izquierdo (control)	
Línea de fractura	Discreta
Reacción periosteal	Leve
Reacción endosteal	Escasa
Tejidos blandos	Conservados
Unión de cabos	Avanzada
Remodelación	Avanzada

(*)



CONEJO N° 3 SEMANA 8			
Izquierdo (experimental)		Derecho (control)	
Línea de fractura	Presente	Línea de fractura	Leve
Reacción periosteal	Moderado	Reacción periosteal	Escasa
Reacción endosteal	Moderado	Reacción endosteal	Escasa
Tejidos blandos	Conservados	Tejidos blandos	Conservados
Unión de cabos	Ausente	Unión de cabos	Leve
Remodelación	Moderada	Remodelación	Avanzada



(*) Fractura total del miembro derecho (experimental)

La décimo sexta semana mostró en las ulnas experimentales una línea de fractura discreta a ausente, una abundante reacción periosteal y de abundante a moderada reacción endosteal. Los tejidos blandos se notaron levemente aumentados; se observó también que la unión de cabos óseos varió de avanzada a completa y la remodelación lo hizo de moderada a avanzada.

Por su lado, los controles se observaron con una discreta a ausente línea de fractura y escasa reacción tanto periosteal como endosteal. Los tejidos blandos se presentaron conservados, la unión de cabos fue de moderada a completa y se observó con una avanzada remodelación del hueso ulnar.

CONEJO N° 2 SEMANA 16			
Izquierdo (experimental)		Derecho (control)	
Línea de fractura	Ausente	Línea de fractura	Discreta
Reacción periosteal	Abundante	Reacción periosteal	Escasa
Reacción endosteal	Abundante	Reacción endosteal	Escasa
Tejidos blandos	Levemente aumentados	Tejidos blandos	Conservados
Unión de cabos	Completa	Unión de cabos	Moderada
Remodelación	Moderada	Remodelación	Avanzada



CONEJO N° 1 SEMANA 16			
Izquierdo (control)		Derecho (experimental)	
Línea de fractura	Ausente	Línea de fractura	Discreta
Reacción periosteal	Escasa	Reacción periosteal	Abundante
Reacción endosteal	Escasa	Reacción endosteal	Moderada
Tejidos blandos	Conservados	Tejidos blandos	Levemente aumentados
Unión de cabos	Completa	Unión de cabos	Avanzada
Remodelación	Avanzada	Remodelación	Avanzada



Resultados Microscopía de fluorescencia

Las muestras de hueso ulnar fueron analizadas bajo luz UV evidenciando si hubo o no regeneración o neoformación ósea, ya que la tetraciclina inyectada semanalmente desde el primer día de cirugía, tiene la capacidad de fijarse a los tejidos en fase de calcificación bajo la forma química del complejo cálcico llamado quelato, muy estable y fluorescente al ser observada con dicha luz.

Al implantar la membrana de cáscara de huevo entre los cabos osteotomizados del hueso ulnar, las muestras correspondientes a la primera semana post cirugía presentaron la membrana de cáscara de huevo (m) bien posicionada entre los cabos y por lo tanto, no observándose unión de ellos. Se notó una mayor fluorescencia en la zona medular cercana a la membrana implantada (figura 33).

En el caso de los controles esta misma semana se observó fluorescencia de la región osteotomizada y medular adyacente, marcando una amplia zona de neoformación ósea (o) (figura 34).

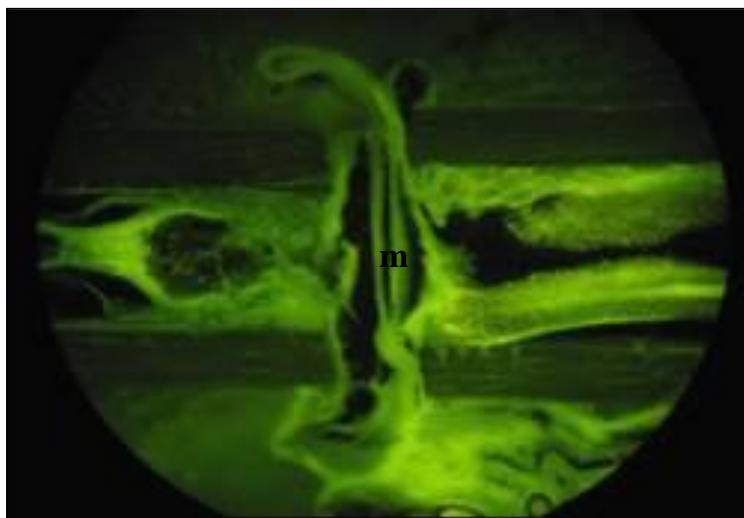


Figura 33. Corte sagital de ulna desgastada de conejo con implante (experimental) 1ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) entre los cabos osteotomizados, 4x.

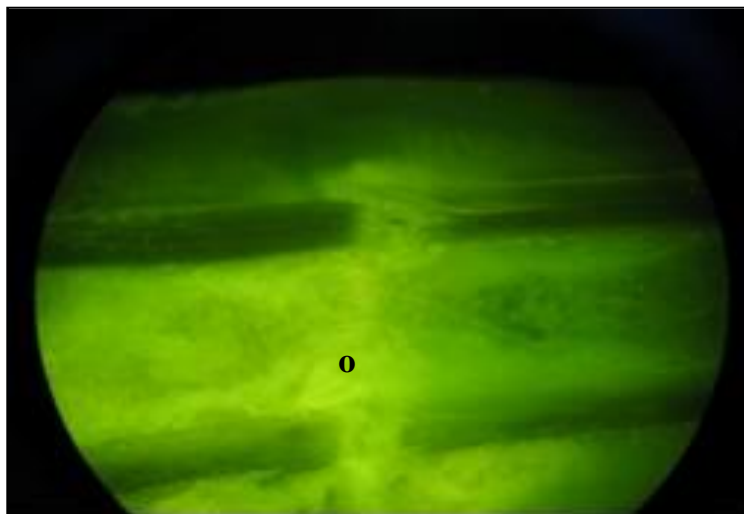


Figura 34. Corte sagital de ulna desgastada de conejo sin implante (control) 1ª semana post quirúrgica. Fluorescencia dada por la tetraciclina marcando la zona de neoformación ósea (o), 4x.

La segunda semana post implante muestra una considerable banda fluorescente a ambos lados de la membrana de cáscara de huevo (m) interpuesta entre los cabos óseos (figura 35).

Por su parte, en los controles se observó una zona entre cabos altamente fluorescente debido a la afinidad de la tetraciclina al nuevo tejido óseo (o) en formación. Además, se encontró continuidad tanto del tejido medular como de las corticales diafisiarias (j) (figura 36).

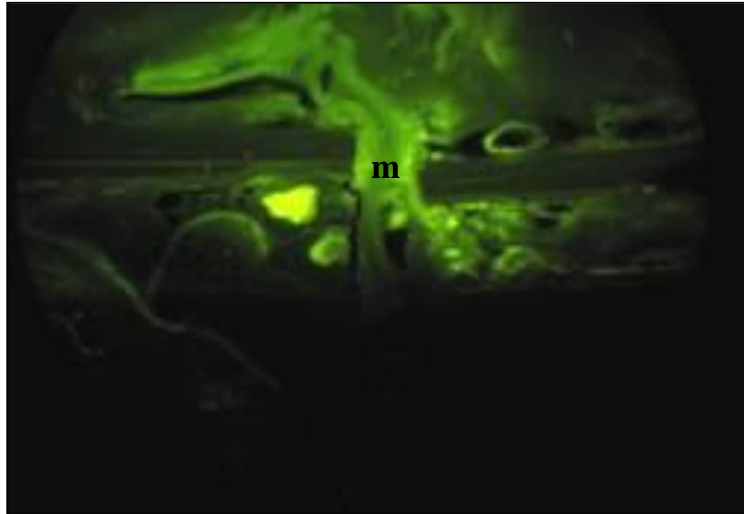


Figura 35. Corte sagital de ulna desgastada de conejo con implante (experimental) 2ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) entre los extremos óseos, banda fluorescente alrededor, 4x.

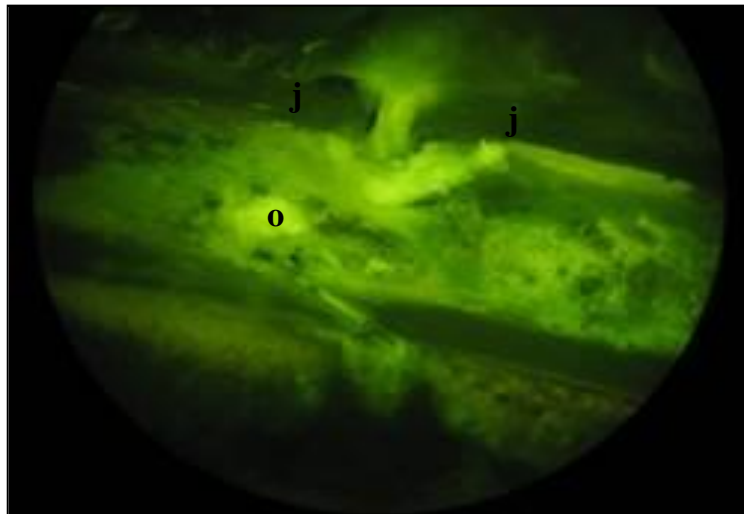


Figura 36. Corte sagital de ulna desgastada de conejo sin implante (control) 2ª semana post quirúrgica. Zona central muy fluorescente debido a la afinidad de la tetraciclina al nuevo tejido óseo en formación (o). Continuidad medular y cortical (j), 4x.

Durante la cuarta semana, las muestras experimentales demostraron que la membrana de cáscara de huevo (m) permanecía íntegra en toda su extensión impidiendo la formación de neo-hueso y por lo tanto la normal continuidad ósea. Se encontró fluorescencia positiva (o) en la región medular contigua al implante (figura 37).

Las ulnas sin implante de membrana, exhibieron una considerable fluorescencia dada por la tetraciclina en toda el área intervenida estando ésta en fase de calcificación (o) (figura 38).

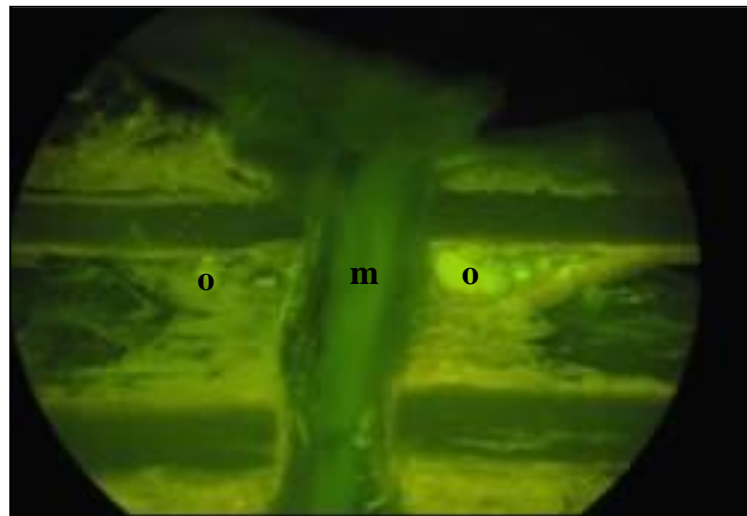


Figura 37. Corte sagital de ulna desgastada de conejo con implante (experimental) 4ª semana post quirúrgica. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) entre los extremos óseos, banda fluorescente alrededor del implante (o), 4x.

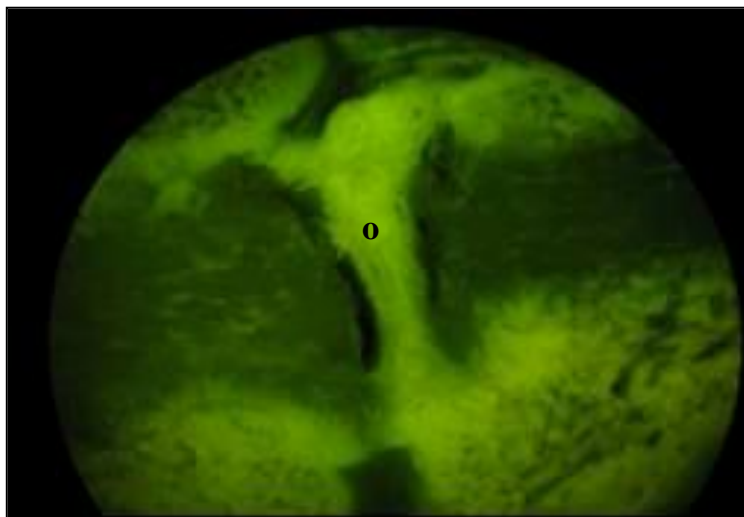


Figura 38. Corte sagital de ulna desgastada de conejo sin implante (control) 4ª semana post quirúrgica. Fluorescencia de la región osteotomizada dada por la afinidad de la tetraciclina por los tejidos en fase de calcificación (o), 10x.

A la octava semana post implante, se observó que la membrana de cáscara de huevo (m) se encontraba concentrada en el centro de la ulna con una notable fluorescencia a su alrededor (figura 39).

En esta semana hay evidencia de hueso homogéneo, unido y continuo en las ulnas controles, muy fluorescente (o) en su área central (figura 40).

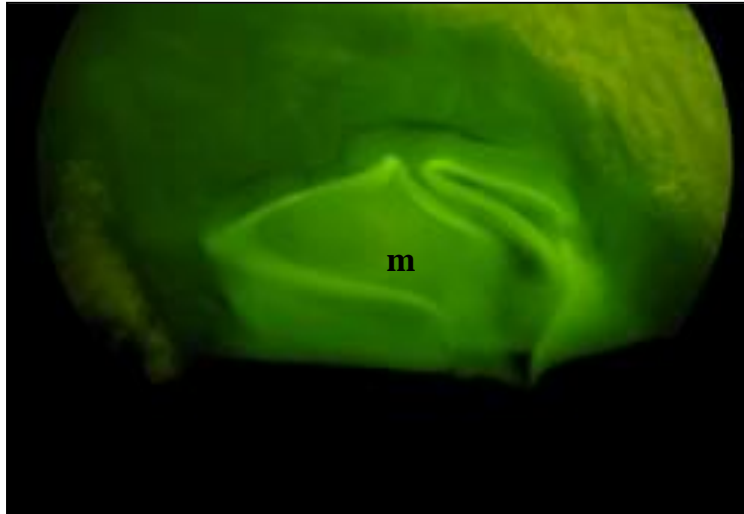


Figura 39. Corte sagital de ulna desgastada de conejo con implante (experimental) 8ª semana post quirúrgico. Implante de membrana de cáscara de huevo (m) concentrado en el centro, fluorescencia a su alrededor, 4x.

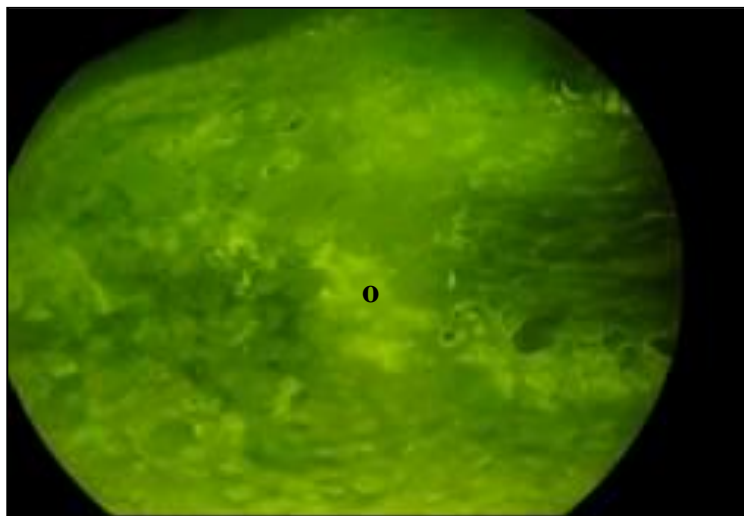


Figura 40. Corte sagital de ulna desgastada de conejo sin implante (control) 8ª semana post quirúrgica. Tejido óseo homogéneo, unido y continuo, muy fluorescente (o) en su área central, 4x.

A las dieciséis semanas las muestras experimentales evidenciaron ausencia del implante de membrana de cáscara de huevo. El tejido óseo presentó áreas fluorescentes (o) en forma difusa (figura 41).

Los controles presentaron tejido óseo continuo, homogéneo y muy fluorescente (o) en los extremos medulares ulnares (figura 42).

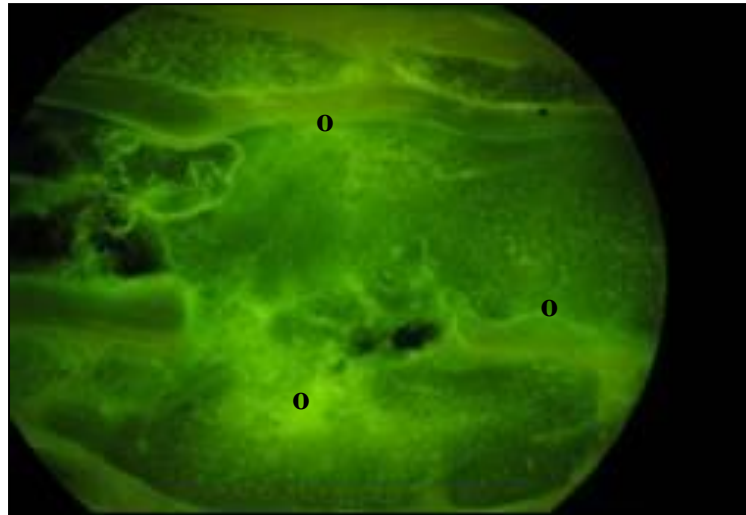


Figura 41. Corte sagital de ulna desgastada de conejo con implante (experimental) 16ª semana post quirúrgica. Ausencia de implante de membrana, tejido óseo fluorescente (o) en forma difusa, 4x.

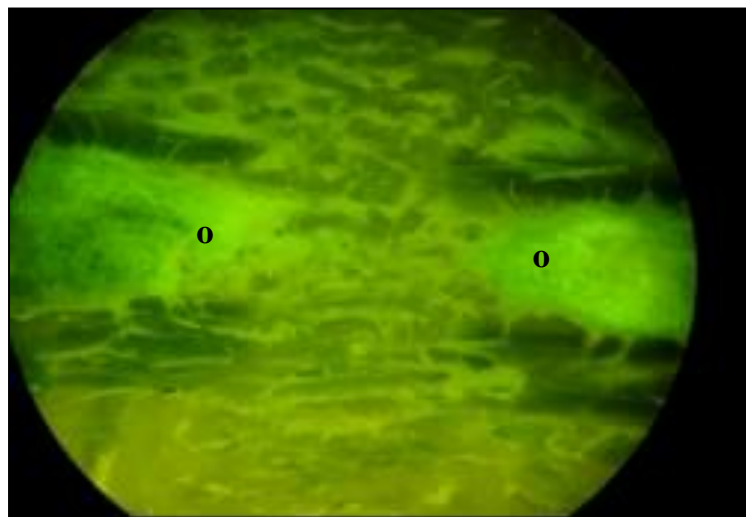


Figura 42. Corte sagital de ulna desgastada de conejo sin implante (control) 16ª semana post quirúrgica. Tejido óseo continuo, homogéneo y fluorescente (o) en los extremos medulares, 4x.

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio histológico del tejido subcutáneo de ratas muestran que las membranas de cáscara de huevo implantadas se mantuvieron íntegras en toda su extensión durante las dieciséis semanas que duró el estudio, es decir no fueron reabsorbidas ni expulsadas.

Todas las muestras subcutáneas de piel de ratas mostraron algún grado de inflamación crónica. Durante las primeras dos semanas, es posible observar una mayor intensidad de infiltración celular en los controles que en aquellos con membrana implantada. A partir de la cuarta semana se revierte la situación observándose que los experimentales muestran considerablemente mayores áreas de inflamación con respecto a sus controles en las mismas semanas. En el caso de las muestras con implante, se vio que en el transcurso de las semanas va incrementando la reacción inflamatoria. Por otra parte, en las muestras sin implante, la intensidad de inflamación es relativamente estable hasta la octava semana, ya que durante la décimo sexta semana la infiltración celular se ve aumentada. Esto puede sugerirnos que el proceso inflamatorio inicial demostrado durante las primeras semanas, es provocado por el procedimiento quirúrgico llevado a cabo, más que por la presencia de la membrana de cáscara de huevo implantada. Sin embargo, la reacción inflamatoria hacia el final del estudio, puede ser atribuida al implante.

Desde la octava semana, se puede apreciar en forma notable la presencia de células gigantes en respuesta a cuerpo extraño en las muestras con implante de membrana de cáscara de huevo. No se observaron células gigantes en las muestras sin implante.

Se evidenciaron procesos fibróticos, tanto en las muestras controles como en las experimentales, estando en estas últimas distribuidas en capas alrededor del implante y marcadamente más densas. Durante la primera y la décimo sexta semana llama la atención que las muestras sin implante presentan mayores extensiones de fibrosis al medir su magnitud en comparación a sus pares experimentales de las mismas semana. Por el contrario, en las semanas intermedias (segunda, cuarta y octava semanas), los controles presentan una menor magnitud de fibrosis comparado con sus pares experimentales en las mismas semanas. En el caso de las muestras con implante, en cuanto a fibrosis, estas se mantienen estables con el pasar de las semanas, aunque con una disminución del proceso

fibrótico al finalizar el estudio. Por otra parte, en las muestras sin implante van decreciendo la magnitud de la fibrosis, excepto en la última semana de estudio, en la cual se presenta un considerable aumento.

En términos generales, suponemos que lo que ocurrió tanto en las muestras con implante como sin él, durante el transcurso de los primeros días luego del proceso quirúrgico, fue un proceso inflamatorio agudo que no se habría alcanzado a evidenciar en las muestras, seguida de una fase inflamatoria crónica que va aumentando con el avance de las semanas y que en el caso de los experimentales, en algún momento entre la octava y la décimo sexta semana, al parecer se produce una reacción de rechazo hacia la membrana implantada.

No se observó neoformación ósea ni cartilaginosa en ningún corte histológico de tejido subcutáneo de rata.

Con respecto a las membranas de cáscara de huevo implantadas en las ulnas osteotomizadas, podemos decir que se mantuvieron intactas durante casi todo el estudio, excepto en la octava semana, en la que se presentó fragmentada. Esto puede deberse a una inadecuada fijación de la membrana durante el proceso quirúrgico y no a un proceso reabsortivo, ya que en la décimo sexta semana la membrana de cáscara de huevo interpuesta entre los cabos ulnares osteotomizados se presentó en forma completa. Las muestras experimentales, se observaron con una clara interrupción de la continuidad ósea, no así los controles, en los cuales no se vio impedimento para la regeneración de hueso ulnar en ningún momento del estudio, demostrando una alta actividad osteogénica. Además, se evidenció que siempre el control se encuentra en etapas más avanzadas de regeneración respecto a su par experimental de la misma semana. Por lo tanto, se sugiere que la membrana de cáscara de huevo estaría inhibiendo la regeneración en las ulnas implantadas.

En el caso de las muestras controles, durante la regeneración ósea es posible observar neoformación de hueso tanto en forma directa como indirecta con la presencia de condrocitos en fase proliferativa en un inicio y un modelo cartilaginoso que va siendo reemplazado por hueso al transcurrir las semanas. En contraste, las ulnas implantadas con membrana no presentan evidencia de desarrollo de cartílago. Cabe destacar que en la

muestra experimental de la cuarta semana de estudio, es posible distinguir la presencia de una insignificante formación de tejido cartilaginoso hacia el extremo óseo osteotomizado, sin embargo, distanciado de la membrana implantada. En consecuencia, podríamos decir que la membrana de cáscara de huevo es capaz de inhibir la formación de tejido cartilaginoso, formación de matriz osteoide y mineralización por un período de tiempo suficiente (dieciséis semanas) para el tratamiento del *Radius curvus*.

En los casos de ulnas con implante, es posible notar tejido inflamatorio alrededor del implante que va aumentando, tornándose amorfo y necrótico al finalizar el estudio.

La no regeneración ósea experimentada por parte de las muestras experimentales, es atribuible a la membrana de cáscara de huevo interpuesta entre los cabos óseos osteotomizados, más exactamente al colágeno tipo X presente en ella, coincidiendo con los resultados de otras investigaciones dada su capacidad inhibitoria de la mineralización.

Los resultados del estudio radiológico mostraron que durante las primeras cuatro semanas no se evidenciaron grandes diferencias entre miembros con implante y sin implante.

A partir de la octava semana es posible observar algunos contrastes, ya que en el caso de las ulnas sin implantar se dificulta la visualización de la línea de fractura, se observó unión de cabos en algún grado y una avanzada etapa de remodelado. Por el contrario, en los miembros con membrana interpuestas entre los cabos, la línea de fractura es evidente a simple vista, la unión de cabos está ausente y la remodelación ósea se encuentra en etapas más tardías.

Entrada la décimo sexta semana, son claras las diferencias en todos los aspectos evaluados, entre miembros sin implante y con ellos. En los primeros, existe unión de cabos en forma completa, hay escasa reacción tanto periosteal como endosteal y ausencia de la línea de fractura, mientras que en miembros con implante, no existe una completa unión de cabos, la reacción periosteal y endosteal es moderada y la línea de fractura es visible, aunque discreta. Cabe mencionar que en forma excepcional durante esta misma semana de estudio, hubo un caso en el cual no se obtuvo el resultado esperado como el antes mencionado, por el contrario, ya que curiosamente el miembro con implante de membrana de cáscara de huevo se observó en la radiografía muy similar a lo que sería un miembro sin

implantar. Esto puede ser, debido a una mala fijación de la membrana al periostio durante la cirugía y por lo tanto, al movimiento del implante, lo que llevaría al miembro a comportarse como una muestra sin implante, llevándose a cabo la regeneración ósea sin impedimentos.

Nuevamente estos resultados nos permiten proponer a la membrana de cáscara de huevo como un material estable, por lo menos durante ocho semanas antes de que comiencen procesos reabsortivos, y con un rol inhibitor de la regeneración ósea por parte del colágeno tipo X que la compone, siendo esto lo esperado según otros estudios.

Por último, los resultados del estudio por microscopía de fluorescencia por efecto de la inyección de oxitetraciclina, mostraron que hasta la octava semana es notorio el implante de membrana de cáscara de huevo en su posición original en forma transversal a la ulna. En alguna etapa posterior a la octava semana post implante, es probable que haya ocurrido desplazamiento, expulsión o reabsorción de la membrana, ya que en la décimo sexta semana no es posible observarla. Este hecho puede deberse a una incorrecta maniobra divisora de la ulna, quedando solamente una de las mitades con membrana, y no necesariamente estando frente a un proceso de reabsorción, ya que al observar la muestra del estudio histológico de ulna implantada en la décimo sexta semana, la membrana de cáscara de huevo aún se encontraba presente.

La fluorescencia percibida en las muestras de ulnas al ser observadas bajo luz UV, es consecuencia del depósito de la tetraciclina inyectada a cada conejo el día de la cirugía y posteriormente cada siete días hasta su eutanasia, ya que la molécula de este fármaco se fija a los tejidos en fase de calcificación bajo la forma química del complejo cálcico llamado quelato, el cual experimenta una reacción de oxidación inducida por la luz. Esta fluorescencia es posible observarla tanto en ulnas implantadas como sin implante, siendo en estas últimas mucho más extensa e intensa. Esto es producto de la neoformación ósea ocurrida en las ulnas sin implante, y por lo tanto habiendo una mayor afinidad de la tetraciclina en ellas.

En el caso de las muestras no implantadas, la fluorescencia es observada en una amplia área correspondiente a la zona osteotomizada, es decir entre los cabos óseos, mientras que en las muestras implantadas, la fluorescencia sólo se presenta en la zona

contigua alrededor de la membrana de cáscara de huevo o como una banda o franja entre los cabos óseos y la membrana interpuesta.

Con estos resultados podemos decir que la membrana de cáscara de huevo actúa como un impedimento para la neoformación ósea al ser implantada entre los cabos óseos de ulnas osteotomizadas, resultando por lo tanto, ser una buena opción para el tratamiento de aquellas patologías que requieran retardar o inhibir la regeneración del tejido óseo, como en el caso del *Radius curvus*.

CONCLUSIONES

1. Los implantes subcutáneos de membrana de cáscara de huevo se mantienen íntegros, no son expulsados ni reabsorbidos hasta la décimo sexta semana.
2. Los implantes óseos de membrana de cáscara de huevo no son reabsorbidos por lo menos hasta la octava semana.
3. La respuesta inflamatoria producida por el implante de membrana de cáscara de huevo en el tejido subcutáneo es estable hasta la octava semana.
4. La membrana de cáscara de huevo es biocompatible al menos hasta la octava semana post implante subcutáneo, ya que durante la décimo sexta semana presenta reacción a cuerpo extraño siendo rechazada por el organismo.
5. Tomando en consideración que el objetivo de este estudio era la inhibición de la regeneración ósea por parte de la membrana de cáscara de huevo, lo cual fue demostrado, se considera la hipótesis como verdadera.
6. El implante de membrana de cáscara de huevo es un buen candidato para ser usado como parte del tratamiento de aquellas patologías osteoarticulares en que se requiera impedir o retardar la regeneración ósea, como es el caso del *Radius curvus*.

BIBLIOGRAFÍA

- **ANDERSON, J. M., SCHOEN, F. J.** 2004. In Vivo Assessment of Tissue Compatibility. In: An Introduction to Materials in Medicine. Biomaterials Science. **RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S., SCHOEN, F. J., LEMONS, J. E.** Second Edition 360-366.
- **ARIAS, J. L., FERNÁNDEZ, M. S., DENNIS, J. E., CAPLAN, A. I.** 1991 a. Collagens of The Chicken Eggshell Membranes. *Connective Tissue Research* 26: 37-45.
- **ARIAS, J. L., FERNÁNDEZ, M. S., DENNIS, J. E., CAPLAN, A. I.** 1991 b. The Fabrication and Collagenous Substructure of the Eggshell Membrane in the Isthmus of the Hen Oviduct. *Matrix* 11: 313-320.
- **ARIAS, J. L., NAKAMURA, O., FERNÁNDEZ, M. S., WU, J. J., KNIGGE, P., EYRE, D. R., CAPLAN, A. I.** 1997. Role of Type X Collagen on Experimental Mineralization of Eggshell Membranes. *Connective Tissue Research* 36: 21-33.
- **BEHN, G.** 1993. La osteosíntesis biológica. *Revista Chilena de Ortopedia y Traumatología* 34: 4-9.
- **CAPLAN, A. I.** 1990. Cell delivery and tissue regeneration. *Journal Control Release* 11: 157-165.
- **CRUESS, R. L., DUMONT, J.** 1985. Healing of Bone. *Textbook of Animal Orthopedics*.
http://www.ivis.org/special_books/ortho/chapter_03/03mast.asp#1
[consulta: 13-03-2006]
- **CUTTER, S. K.** 2004. Anesthesia for Laboratory Animals and Exotics.
<http://www.vet.purdue.edu/vettech/VM204/LABORATORY/Anesthesia/Anesthesia%20for%20Laboratory%20Animals%20Presentation.ppt> [consulta: 01-07-2006]
- **DASSO, G., FERNANDEZ, M. S., ARIAS, J. L.** 1998. Reparación ósea mediante aloimplantes sometidos a diferentes métodos de conservación en conejos. *Archivos de Medicina Veterinaria* XXX (2) 57-66.
- **DEGNER, D. A.** 2004. Angular Limb Deformity. *Vet. Surgery Central Inc*.
<http://www.vetsurgerycentral.com/ald.htm> [consulta: 20-04-2006]

- **DUPOIRIEUX, L.** 1999. Ostrich eggshell as a bone substitute: a preliminary report of its biological behaviour in animals – a possibility in facial reconstructive surgery. *British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 37: 467- 471.
- **DUPOIRIEUX, L., POURQUIER, D., PICOT, M. C., NEVES, M.** 2001. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 30: 58-62.
- **DURMUS, E., CELIK, I., OZTURK, A., AYDIN, M. F.** 2003. Evaluation of the Potencial Beneficial Effects of Ostrich Eggshell Membranas in Healing of Cranial Defects in Rabbits. *The Journal of International Medical Research* 31: 223-230.
- **FERNÁNDEZ-TRESGUERRES, I., ALOBERA, M., PINGARRÓN, M., BLANCO, L.** 2006. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral Patología Oral Cirugía Bucal* 11: 47-51.
- **FRISCH, T., SORENSEN, M. S., OVERGAARD, S., LIND, M., BRETLAU, P.** 1998. Volume-Referent Bone Turnover Estimated From the Interlabel Area Fraction After Sequential Labeling. *Bone* 22: 677-682.
- **GARTNER, L. P., HIATT, J. L., STRUM, J. M., SWANSON, T. A., KIM, S. I., SCHNEIDER, A. S.** 2002. *Cell Biology and Histology* 384.
- **ILZARBE, L. M., ORTIZ, J. V.** 1995. Manipulación de la molécula de tetraciclina para blanqueamiento dental: diseño de experimentos.
<http://www.icqmed.com/articulos/clinica1.htm> [consulta: 02-07-2006]
- **MEENAKSHI, V. R., BLACKWELDER, P. J., WATABE, N., WILBUR, K. M.** 1974. The influence of substrata on calcification patterns in molluscan shell. *Calcified Tissue Research* 15: 31-41.
- **MILOVANCEV, M., RALPHS, S. C.** 2004. Radius/Ulna Fracture Repair. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 19: 128-133.
- **MORGAN, J. P., LEIGHTON, R. L.** 1995. *Radiology of Small Animal Fracture Management* 328.
- **NEWTON, C. D.** 1985. Radial and ulnar osteotomy. *Textbook of Animal Orthopedics*.
http://cal.vet.upenn.edu/saortho/chapter_41/41mast.htm [consulta: 13-03-2006]

- **NYMAN, S., GOTTLOW, J., KARRING, T., LINDHE, J.** 1982. The regenerative potential of the periodontal ligament: an experimental study in the monkey. *Clinical Periodontology* 9: 257-265.
- **PÉREZ, A.** 1993. El banco de huesos del hospital del trabajador. *Revista Chilena de Ortopedia y Traumatología* 34: 37-43.
- **PRESTON, C. A., SCHULZ, K. S., TAYLOR, K. T., KASS, P. H., HAGAN, C. E., STOVER, S. M.** 2001. In vitro experimental study of the effect of radial shortening and ulnar ostectomy on contact patterns in the elbow joint of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 62: 1548-1556.
- **SCHEPLER, J., KENNEL, W.** 2004. Premature Closure Ulna. <http://www.shilohgdf.com/Premature%20Closure%20Ulna.htm> [consulta: 20-04-2006]
- **VANDE VORD, P. J., MATTHEW, H. W. T., DESILVA, S. P., MAYTON, L., WU, B., WOOLEY, P. H.** 2002. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *Journal Biomedical Material Research* 59(3): 585-590.