

RESPUESTA DEL DISCO
INTERVERTEBRAL DE LA RATA A LA
INTRODUCCION EN SU INTERIOR DE
SUBSTRATOS ORGANICOS INDUCTORES
DE LA OSIFICACION

A. RUIZ i GUILLEN
REUS 1993

RESPUESTA DEL DISCO
INTERVERTEBRAL DE LA RATA A LA
INTRODUCCION EN SU INTERIOR DE
SUBSTRATOS ORGANICOS INDUCTORES
DE LA OSIFICACION

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
DEPARTAMENT DE MEDICINA I CIRURGIA

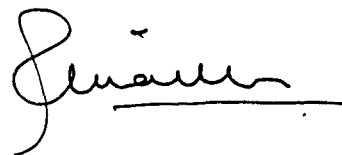
CARRER SANT LLORENÇ 21
TEL 977 31 89 22
FAX 977 31 91 47
43201 REUS

RODRIGO MIRALLES MARRERO, PROFESSOR ASSOCIAT DE PATOLOGIA
QUIRÚRGICA (CIRURGIA ORTOPÈDICA I TRAUMATOLOGIA), DEPARTAMENT
DE MEDICINA I CIRURGIA DE LA UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI,

FA CONSTAR:

Que el treball "Respuesta del disco intervertebral de la rata a la introducción en su interior de substratos orgánicos inductores de la osificación", del que és autor D. Antoni RUIZ GUILLÉN, ha sigut realitzat a la Facultat de Medicina de la Universitat Rovira i Virgili, amb la meva direcció i reuneix tots els requisits per a ser presentat i defensat com a Tesi Doctoral.

I perquè tingui els efectes pertinents, signo el present a Reus, a vint d'agost de mil nou-cents noranta-tres.



Departament de Medicina i Cirurgia
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



Antoni RUIZ i GUILLEN
TESIS DOCTORAL
AÑO 1993

A Mary, mi esposa, sin cuyo entusiasmo y ayuda nunca podría haber llevado a término este trabajo.

A Xavier, Jordi y Marta, mis hijos, porque a pesar de su edad, han sabido comprender y renunciar.

A mis padres.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RESPUESTA DEL DISCO INTERVERTEBRAL DE LA RATA A LA INTRODUCCIÓN EN SU INTERIOR DE SUBSTRATOS ORGÁNICOS
INDUCTORES DE LA OSIFICACIÓN
Antonio Ruiz Guillén
DL:T-1559-2009 /ISBN: 978-84-692-4519-4

En mi vida he tenido muchos
profesores pero pocos maestros....

A mis maestros.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rodrigo Miralles Marrero, Director de esta Tesis, Jefe de Servicio y amigo, por su constante estímulo y adecuados consejos, sin los cuales no hubiera sido posible este trabajo.

A la Dra. Carme Padrol, por las horas invertidas en adiestrarme en la interpretación de los resultados anatomopatológicos.

A la Srta. Carmen Quilarte, por su esmerado trabajo en la preparación de la anatomía patológica.

A la Dra. Ester Antón, por su ayuda desinteresada.

A la Dra. Mercè Hernández, por su disponibilidad y a la Unitat de Cirurgia de la Facultat de Medicina de Reus, porque ha puesto a mi disposición toda la ayuda material precisa para la realización del trabajo experimental.

Al Dr. Joan Fernández, por su valiosa ayuda en la interpretación de los datos estadísticos.

A los Drs. Eugeni García Almagro y Luís Lozano, por su desinteresada colaboración.

A la Sra. Carme Agustench, por su eficaz ayuda en la mecanografía y compaginación.

A los miembros de la Biblioteca de la Facultat de Medicina de Reus, por las facilidades ofrecidas.

A los miembros del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Sant Joan de Reus, por su paciencia.

A los miembros del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital de Sant Joan de Reus, por su apoyo constante.

A todos cuantos de una forma u otra han intervenido, directa o indirectamente, en la realización de esta Tesis.

A todos mi más sincero agradecimiento.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RESPUESTA DEL DISCO INTERVERTEBRAL DE LA RATA A LA INTRODUCCIÓN EN SU INTERIOR DE SUBSTRATOS ORGÁNICOS
INDUCTORES DE LA OSIFICACIÓN
Antonio Ruiz Guillén
DL:T-1559-2009 / ISBN: 978-84-692-4519-4

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION	1
1.1 Preliminar	2
1.2 La inducción ósea	5
1.2.1 Recuerdo histórico	6
1.2.2 Condiciones precisas para la inducción ósea	13
1.3 La matriz ósea desmineralizada (D.B.M.) como substrato inductor de la osificación	15
1.3.1 Recuerdo histórico	15
1.3.2 Obtención de matriz ósea desmineralizada (D.B.M.)	17
1.3.3 Tamaño del implante y su relación con la respuesta	20
1.3.4 La D.B.M. y el animal de experimentación	21
1.3.5 Descalcificación parcial de la D.B.M.	22
1.3.6 D.B.M. y métodos de esterilización	22
1.3.7 D.B.M. y edad el receptor	24
1.3.8 Potenciación del efecto osteoinductor de la D.B.M.	24
1.3.8.1 D.B.M y médula ósea autóloga	25
1.3.8.2 D.B.M. y proteínas morfogenéticas óseas (B.M.P.)	26
1.3.8.3 D.B.M. y otros tejidos orgánicos	27
1.3.8.4 D.B.M. y materiales inorgánicos	27
1.3.9 La D.B.M. "in vitro"	28
1.3.10 La D.B.M. y las reacciones de antigenicidad	28
1.3.11 La D.B.M. en patología humana	29

1.4 Proteína morfogenética ósea (B.M.P.)	31
1.4.1 Resumen histórico, aislamiento y características	31
1.5 El periostio como injerto con potencial inductor de la osificación heterotópica	34
1.5.1 Recuerdo histórico	34
1.5.2 Propiedades como sustrato inductor de la osificación	39
1.6 El disco intervertebral humano	41
1.6.1 Consideraciones anatómicas generales	41
1.6.2 Estructura macroscópica del disco	41
1.6.3 Inervación del disco	42
1.6.4 Irrigación sanguínea discal	42
1.6.5 Nutrición discal	43
1.6.6 Características bioquímicas del disco intervertebral	44
1.6.7 Células	45
1.6.8 Función del disco	45
1.7 Nucleotomía percutánea	47
1.8 La artrodesis vertebral	50
2. HIPOTESIS DE TRABAJO	54
2.1 Identificación del problema	55
2.2 Premisas para el desarrollo del trabajo	56
2.3 Objetivos	57

3. MATERIAL Y METODO	58
3.1 Material	60
3.1.1 El animal de experimentación	60
3.1.1.1 Tipo de animal	60
3.1.1.2 Nutrición y cuidados	61
3.1.1.3 Anatomía de la columna vertebral de la rata	62
3.1.1.4 Descripción microscópica del espacio intervertebral	72
3.1.2 La matriz ósea desmineralizada (D.B.M.)	77
3.1.2.1 Obtención de la D.B.M.	77
3.1.2.2 Descripción macroscópica de la D.B.M.	78
3.1.2.3 Descripción microscópica de la D.B.M.	78
3.1.3 El periostio	82
3.1.3.1 Obtención del periostio	82
3.1.3.2 Descripción microscópica del periostio	83
3.1.4 Material inerte	83
3.2 Método	85
3.2.1 Anestesia y sacrificio	85
3.2.1.1 Anestesia	85
3.2.1.2 Sacrificio	87
3.2.2 Búsqueda del modelo experimental	89
3.2.2.1 Preliminares	89
3.2.2.2 Estudio de una vía de abordaje a los cuerpos vertebrales de la cola de la rata	92
3.2.2.3 Estudio radiológico de la circulación a nivel de la cola de la rata	93
3.2.2.3.1 Método	93

3.2.2.3.2 Estudio a Rx de la cola perfundida	94
3.2.3 Justificación de los grupos de estudio	97
3.2.4 Técnica quirúrgica	98
3.2.4.1 Primera serie	98
3.2.4.2 Segunda serie	103
3.2.4.3 Tercera serie	104
3.2.5 Estudio radiológico	105
3.2.6 Obtención de las muestras	105
3.2.7 Procesamiento anatomopatológico	106
3.2.8 Métodos de estudio	107
3.2.8.1 Mortalidad y morbilidad	107
3.2.8.1.1 La mortalidad	107
3.2.8.1.2 La morbilidad	107
3.2.8.2 Variaciones morfológicas	108
3.2.8.2.1 Aspecto	108
3.2.8.2.2 Movilidad	109
3.2.8.3 Peso	111
3.2.8.4 Estudio radiológico	111
3.2.8.5 Estudio estadístico de los datos obtenidos	113
3.2.8.5.1 Técnicas estadísticas utilizadas en el análisis de datos	114
3.2.8.5.2 Material	115
3.2.8.6 Estudio anatomopatológico	115
3.2.8.6.1 Material	115
3.2.8.6.2 Método	116

4. RESULTADOS	118
4.1 Resultados de la observación clínica	119
4.1.1 Peso, mortalidad y morbilidad	119
4.1.1.1 Peso	119
4.1.1.2 Mortalidad	120
4.1.1.3 Morbilidad	121
4.1.2 Aspecto macroscópico de la cola	122
4.1.3 Movilidad	123
4.2 Resultado del estudio radiológico	125
4.2.1 Resultado del estudio radiológico de la primera serie	125
4.2.2 Resultado del estudio radiológico de la segunda serie	132
4.2.3 Resultado del estudio radiológico de la tercera serie	137
4.2.4 Comparación entre series	143
4.3 Resultado del estudio anatomopatológico	146
4.3.1 Resultados de la primera serie	146
4.3.1.1 Implantes en la pared abdominal	146
4.3.1.1.1 D.B.M.	146
4.3.1.1.2 Periostio	147
4.3.1.2 Implantes en disco intervertebral	152
4.3.1.2.1 Disco proximal (metal)	152
4.3.1.2.2 Disco con D.B.M.	154
4.3.1.2.3 Disco con periostio	156
4.3.2 Resultados de la segunda serie	158
4.3.2.1 Disco con D.B.M.	158
4.3.2.2 Disco control	160

4.3.2.3 Resultados de la serie	160
4.3.3 Resultados de la tercera serie	162
4.3.3.1 Disco con D.B.M.	162
4.3.3.2 Disco control	164
5. DISCUSION	172
5.1 Peso, mortalidad y morbilidad	173
5.1.1 Peso de los animales de las series	173
5.1.2 Mortalidad	174
5.1.3 Morbilidad	176
5.2 Aspectos clínico macroscópicos	178
5.3 Discusión de los resultados radiográficos	180
5.3.1 Sobre el implante metálico	180
5.3.2 Pérdida de paralelismo entre las vértebras	180
5.3.3 Erosión de los platillos vertebrales	181
5.3.4 Ensanchamiento de los platillos vertebrales	181
5.3.5 Pérdida de altura del espacio intervenido	182
5.3.6 Aparición de calcificaciones extradiscales	182
5.3.7 Relación entre calcificaciones y peso de los animales	183
5.3.8 Relación entre calcificaciones y ensanchamiento de los platillos vertebrales	184
5.3.9 Relación entre calcificaciones y erosiones en los platillos vertebrales	184
5.3.10 Osificación del espacio discal	185
5.3.11 Relación entre osificación y peso de los animales	186
5.3.12 Comparación entre series	186

5.4	Discusión del estudio anatomopatológico	
	de las series	188
5.4.1	Respuesta del disco intervertebral en la	
	primera y tercera series	188
5.4.2	Respuesta del espacio intervertebral en la	
	segunda serie	190
5.4.3	Alteraciones en los implantes utilizados	192
	5.4.3.1 En la primera y tercera series	192
	5.4.3.2 En la segunda serie	196
5.4.4	Implantes en músculo estriado	197
5.5	Reflexión final	202
6.	CONCLUSIONES	205
7.	BIBLIOGRAFIA	208

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPUESTA DEL DISCO INTERVERTEBRAL DE LA RATA A LA INTRODUCCIÓN EN SU INTERIOR DE SUBSTRATOS ORGÁNICOS
INDUCTORES DE LA OSIFICACIÓN

Antonio Ruiz Guillén

DL:T-1559-2009 /ISBN: 978-84-692-4519-4

1. INTRODUCCION

1.1 PRELIMINAR

Cuando un cirujano ortopédico se plantea la artrodesis vertebral como tratamiento de un proceso patológico a nivel de la columna, se está planteando una cirugía agresiva para el paciente a la vez que estresante para el cirujano.

El grado de agresividad y dificultad vendrá dado por el tipo de artrodesis que se practique y sobre todo por el lugar donde se realice el intento de fusión vertebral, siendo más importantes en las cirugías que abordan el disco intervertebral y sobre todo las que lo hacen por vía anterior.

En cualquier caso, sea cual sea la técnica utilizada, requerirá una hospitalización de varios días antes de que el paciente pueda ser remitido a su domicilio; probablemente se le habrá realizado un injerto óseo autólogo y en algunos casos incluso una transfusión sanguínea.

Sabemos que en los cuerpos vertebrales, cuando se les cruenta extirpando el disco intervertebral y los platillos vertebrales y se coloca un injerto esponjoso autólogo entre las superficies cruentas, se consigue en un porcentaje elevado de casos la artrodesis intersomática, que confiere una rigidez absoluta al segmento intervenido.

Por otra parte existe el hecho de que una agresión importante (no quirúrgica) del disco intervertebral (discitis) produce en él una reacción inflamatoria que puede llevar a la fusión de los cuerpos vertebrales afectados. Claro está que en este caso la infección habría provocado lo que el cirujano provocaría en la artrodesis quirúrgica, es decir, dejar unas superficies óseas cruentas en contacto.

Parece ser pues, que una premisa fundamental para conseguir la artrodesis intersomática sería la erosión de los platillos vertebrales, al menos en parte, para dejar hueso subcondral al descubierto.

Esto puede realizarse actualmente sin necesidad de una gran cirugía, por medio del abordaje percutáneo del disco.

Una vez conseguido el lecho óseo adecuado para que pueda producirse la unión, podemos proceder de dos formas: dejarlo sin más, en espera de que el hematoma que se formará entre las superficies cruentas se organice y evolucione, como un callo de fractura, hacia la osificación, o podemos inducir esta osificación mediante un substrato inductor.

El substrato inductor óseo que actualmente parece tener más vigencia es la Proteína Morfogenética Osea (B.M.P.) y en menor intensidad la Matriz Osea Desmineralizada (D.B.M.), obtenida de hueso cortical y de la que se obtiene la B.M.P.

Existen otros substratos capaces de provocar osificación allí donde son colocados, entre los cuales cabe citar el periostio autólogo, sobre todo si ha sido previamente estimulado.

De todo esto podría deducirse la posibilidad de una artrodesis intersomática por vía percutánea, mediante un proceso de inducción ósea, en un terreno previamente preparado (cruentación).

Pero a este proceso se le plantean algunas preguntas:

- ¿Hasta dónde debemos llegar con la agresión al disco?
- ¿Podría provocarse una inducción ósea en un disco al que se le ha provocado una agresión mínima?

Por otra parte, siempre que se plantea el problema de la inducción ósea son varias las preguntas que surgen al respecto:

- 1.- ¿Qué substrato inductor utilizaremos?
- 2.- ¿Dónde vamos a provocar la inducción?
- 3.- ¿Qué técnica utilizaremos para colocar el substrato inductor en el lugar adecuado?
- 4.- ¿Con qué fin efectuaremos la inducción ósea?

Estas preguntas tienen respuestas diferentes según sea la situación en que vayamos a desarrollar el problema. En nuestro caso, se trata del problema teórico de inducir la osificación dentro de un disco intervertebral, con la mínima agresión posible, por lo que las respuestas a las preguntas serían respectivamente, las siguientes:

- 1.- Matriz ósea desmineralizada (D.B.M.) y periostio
- 2.- En el disco intersomático de la columna vertebral
- 3.- Abordaje percutáneo
- 4.- Conseguir una fijación del segmento vertebral

En las páginas siguientes haremos un repaso de la situación actual de los distintos elementos del problema expuestos en las respuestas a las preguntas iniciales.

1.2 LA INDUCCION OSEA

Es un hecho conocido que puede provocarse la formación de hueso nuevo, tras la implantación de diferentes tejidos orgánicos y sustancias orgánicas e inorgánicas en el mismo hueso (forma ORTOTOPICA) o fuera de él (forma HETEROPTOPICA). Lo que ha suscitado verdaderas controversias ha sido determinar si este hueso nuevo producido lo ha sido por elementos celulares con potencial osteogénico preexistentes, lo que parecería lógico cuando el implante es ortotópico o si por el contrario el hueso nuevo ha sido formado por células indiferenciadas derivadas del tejido conectivo debido a un proceso de "inducción"; definiendo como "inducción ósea" cuando las células en crecimiento son diferenciadas a células formadoras de hueso por contacto con la sustancia de un tejido trasplantado, lo que parecería más apropiado en el caso de los implantes heterotópicos.

Otro punto de discusión estaría en si las células inducidas serían las del tejido implantado o por el contrario lo serían las del lecho receptor.

1.2.1 RECUERDO HISTORICO

Martín Lagos (94), en la introducción de su extenso trabajo sobre "Obtención experimental de hueso metaplásico" realizado en el Instituto de Medicina Experimental de Madrid y publicado en 1946, hace una revisión histórica del problema:

En ella nos dice que fue Bier en 1924 (15) quien ya intuyó que para la formación de tejido óseo no era precisa la intervención de la célula ósea específica u osteoblasto, sino que las células del tejido conjuntivo en su fase embrionaria son pluripotentes, y por tanto capaces de dar origen a diferentes tejidos procedentes de la misma hoja embrionaria, cuando son inducidas por la acción de determinadas sustancias, si a ello se añaden ciertas condiciones del medio.

Estas ideas llevaron a varios investigadores a plantear trabajos tendentes a demostrar la influencia de una "hormona" o inductor que encauce a la célula embrionaria a su transformación en osteoblasto.

Así Lewander y Annersten consiguen obtener un 22% y un 30% respectivamente de resultados positivos, inyectando en el músculo recto anterior del muslo de conejo un extracto alcohólico de hueso.

Lewander (1938) obtiene el 22% de resultados positivos sobre 70 casos en conejos, repartidos entre la obtención de cartílago si el tiempo de observación era de 10 días y hueso si la observación se prolongaba hasta un mes. En los controles (80 casos) inyectados con solamente alcohol no obtuvo ningún resultado positivo.

Annersten (1941) (5), repitiendo las experiencias de Lewander, usa extracto alcohólico autólogo de tejido óseo, que inyecta en el músculo recto anterior del muslo de conejo. Obtuvo el 30% de resultados positivos sobre 13 animales. En los controles (14 animales) inyectados sólo con alcohol, no obtuvo resultados positivos.

Con extractos homólogos obtuvo un 60% de resultados positivos, mientras que con extractos heterólogos (de ternera) obtuvo el 28% de resultados positivos.

Annersten sostuvo, en cuanto a la naturaleza del extracto, que era soluble en los disolventes de las grasas y probablemente análogo a un esteroide. Por otra parte, empleando extractos alcohólicos de otras sustancias (tendones, hígado, músculo) o con mezclas de alcohol con Ca y P y orina dializada, obtuvo porcentajes de positividad muy por debajo de los obtenidos con los extractos óseos. Esto hizo pensar que realmente existía una positiva influencia de la llamada por Annersten "sustancia inductiva".

Otros autores obtuvieron hueso en diferentes órganos de la economía humana por diferentes medios. Sacerdotti y Fratin (1901) (139) en el riñón, mediante la ligadura de la arteria renal o con presión intermitente de la arteria renal. Neuhoff (1917) (113), trasplantando aponeurosis en contacto con epitelio vesical o ureteral. Copher y Key (1934) (32) y Leriche y Lycinesco (1935) (86), en el músculo, implantando aponeurosis y mucosa vesical. Jung y Sureyya Cemil (1935) (80), con la misma técnica obtienen hueso en el bazo. Todos estos trabajos señalarían que si existiera esta sustancia inductora, ésta no estaría vinculada al hueso, y más bien

tenderían a demostrar que son los trastornos que se producen en el foco de trasplante los que dan lugar a la osificación.

Martín Lagos y Zarapico Romero, en su publicación anteriormente mencionada, describen extensos trabajos experimentales en los que tratan de conseguir los resultados obtenidos por Annersten y Lewander, reproduciendo exactamente sus experimentos, es decir, inyectando en sucesivas series extractos alcohólicos óseos homólogos y heterólogos, soluciones acuosas de alcohol al 40%, soluciones acuosas de ácido sulfúrico, acético y láctico de un ph de 6,5 a 7. Obtienen resultados positivos solamente con las soluciones acuosas de alcohol al 40%, en un porcentaje del 8,04% cuando la inyección se realizaba en el recto femoral.

De estas experiencias dedujeron que no era precisa la presencia de ningún extracto óseo para la formación de hueso, llegando a afirmar en sus conclusiones que "el hueso se forma a expensas de células mesenquimatosas con potencia prospectiva ósea, que permanecen indiferentes hasta que el medio en que existen se modifica, en condiciones favorables a su desarrollo evolutivo".

En 1952 Urist y colaboradores (165) publican un trabajo, ya clásico, en el que detallan las implantaciones de diferentes estructuras orgánicas (médula ósea, hueso esponjoso, hueso cortical, cortical de fractura, periostio y otras) en el interior de la cámara anterior del ojo en ratas, llegando a unas conclusiones entre las que podemos destacar las siguientes:

- La inducción de formación de hueso nuevo se origina de las células del huésped, pero inducidas por contacto con el tejido trasplantado.
- Los implantes de cortical ósea condujeron a escasos depósitos de hueso nuevo en la superficie de los implantes.

-
- Así como el implante de periostio produce hueso compacto sin médula ni tejido esponjoso, los implantes de médula ósea, hueso esponjoso, callo de fractura fibrocartilaginoso, cartílago epifisario y cartílago articular, resultan en la formación de osículos completos, con córtex y médula hematopoyética.

Fue en 1965 cuando Urist (161) publicó un trabajo en el que ya hizo referencia clara a la formación ósea por autoinducción. Para sus experimentos utilizó la matriz ósea descalcificada (D.B.M.), en HCL 0,6 N, de diferentes animales y de donantes humanos. La implantó en el músculo de diferentes tipos de animales de laboratorio y en una serie de implantes en seres humanos como tratamiento de diferentes tipos de alteraciones óseas, tanto con injertos de D.B.M. homóloga como heteróloga (ternera), obteniendo buenos resultados.

Una serie de experiencias diseñadas para determinar el destino de la D.B.M. (en HCL) colocada en un lecho óseo, demostraron que esta matriz es un buen sustituto del injerto óseo. La D.B.M. fue invadida por vasos sanguíneos nuevos y reabsorbida rápidamente. Nuevo hueso fue depositado en cámaras excavadas en la matriz y rellenas de células osteoprogenitoras proliferantes. De este trabajo se deduce que:

Los implantes de D.B.M. estimulan los histiocitos circulantes, células gigantes a cuerpo extraño y células de tejido conectivo inflamatorio, creciendo y repoblando el área del implante. Los histiocitos intervienen en la disolución de la matriz, proceso que es seguido inmediatamente por la formación de nuevo hueso por autoinducción, en la cual tanto la célula inductora como la inducida han derivado de células en crecimiento del lecho del huésped. La célula inductora es un descendiente de un histiocito

circulante, y la célula inducida es un histiocito fijo o célula joven del tejido conectivo perivascular. La diferenciación de la célula osteoprogenitora, según el autor, se realizaría por alteraciones locales en los ciclos metabólicos celulares, las cuales todavía no habían sido caracterizadas.

En 1967, Urist y colaboradores (167) publican un nuevo trabajo titulado "The Bone Induction Principle" en el que ya, de una forma clara, hacen alusión a una "sustancia" que sería la causante del mecanismo de inducción ósea y que ellos llaman "Principio de Inducción Osea" (B.I.P.), describiendo el proceso de inducción ósea de la siguiente forma:

"Cuando la diferenciación celular se atribuye a los efectos físico-químicos de un tejido sobre y en contacto con otro, el mecanismo se conoce como "inducción". Cuando un tejido transmite el B.I.P. (una entidad compleja de carácter desconocido), produce diferenciación a osteoblastos y el proceso se llama "inducción ósea".

El sistema de inducción ósea se compone de células inductoras y células de respuesta. Una célula inductora es aquella que ha tenido contacto con el B.I.P. e induce a una célula de respuesta a diferenciarse en osteoblasto. La célula de respuesta es habitualmente una célula mesenquimal hipertrofiada perivascular y llega a ser una célula inducida cuando se diferencia en osteoblasto, condroblasto o hematocitoblasto.

Una vez un sistema de inducción ósea está establecido, una línea de células inducidas pueden llegar a ser las células inductoras para una nueva línea de células de respuesta. La inducción ocurre en dos

direcciones: centrífugamente, para producir hueso lamelar, y centrípetamente, para producir nuevas células de médula ósea. El proceso continúa hasta que células indiferenciadas producen una gran población de células nuevas especializadas colocadas en forma de órgano. Así, un sistema de inducción ósea es un mecanismo de organogénesis, esto es, de desarrollo de un osículo relleno de médula ósea.

Las células mesodérmicas de los mamíferos, en la vida postfetal, no tienen especificaciones genéticas para desarrollar un hueso de otra forma que no sea una simple esfera. El volumen de la esfera está determinado por el volumen del implante de material inductor."

De los trabajos realizados con matriz ósea desmineralizada y liofilizada, se desprenden dos conclusiones que son de interés para este trabajo:

El B.I.P. persiste en la matriz orgánica de tejido óseo que ha sido desprovista totalmente de células vivas por los procesos de descalcificación.

El B.I.P. no es una sustancia soluble y difusible.

En este trabajo, Urist todavía no habla de la "Proteína Morfogénica Osea", elemento fundamental en el mecanismo de inducción ósea y que años más tarde sería identificado con el B.I.P., pero que después de trabajar sobre inducción ósea a través de membranas de Millipore, establece que:

"Hoy en día parece que el B.I.P. no es una sustancia libremente

difusible, y que normalmente se mueve a través de una sustancia de base, solamente por cortas distancias a lo largo o entre membranas celulares o de extensiones citoplasmáticas pseudopodales".

Otro aspecto muy importante del trabajo de Urist es el marcaje con radioisótopos (^3H -timidina) inyectados a las cuatro semanas de la implantación de D.B.M. en el recto abdominal, apreciándose que:

- A las 72 horas de la inyección del radioisótopo, los núcleos de muchas células del tejido conectivo perivascular estaban marcadas con ^3H -timidina.
- 96 horas después de la inyección, el marcador se encontró, no sólo en el tejido conectivo perivascular y en las células mesenquimales, sino también en los osteoblastos alineados en las laminillas del nuevo tejido óseo. También habían, ocasionalmente, osteocitos con el núcleo marcado.

Estos resultados demuestran que las células de respuesta en el sistema inductor para formación de nuevo hueso, en el interior de un implante de D.B.M. liofilizada, son células de tejido conectivo perivascular.

1.2.2 CONDICIONES PRECISAS PARA LA INDUCCION OSEA

Chalmers y colaboradores, en 1975 (24), realizaron una serie de observaciones en la inducción ósea en tejidos blandos, trabajando con D.B.M. (en HCl) de conejo e implantada homológamente. Observaron que el músculo y la fascia permitieron con regularidad la inducción ósea, mientras que el bazo, hígado y riñón suprimieron la inducción ósea. Si la matriz ósea que se implantaba en bazo, hígado o riñón se acompañaba de un trasplante fresco y viable de fascia autóloga (tejido fibroso), la osificación en el interior de estos órganos se producía en un 90% de los casos. Por otra parte la fascia autóloga sola, implantada en estos órganos, no produjo osificación.

Otra observación interesante es el hecho de que si el injerto de matriz ósea desmineralizada, antes de ser trasplantada en la musculatura estriada, es trasplantada durante un tiempo en el bazo del animal, esta matriz pierde su capacidad para inducir la osificación en el músculo, lo que indicaría que la matriz, al pasar por el bazo, habría sido modificada.

A partir de estas observaciones, Chalmers y colaboradores sugieren que para que la inducción ósea en tejidos blandos se produzca han de darse tres condiciones:

- La presencia de un agente inductor
- La presencia de precursores celulares osteogénicos
- Un terreno favorable, en el cual sea permitida la osteogénesis

De la misma forma, defienden la existencia de inhibidores osteogénicos en el bazo, hígado y riñones.

Urist, en 1990 (162), afirma que la formación ósea heterotópica inducida de forma experimental sugiere que las células con capacidad de diferenciación se encuentran en cualquier lugar del tejido conectivo perivascular en la vida postfetal.

1.3 LA MATRIZ OSEA DESMINERALIZADA (D.B.M.) COMO SUBSTRATO INDUCTOR DE LA OSIFICACION

1.3.1 RECUERDO HISTORICO

La primera noticia documentada de que se dispone sobre la utilización de la D.B.M. se debe a los trabajos experimentales de Senn en 1889 (147), en los que rellenaba defectos óseos con hueso heterólogo previamente tratado con ácido clorhídrico diluido. En ellos el autor aboga por la superioridad del hueso descalcificado como el mejor sustituto de los injertos de hueso vivo en la restauración de las pérdidas de sustancia ósea.

En 1890, Miller (102), siguiendo las técnicas de Senn, rellena una cavidad en la metafisis proximal de la tibia, residual a una osteitis crónica previamente desbridada, con hueso de costilla de buey descalcificado con ácido clorhídrico y reducido a virutas.

Ray y col. en 1957 (126), trabajando sobre defectos de calota craneal en ratas, llega a la conclusión de que la matriz ósea desmineralizada en ácido etilén diamino tetra acético (EDTA) rellena los defectos óseos de forma más completa que el hueso homólogo congelado y el hueso desproteínizado (estructura inorgánica).

Contrariamente, Young, en 1964 (181), trabajando en defectos craneales en conejos, con hueso entero homólogo congelado, hueso descalcificado con EDTA

o hueso desproteínizado, obtiene los mejores resultados con el hueso entero, seguido del hueso desproteínizado y obteniendo el peor resultado con el hueso descalcificado.

En 1965 Van de Putte y Urist (170) presentan su trabajo sobre osteogénesis en el interior de implantes intramusculares de matriz ósea desmineralizada con diferentes sustancias, observando que los implantes fueron infiltrados por células de tejido conectivo inflamatorio con nuevos vasos sanguíneos a las pocas semanas de la intervención, siendo absorbida la matriz rápidamente en un período de 3 a 12 semanas. El tejido donante es completamente acelular, con las lagunas osteocíticas vacías.

Al parecer, el hueso se depositaba sobre la superficie de la vieja matriz, sobre una interfase muy fina de sustancia cementante. La osteogénesis no se produce en el exterior del implante, solamente en el interior del mismo y nunca en el músculo de alrededor. En algunas partes del implante aparecieron áreas de nuevo cartílago.

El resultado final de todo este proceso de reabsorción y reemplazamiento fue la creación de un "osículo" completo, con hueso cortical en el exterior, esponjosa y médula ósea en su interior, debido a un mecanismo de osificación endocondral en los nódulos de cartílago nuevo.

El ácido que se empleó en la descalcificación del hueso tuvo una importancia capital en la aparición de hueso nuevo; así las muestras descalcificadas con ácido nítrico no indujeron osificación, provocando una reacción inflamatoria intensa que desintegraba rápidamente el implante. Las muestras descalcificadas con ácido clorhídrico diluido formaron hueso en un 90% de los casos.

1.3.2 OBTENCION DE MATRIZ OSEA DESMINERALIZADA (D.B.M.)

Existen multitud de compuestos orgánicos que implantados en un huésped pueden desencadenar todo el proceso de la inducción ósea.

Urist y colaboradores, en 1968 (164), publican un trabajo en el que estudian varios de estos compuestos orgánicos, llamados por ellos "substratos inductivos", llegando a las siguientes conclusiones:

- a.- Pueden prepararse potentes substratos inductivos de matriz de tejidos duros y materiales extracelulares de tejidos blandos por:
 - Descalcificación de la matriz en HCl en frío, de forma que se preserve la sustancia cementante y se minimice la desnaturalización de las proteínas
 - Liofilización para preservar la matriz y prevenir la contaminación bacteriana
 - Irradiación con Co^{60} con 0,2 Mrads o menos, para reducir la antigenicidad

- b.- Para obtener resultados reproducibles, es necesario evitar la exposición de la matriz a:
 - EDTA y otros agentes quelantes que extraen la sustancia cementante, y sialoproteínas óseas.
 - Sepsis y antígenos xenogénicos, los cuales envuelven al substrato inductivo con una barrera reticuloplasmática.
 - Altas concentraciones de hidrogeniones o soluciones acidificadas de

-
- alcohol que destruyen la estabilidad interna de las moléculas proteicas y producen transformación, desnaturalización o gelatinización de las proteínas.
- Agentes físicos tales como las radiaciones Gamma cuando sobrepasan los 0,2 Mrads o ultrasonidos con energía de alta frecuencia.

 - c.- Los substratos inductivos preparados de matrices autólogas, homólogas y heterólogas, que son liofilizados antes de la implantación, son altamente activos, pero difieren en los intervalos de tiempo para la formación de los depósitos iniciales de hueso después de la implantación.

 - d.- Los substratos irradiados con Co 60 con dosis menores de 0,2 Mrads, tienen una respuesta inmune disminuida y una actividad inductiva más tempranamente manifiesta.

 - e.- Los substratos inductivos preparados de material xenogénico producen pequeños depósitos óseos en menos del 5% de los implantes y están siempre asociados a reacciones citotóxicas y purulentas, las cuales interfieren en la diferenciación de nuevo hueso.

La obtención de la matriz ósea desmineralizada (D.B.M.) es básicamente un proceso de descalcificación total de hueso cortical obtenido de diáfisis de huesos largos, al que previamente se le ha extirpado todo resto de tejidos blandos y limpiado el canal medular de todo resto de médula ósea. Este hueso cortical se somete a la acción de una solución ácida, que en la mayoría de los casos es de ácido clorhídrico a una concentración 0,6 N, en frío (4°C), durante 24 horas o

más dependiendo de la cantidad de hueso cortical a descalcificar, renovando diariamente la solución de HCl. Posteriormente los huesos son lavados y conservados por cualquiera de las múltiples técnicas existentes (Nilson y col. (115), Urist y col. (167)).

La composición del hueso cortical es aproximadamente de un 70% de material inorgánico (sales cálcicas fundamentalmente) y un 30% de materia orgánica; una vez extraídas las sustancias solubles en agua y en cloroformometanol, el peso seco de la matriz libre está compuesto en un 80% de colágeno óseo, 10% de proteínas no colágenas y un 2% de sustancias no determinadas.

La D.B.M. produce nuevo hueso en cantidades proporcionales a la cantidad de tejido implantado (dosis-dependiente) (Urist y col. (164)).

Para evaluar la capacidad osteoinductiva de la D.B.M. y de compuestos de ella y otras sustancias, Huang y col.(69) proponen un sistema basado en sus experiencias con cultivos celulares in vitro. Los autores introducen polvo de D.B.M. en un cultivo celular en el que se encuentran células de osteosarcoma murino a diferentes concentraciones y fibroblastos periósticos, produciéndose un aumento significativo de la proliferación celular en comparación con los controles. El efecto pico fue en el segundo día para las células de osteosarcoma murino, y el cuarto día para los fibroblastos. Estos aumentos en la proliferación celular pueden ser cuantificados y servir como referencia para otros preparados de D.B.M.

Parece, pues, establecido que la matriz ósea desmineralizada es uno de los mejores substratos inductores para la producción de hueso, tanto en implantes ortotópicos como heterotópicos.

1.3.3 TAMAÑO DEL IMPLANTE Y SU RELACION CON LA RESPUESTA

Urist y col.(163), trabajando con matriz ósea inviable, descalcificada en HCl al 0,6 N en frío a 2°C por períodos de menos de ocho días, y empleando diferentes tamaños de partículas, obtiene los siguientes resultados:

Muestras de varias formas y tamaños, de 1m/m o mayores en volumen, producen nuevo hueso, en cantidad proporcional a la masa de la matriz implantada.

Partículas de 420 micras, cuando son implantadas de forma dispersa, solamente inducen la aparición de macrófagos, células mononucleares y células gigantes multinucleares, pero no la formación de nuevo hueso. En cambio cuando son implantadas agregadas en forma de pastilla de 12m/m de diámetro y 3m/m de espesor, éstas son repobladas por células mesenquimales que se diferencian en nuevo hueso.

Las pastillas formadas por partículas de D.B.M. de 125 micras no producen hueso, no así las de 250 micras que sí producen la formación de hueso.

Otros autores también emplean la D.B.M. reducida a polvo, con partículas de tamaño comprendidas entre 75 y 500 micras, obteniendo buenos resultados en la osteoinducción (9,49,75,103,155).

Esto vendría a demostrar la importancia del tamaño del fragmento de D.B.M. empleado en el implante, en vistas a la cantidad de hueso o al tamaño del osículo al que dará lugar, y también a establecer el tamaño mínimo que debe tener el fragmento de D.B.M. para que de lugar a los fenómenos de inducción ósea.

1.3.4 LA D.B.M. Y EL ANIMAL DE EXPERIMENTACION

Muchos son los trabajos publicados en las últimas dos décadas sobre el uso de la D.B.M. en animales de experimentación, ya sea sola o en combinación con otros elementos, tanto orgánicos como inorgánicos, para la obtención de hueso en implantaciones ortotópicas o heterotópicas (157).

Coulson, en 1983 (33), elaboró una serie de índices de actividad metabólica (MAI), basados en el hecho de que el metabolismo es diferente según las especies. Otorgó el índice de referencia "1" al hombre, siendo el del perro muy similar al humano, "1,58", y el de la rata de "5,15".

Los implantes de D.B.M. homóloga dan lugar a baja producción ósea en ratones adultos, alta producción en ratas, muy baja producción en cobayas, alta producción en conejos, baja producción en perros y muy baja o nula en monos.

La mayoría de los trabajos que se efectúan con D.B.M., se realizan con animales de laboratorio de pequeño tamaño; en general se utilizan las ratas y los conejos.

Cuando se han utilizado animales de mayor tamaño, las comunicaciones de fracasos en la inducción ósea únicamente con D.B.M. aumentan de forma

considerable, ya sean los animales usados monos, perros o corderos (7,9,38,127,130,146,155).

1.3.5 DESCALCIFICACION PARCIAL DE LA D.B.M.

Evidentemente, el hueso descalcificado pierde todas sus propiedades de dureza, por lo que no puede emplearse para rellenar pérdidas de sustancia en huesos que deban soportar esfuerzos mecánicos sin un andamiaje que absorba estas fuerzas. En un estudio experimental realizado en 1991 por Itoman y Nakamura se demuestra que el hueso descalcificado en HCl diluido es extremadamente débil para soportar fuerzas de compresión. Mucho menor que los demás especímenes de hueso sin descalcificar (73).

En 1967 Dubuc y Urist (41) presentan un trabajo sobre descalcificación parcial superficial del hueso, obteniendo una matriz ósea descalcificada parcialmente, con un contenido del 90% del hueso mineral, que mantiene intactas las propiedades osteoinductivas, pero que por otra parte aumenta extraordinariamente su resistencia a las fuerzas de compresión. Otros autores han realizado parecidas experiencias, variando la cantidad de mineral en la D.B.M. resultante, con los mismos resultados (53,56).

1.3.6 D.B.M. Y METODOS DE ESTERILIZACION

Los métodos de esterilización empleados en la preparación de los implantes de D.B.M. tienen efectos más o menos importantes sobre la actividad

osteointductiva del injerto.

Munting y col.(1988) (105) realizaron un estudio con D.B.M. previamente sometida a esterilización con varios agentes químicos y físicos, llegando a las siguientes conclusiones.

- El glutaraldehido en líquido, el formaldehido en gas y el óxido de etileno, destruyen totalmente la capacidad osteointductiva del implante.
- El merthiolate no reduce la capacidad osteointductiva del injerto, pero no es esporicida.

Sigholm y col. (1992) (149), por su parte, rechazan los resultados del trabajo de Munting sobre el óxido de etileno, afirmando que no tiene influencia sobre la osteoinducción.

Otros autores utilizan la esterilización en óxido de etileno en sus implantes, sobre todo cuando éstos han sido liofilizados, sin destacar influencias negativas sobre la osteoinducción (84,155).

La irradiación gamma con Co^{60} produce un efecto de disminución de la osteointductividad por debajo de ciertas dosis, alrededor de los 25 KGy. Por encima de esta dosis la osteoactividad quedaría totalmente abolida y el implante sería absorbido sin producir hueso nuevo (42,105,144). No obstante, si la irradiación se produce a bajas temperaturas (-72°C) los efectos sobre la osteoinducción parecen minimizarse, de lo que se desprende que la temperatura durante la irradiación juega un papel crítico en la protección contra el daño por irradiación (42).

La D.B.M. permite la liofilización como forma más cómoda de almacenamiento y conservación, sin que por ello queden afectadas sus propiedades osteoinductivas (9,38,41,42,84,127,144,146,155,163).

1.3.7 D.B.M. Y EDAD DEL RECEPTOR

La edad del animal receptor tiene un papel fundamental en la respuesta osteoinductora. Implantes únicamente de D.B.M. con células embrionarias homólogas o con células de médula ósea, producen una respuesta muy disminuida o ausente de osteoinducción cuando son implantadas en animales viejos, con respecto a la misma implantación realizada en animales más jóvenes. Por otra parte, la D.B.M. obtenida de animales viejos e implantada en animales jóvenes obtuvo una respuesta similar a los controles implantados con D.B.M. de animales jóvenes (75,116,154). Estas observaciones defenderían la teoría de que las células de respuesta al estímulo inductor serían aportadas por el receptor del implante.

1.3.8 POTENCIACION DEL EFECTO OSTEOINDUCTOR DE LA D.B.M.

Con el objeto de aumentar la capacidad para la osteoinducción, en los últimos años han aumentado considerablemente los trabajos en los que se utiliza la D.B.M. mezclada con otros elementos potencialmente favorecedores de la osificación.

Se ha comprobado que la práctica de perforaciones en el bloque de D.B.M. implantado induce múltiples centros de osteogénesis endocondral, con la consiguiente reabsorción de la matriz y su reemplazamiento por nuevo hueso de forma más acelerada (48,149).

Hult y col. (1988) utilizan la matriz descalcificada de callo de fractura de varios días de evolución, y la implanta en ratas de forma heterotópica. Como controles utiliza D.B.M. de la misma rata. Los resultados demuestran un mayor poder osteoinductivo de la matriz de callo de fractura especialmente de la que se obtuvo a los ocho días de la fractura (70).

1.3.8.1 D.B.M. y médula ósea autóloga

Uno de los elementos que se están utilizando en estos trabajos es la médula ósea, la cual de por sí, implantada sola, ya sea dentro de cámaras de difusión en el músculo o en defectos óseos, produce hueso y tejido fibroso (14,153).

También se ha publicado últimamente el uso de aspirado de médula ósea autóloga para solucionar pseudoartrosis en tibias de pacientes humanos, inyectada percutáneamente en el foco de pseudoartrosis (31).

La unión de la D.B.M., generalmente homóloga, con médula ósea autóloga, ha sido usada para solucionar pseudoartrosis experimentales en perros mediante inyección percutánea, con un buen resultado (155).

Cuando se implanta D.B.M. homóloga junto con médula ósea autóloga de

forma heterotópica, se obtienen mejores resultados que solamente con la D.B.M. (62,108).

El empleo de D.B.M. heteróloga (humana y de cobaya) para reparar defectos óseos en conejos, unida a médula ósea autóloga, también ha dado buenos resultados (57).

1.3.8.2 D.B.M. y proteínas morfogenéticas óseas (BMP)

Aspenberg y col.(1992) utilizan una proteína morfogenética ósea recombinante humana para mezclarla con D.B.M. homóloga y conseguir así osificaciones heterotópicas en monos, donde la D.B.M. sola había fracasado (9).

De la misma forma, Ripamonti y col. (1992) utilizan osteogenina (proteína iniciadora de la osteoinducción ósea) para mezclarla con D.B.M. homóloga en monos, consiguiendo la inducción ósea heterotópica (130).

Risto y col. (1991) utilizan un factor de crecimiento derivado de las plaquetas, con el cual perfunden, de forma continua con bomba de infusión, durante dos semanas, "in situ", un injerto de D.B.M. implantado heterotópicamente en la rata, obteniendo un aumento del peso en seco de la osificación producida en comparación con los injertos no perfundidos (131).

1.3.8.3 D.B.M. y otros tejidos orgánicos

La adición de fibrina a la D.B.M. implantada tanto ortotópica como heterotópicamente, no influye de forma positiva ni negativa en la osteoinducción (145).

El colágeno tipo I, implantado por si solo, solamente produce escasos depósitos de calcio (153); pero implantado juntamente con D.B.M. estimula la inducción ósea producida por ésta (92,106).

1.3.8.4 D.B.M. y materiales inorgánicos

Otros materiales no orgánicos han sido empleados juntamente con la D.B.M. con fines diferentes.

Varlet y col.(1985) implantan en el animal de experimentación D.B.M. incluida en bolas de "plâtre de París" mezclada con antibióticos, comprobando que se mantenían intactas las propiedades osteoinductoras de la D.B.M. (171).

Alper y col.(1989), en un trabajo muy interesante sobre implantaciones de D.B.M. y hidroxiapatita en pseudoartrosis de radio en ratas, llegan a la conclusión de que cuando se une la hidroxiapatita a la D.B.M., la capacidad osteoinductiva de ésta última se ve inhibida por la primera (3).

Lo mismo sucede cuando la D.B.M. se implanta junto a materiales plásticos (Dacron, Goretex) (160).

Solheim y col (1992) utilizan un compuesto de un polímero biodegradable con D.B.M. en polvo para rellenar defectos óseos en ratas, obteniendo mejores resultados que con la D.B.M. sola. El polímero por sí sólo no produjo osificación (151).

1.3.9 LA D.B.M. "IN VITRO"

Cuando se añade la D.B.M. a cultivos de células de médula ósea o de células con propiedades osteoblásticas (fibroblastos periósticos, células de osteosarcoma), ésta produce un aumento de la proliferación de las mismas en comparación con los controles (46,69).

1.3.10 LA D.B.M. Y LAS REACCIONES DE ANTIGENICIDAD

El uso de injertos heterólogos de D.B.M. en la rata y el conejo produce una reacción inflamatoria intensa que evita o minimiza la osteoinductividad, es decir, parece existir una relación especie-específica en la osteoinducción.

Para disminuir esta reacción algunos autores han propuesto realizar una purificación parcial de la D.B.M. hasta conseguir un compuesto parcialmente purificado de proteínas inductoras óseas, que combinado con un transportador (hueso desmineralizado tripsinado inactivo) induce la respuesta de formación ósea obviando la reacción de antigenicidad y comportándose como un injerto homólogo (109).

Para poder valorar las propiedades inductivas de la D.B.M. de diferentes especies animales, Aspenberg y col.(1988) sugieren el empleo de ratas atímicas, en las cuales las reacciones de inmunidad están muy alteradas (8).

Otros autores abogan por la utilización de "Chemosterilized Antigen-Extracted Autodigested Alloimplant" (A.A.A.), hueso tratado mediante un proceso de extracción de lípidos, autodigestión enzimática de antígenos trasplantables, respetando las proteínas morfogenéticas óseas y congelación en seco, obteniendo una matriz ósea de baja antigenicidad que favorecería la respuesta osteoinductora (67,127,128,166).

1.3.11 LA D.B.M. EN PATOLOGÍA HUMANA

El uso de la D.B.M. en patología humana está bien documentado y se reduce casi siempre su empleo al relleno de cavidades óseas, ya sea con D.B.M. heteróloga (Senn y Miller) (147,102) ya sea con matriz ósea homóloga descalcificada parcialmente (Decalbon), en el tratamiento de quistes óseos y tumores benignos (53). También ha sido propuesto su empleo en cirugía maxilofacial para el tratamiento de defectos congénitos o adquiridos, mediante D.B.M. homóloga de banco de huesos (52).

Aspenberg y Andolf (1989) usaron D.B.M. humana de donantes adultos y de fetos, implantándola en ratas atímicas, y obtuvieron la misma cantidad de hueso independientemente de la procedencia del injerto (6).

Nolan y col (1992) demuestran la posibilidad de repoblar la D.B.M. humana con osteoblastos procedentes de un cultivo de células obtenidas de hueso

esponjoso, sugiriendo la posibilidad de realizar un implante de D.B.M. humana, repoblado con osteoblastos autólogos. Para ello sería preciso extraer con cuatro semanas de antelación un pequeño fragmento de hueso trabecular del futuro receptor y cultivar los osteoblastos de él obtenidos en la D.B.M. que será implantada (117).

1.4 PROTEINA MORFOGENETICA OSEA (B.M.P.)

1.4.1 RESUMEN HISTORICO, AISLAMIENTO Y CARACTERISTICAS

La actividad osteogénica del hueso parece estar inducida por un componente proteico de la matriz ósea, denominado por Urist "Bone Morphogenetic Protein" (B.M.P.) (168).

Los esfuerzos para aislar este componente no dieron resultado hasta Hanamura y col. (1980), que consiguieron aislarla con su actividad osteogénica intacta a partir de osteosarcoma murino y de D.B.M. de rata. Posteriormente se consiguió aislar B.M.P. de matriz ósea bovina, porcina, humana y de varios osteosarcomas (61).

El aislamiento de la B.M.P. se realiza a partir de hueso sólido (diáfisis de huesos largos), que debe convertirse en matriz ósea, libre de agua, grasa y hueso mineral. Para ello se reducen las piezas óseas (congeladas previa mente en nitrógeno líquido) a pequeños fragmentos, que son desmineralizados, desgrasados y secados en frío. A partir de esta matriz ósea desmineralizada y por complejos pasos de extracción química y purificación cromatográfica se obtiene la B.M.P., que dependiendo de los pasos seguidos tendrá un mayor o menor grado de purificación, es decir, que irá acompañada de mayor o menor cantidad de proteínas no colágenas.

El rendimiento del procedimiento es muy bajo, puesto que la B.M.P. es una

proteína no colágena de la matriz ósea y sabemos que éstas entran en un 10% en la composición de la matriz. Así por ejemplo, de un peso húmedo de 2 kg de hueso de ternera (cortical), al final del proceso se obtienen 270 mg de B.M.P. poco purificada (B.M.P. con proteínas no colágenas) (2,36,162).

La respuesta morfogenética ósea a la B.M.P. va a ser del "todo o nada" y el producto final será un osículo esférico relleno de médula ósea (36,162).

La actividad osteogénica de la fracción B.M.P. bovina, humana y porcina, ha sido demostrada en ratas, por lo que se puede considerar que no es especie-específica (81,13) al menos en estos animales. En el perro, existen estudios que contradicen esta afirmación y parecen indicar que sí existe una relación especie-específica (64,77).

La B.M.P. de origen endocondral y la de origen membranoso no mostraron diferencias significativas en la respuesta osteoinductiva ni en el desarrollo de médula ósea (72).

En 1988 Wozny y col., clonan los genes de cuatro formas de B.M.P. humana y producen una B.M.P. recombinante humana (rh B.M.P.) mediante sistemas en mamíferos y células bacterianas (e. coli) (176).

Yasko y col. (1992), trabajando con rhB.M.P.2, inducen la formación de hueso en defectos femorales de ratas, en forma dosis-dependiente (179).

La B.M.P. es difícil de mantener en el lugar de la implantación y sobre todo es difícil que se produzca una liberación lenta de la misma. Es por ello que últimamente se publican muchos trabajos sobre investigación en sustancias

transportadoras-liberadoras que unidas a la B.M.P. favorezcan su acción, ya sea colágeno (92), proteínas no colágenas (77), hueso esponjoso autólogo (77,76) o hidroxiapatita (51,68,129,159,177).

La B.M.P. humana ha sido usada con éxito en pacientes con amplios defectos óseos, generalmente asociada a hueso autólogo esponjoso (162,76).

En la literatura reciente, los nombres de proteína osteoinductiva, osteogenina y osteopoyetina, han sido sustituidos por B.M.P. (162).

1.5 EL PERIOSTIO COMO INJERTO CON POTENCIAL INDUCTOR DE LA OSIFICACIÓN HETEROTOPICA

1.5.1 RECUERDO HISTORICO

La historia del trasplante perióstico se inicia en los trabajos de Ollier (1867). Este autor no alcanzó la formación ósea en todos sus experimentos. Sospechó que había fallado al no incluir la capa profunda del periostio (cambium) en aquellos casos en que no ocurrió la formación ósea (119).

Leriche y Policard (1928) creyeron que Ollier, en su gran inquietud por producir hueso, incluyó fragmentos del mismo arrastrados al extraer el periostio. Ellos no creyeron en la capacidad osteogénica del periostio (85).

Brown y Brown (1913) fueron incapaces de reproducir hueso con periostio libre trasplantado en tejido subcútaneo y músculo en perros (19).

McWilliams (1914) señala que el periostio trasplantado puede producir hueso vivo, sustentando esta afirmación con experimentos en animales (100).

En el mismo año (1914) Phemister publicó sus trabajos sobre el estudio del hueso, afirmando que "el trasplante de periostio no produce formación de hueso nuevo o lo hace en pequeña cantidad" (123).

Davis y Hunnicutt (1915) realizaron estudios experimentales con 16 perros y 5 conejos, pero sus trasplantes de periostio libre no produjeron hueso en la gran mayoría de los experimentos. Tampoco ninguno de sus injertos pediculados consiguió producir hueso (37).

Klinkerfuss (1924) realizó un estudio con periostio de callo de fractura, en el cual estableció que el injerto de callo óseo forma hueso más rápidamente y en mayor cantidad que los trasplantes de hueso sólido (82).

Rohde (1925), en su estudio sobre metaplasia, probó el poder de regeneración vigorosa del periostio obtenido del callo de fractura (135).

Burman y Umansky (1930) extirparon injertos libres de periostio de la tibia de conejos jóvenes e insertaron el injerto alrededor del tendón del músculo tibial anterior. Sus resultados mostraron que no había formación ósea si el "cambium" estaba ausente. Con esta capa profunda del periostio presente se producía nuevo y típico hueso parostal (21).

Fell (1932) consiguió osificación con periostio de huesos de embriones de pollo "in vitro" (44).

Haldeman (1933) estudió diferentes injertos óseos e injertos de periostio libre en conejos. El periostio le pareció ser la parte más importante del injerto óseo con respecto a la unión del hueso fracturado y la supervivencia del injerto (60).

Küntscher (1949), en su libro sobre el enclavado endomedular, defiende la capacidad formadora de hueso del periostio previamente estimulado mediante el enclavado intramedular (proceso inflamatorio), llegando a afirmar que "el

futuro de todo injerto óseo está en manos de la capacidad inductora del periostio" (83).

En 1952, Urist y McLean, trabajando con implantes en la cámara anterior del ojo de la rata, llegan a la conclusión de que el periostio contiene células con potencial osteogénico y que este potencial es específico para la formación de tejido óseo compacto sin la correspondiente producción de cartílago y médula hematopoyética.

En otra parte del trabajo realizaron trasplantes de periostio de foco de fractura, de forma autógena, observando que se obtiene el mejor resultado con el periostio de fractura de 72 horas de evolución, y que a las 92 horas después de la fractura ya se había iniciado la osificación alrededor de la fractura, por lo que el trasplante de periostio ya no era valorable (165).

Cohen y Lacroix (1955), trabajando con conejos sobre el potencial osteogénico del periostio, observaron diferencias considerables en la osteogénesis dependiendo de la edad del animal y del carácter del lecho receptor utilizado. Así observaron que el trasplante sobre hueso fue el más productivo, seguido del trasplante en cápsula renal y, del trasplante en cámara anterior del ojo (29).

Mucho más recientemente, J. Domingo Pech (1972) realizó un admirable trabajo experimental con perros, en los cuales producía un defecto óseo localizado en el fémur, realizando una síntesis estable de los fragmentos óseos y trasplantando periostio previamente hipertrofiado (estimulado), mediante el enclavado endomedular de otro hueso con un clavo de azufre en el lugar del defecto óseo. Llegó a la conclusión de que es posible hipertrofiar el periostio en un hueso a través de métodos químicos y que también es posible trasplantar este periostio

hipertrofiado a otro lugar del organismo y que en su nuevo lecho produzca hueso (39,40).

Ritsilä y col. (1972), trasplantan periostio de tibia y de cráneo en conejos, implantándolos heterotópica y ortotópicamente. Comunican la formación de hueso nuevo en todas las series. La mejor respuesta la obtuvieron en los trasplantes ortotópicos. En los heterotópicos el mejor resultado lo obtuvieron en músculo. El periostio de cráneo formó menos hueso y estructuralmente diferente al periostio de tibia (134).

Ritsilä y Alhopuro (1973) consiguen, en conejos jóvenes, la formación de hueso mediante el trasplante de periostio autólogo en defectos creados en la tráquea. El hueso así obtenido se asemejaba más a hueso membranoso que a hueso tubular, de donde procedía el periostio (132).

Uddströmer y Ritsilä, (1978) trabajando con conejos, injertan periostio de tibia en defectos craneales y periostio de calota craneal en defectos de tibia, obteniendo en ambos casos el relleno de los defectos, pero a diferente velocidad. Llegaron a la conclusión de que existen diferencias entre el periostio de hueso largo y el de hueso membranoso con relación a la cantidad de hueso formado, y que las demandas funcionales parecen influir en el tipo de formación ósea y la estructura final del nuevo hueso (158).

Poussa y Ritsilä (1979), interponiendo en el arco posterior de una vértebra de conejo joven, a ambos lados de la apófisis espinosa y entre ésta y la apófisis mamilar, a un lado periostio libre y al otro injerto osteoperióstico, obtenidos de la tibia, comprueban que el injerto de periostio libre presenta una respuesta osteoformadora más rápida que el injerto osteoperióstico. En ambos casos el

nuevo hueso ha sido formado por las células osteogénicas del "cambium" (124).

Padilla y col. (1981), trasplantando periostio a la serosa intestinal de un segmento de intestino delgado desfuncionalizado y con doble enterostomía cutánea, obtienen la formación de hueso joven con gran actividad osteoblástica a partir del primer mes. Posteriormente constataron la presencia de tejido óseo adulto bien conformado (121).

Jaroma y Ritsilä (1988), trabajando con periostio introducido en cámaras de difusión con diferente tamaño de poro e implantadas en la musculatura paraespinal del conejo, llegaron a la conclusión de que el tamaño de los poros del filtro influye significativamente en la condrogénesis y osteogénesis inducida por el periostio. No observaron en ningún caso crecimiento óseo ni cartilaginoso fuera de las cámaras (74).

Por otra parte existen trabajos que demuestran que el periostio trasplantado en un defecto osteocartilaginoso, dentro de una articulación, responde formando nuevo tejido óseo que rellena el defecto con una cubierta de tejido cartilaginoso, que a la larga es muy difícil de diferenciar del cartílago normal. Este resultado se justifica por el hecho de que las células del periostio, en presencia de una tensión de oxígeno alta (hueso esponjoso epifisario), producen hueso, mientras que en un ambiente con baja tensión de oxígeno (interior de la articulación), producirían cartílago. (Niedermann y col) (1985) (114).

Guijarro Jorge y col. (1989) demuestran que es posible estimular la osteogénesis mediante la bioestimulación con láser infrarrojo de 904 Nm, en injertos de periostio para cubrir defectos traqueales en animales de experimentación (55).

Li y col. (1989) implantaron periostio tibial en la pared abdominal de conejos, en un lado solamente el injerto y en el otro añadiendo al injerto un "coágulo". Obtuvieron la formación de hueso, observando que la osteogénesis era mayor con periostio de animal joven que de adulto, y que el periostio al que se le añadió un coágulo formó más hueso, especialmente en el adulto (91).

Que el periostio es la estructura que conduce el crecimiento óseo en espesor, es algo que no se discute. Su extirpación en un hueso largo, en un animal en crecimiento, produce un progresivo adelgazamiento de su diámetro con respecto al hueso largo contralateral (Garcés y Hernández 1991) (47).

1.5.2 PROPIEDADES COMO SUBSTRATO INDUCTOR DE LA OSIFICACION

De toda esta revisión histórica podemos extraer las siguientes conclusiones, que avalan la utilización del periostio como injerto con capacidad osteogénica, a pesar de que no todos los trabajos consultados llegaron a las mismas conclusiones y siendo conscientes también de que las condiciones en que se efectúe la experiencia influirán decisivamente en los resultados finales:

- el periostio es capaz de formar hueso cuando se trasplanta como injerto libre
- el periostio obtenido de animal joven parece tener mayor capacidad osteoformadora
- el "cambium" es fundamental en la respuesta osteogénica del periostio trasplantado
- el hueso final, producido por el periostio trasplantado, está

influenciado en su estructura por las demandas funcionales a las que está sometido

- el lugar dador del injerto influye en la estructura final del hueso. Y parece influir también en la velocidad de producción ósea
- el periostio puede ser "estimulado" previamente a su extracción

1.6 EL DISCO INTERVERTEBRAL HUMANO

1.6.1 CONSIDERACIONES ANATOMICAS GENERALES

La columna vertebral es una estructura mecánica muy compleja constituida por segmentos óseos rígidos: los cuerpos vertebrales. Con la excepción del axis y el atlas, los cuerpos vertebrales están conectados mediante una serie de articulaciones segmentarias compuestas, consistente cada una de ellas en un disco intervertebral y dos articulaciones interapofisarias (cigoapofisarias) posteriores.

1.6.2 ESTRUCTURA MACROSCOPICA DEL DISCO

El disco intervertebral está formado por un anillo fibroso envolvente, compuesto de fibrocartílago hialino, que encierra el núcleo pulpos.

Cada una de las dos placas terminales del cuerpo vertebral está cubierta por una lámina de cartílago hialino de aproximadamente 1 mm de espesor. Estas láminas fijan el disco a los cuerpos vertebrales.

El anillo fibroso está formado por hojas de fibrillas colágenas alineadas. Estas se disponen oblicuamente en las distintas capas, formando unas con otras ángulos que oscilan entre 40 y 85 grados, según su localización. La mayoría de capas están dispuestas en ángulos de 60 grados. (110).

Las fibras se insertan profundamente en la placa terminal cartilaginosa del

cuerpo vertebral, en su periferia, y en una banda que se extiende a unos 3 mm del margen vertebral. La parte anterior del anillo es más gruesa que la posterior, pero la delimitación entre el anillo y el núcleo, más acentuada en personas jóvenes, no está claramente definida y existe un cambio estructural gradual desde el núcleo gelatinoso hasta el anillo fibroso.

El núcleo pulposo está formado por una red laxa de fibrillas colágenas que encierran unas pocas células y gran cantidad de sustancia fundamental. El núcleo posee un elevado contenido en agua, que disminuye con la edad (120).

1.6.3 INERVACION DEL DISCO

Los amplios estudios efectuados sobre la inervación de los discos y sobre otras estructuras espinales no han logrado detectar terminaciones nerviosas en el anillo, pero se han descubierto fibras nerviosas plexiformes libres, incluidas en el tejido fibroadiposo que une el ligamento longitudinal posterior a la superficie posterior del anillo (Wyke, 1976). Así, el sistema nociceptor no está en el propio disco, sino en el conectivo que lo rodea (178).

1.6.4 IRRIGACION SANGUINEA DISCAL

En el feto y durante la infancia penetran en el disco vasos sanguíneos que pasan desde los cuerpos vertebrales, atravesando las placas terminales cartilaginosas de éstos, hasta los núcleos pulposos, a los que irrigan. Durante el primer año de vida, el número de estos vasos disminuye rápidamente. Hacia los 8 años de edad

quedan pocos, y en el adulto no hay ninguno. La placa terminal ósea del cuerpo vertebral adulto muestra numerosas muescas y perforaciones en los lugares donde se localizan estos vasos ya obliterados.

Durante toda la vida, los vasos penetran en el anillo fibroso desde su periferia, pero en el adulto esta penetración es muy escasa, y sólo algunos llegan hasta los confines del núcleo pulposo.

Justo por debajo de la placa terminal, se observan conductos venosos que corren en sentido paralelo a ésta. Estos vasos drenan en las venas verticales del centro del cuerpo y, desde aquí, en el plexo venoso extravertebral (Crock, 1973) (35).

1.6.5 NUTRICION DISCAL

Los pequeños defectos de la placa terminal ósea permiten la comunicación entre los espacios medulares del cuerpo vertebral y del disco.(Nachemson, Lewin, Marroudad, Freeman) (1970) (107).

Es probable que la nutrición normal del disco dependa de la imbibición de líquido por la matriz proteínpolisacárida, y de la expulsión de éste por la presión hidrostática cuando el disco es sometido a una fuerza.

1.6.6 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL DISCO INTERVERTEBRAL

El disco intervertebral no es fibrocartílago ni cartílago hialino, aunque tiene las características químicas de ambos. Los constituyentes principales de la matriz del anillo y del núcleo son colágeno (tipos I y II), proteoglicanos y agua, dispersos dentro de la matriz del disco en concentraciones variables. El anillo contiene fundamentalmente colágeno tipo I con algo de colágeno tipo II, mientras que el núcleo contiene sobre todo colágeno tipo II. También dentro del núcleo hay abundantes moléculas de proteoglicanos no agregados.

En cuestiones de soportar carga, el componente más importante del disco intervertebral es el agua. En el recién nacido, el contenido hídrico discal es de un 88% de su peso total, mientras que a la edad de 12 años ha descendido aproximadamente un 12% y a la edad de 72 años hacia el 70%. Normalmente el contenido de agua del anillo es un 10% menor que el del núcleo, aunque esta diferencia disminuye al aumentar la edad.

Además de la pérdida de agua, otros cambios en la matriz del disco relacionados con la edad incluyen la pérdida de sulfato de condroitina (proteoglucanos) y la elaboración de proteínas no colágenas (20).

1.6.7 CELULAS

En las células del anillo, los núcleos son picnóticos con frecuencia o faltan del todo, y el citoplasma contiene fibrillas delgadas, muchas de las cuales poseen la estructura estriada característica del colágeno.

Las células del núcleo pulposos se parecen a las del anillo, pero su forma es más globulosa y poseen gránulos esparcidos por la periferia del citoplasma, correspondientes a la orientación al azar del colágeno extracelular de esta parte del disco (120).

1.6.8 FUNCION DEL DISCO

La estabilidad intrínseca de la columna vertebral depende de la integridad y de la función normal de sus discos intervertebrales y de los ligamentos y articulaciones interapofisarias asociados a ellos. La estabilidad extrínseca de la columna se debe a los músculos paraespinales y del tronco. La interpretación del comportamiento mecánico del disco normal y patológico requiere cierto conocimiento de las características de fuerza-deformación de sus distintos componentes.

La recuperación de la deformación es mucho más lenta que el proceso que la produce. El disco se comporta como un cuerpo viscoso-elástico. La posibilidad de soportar cierta fuerza sin producir deformación proporciona una pequeña histéresis, es decir, que la eficiencia mecánica de la columna vertebral mejora con el uso y la carga iniciales.

El grado de deformación, según se mide por el abombamiento del anillo, depende no sólo de la magnitud de la fuerza, sino de lo que dura su aplicación. La adaptación de la fuerza tiene lugar con rapidez y la mayor parte de la deformación ocurre en los primeros treinta segundos. No obstante, la deformación sigue aumentando mientras se aplica la fuerza, y no se logra el equilibrio absoluto ni siquiera cuando la fuerza actúa durante varias horas (120).

Para finalizar y como resumen se podría decir que el disco intervertebral constituye un complejo fibrocartilaginoso que forma la articulación entre las vértebras. Contribuye a la movilidad y estabilidad de la columna y a través de él se transmite la carga.

Radiográficamente, la altura del espacio discal de la región lumbar del recién nacido es aproximadamente igual a la altura de los centros de osificación de los cuerpos vertebrales lumbares, mientras que, en un niño, la altura del espacio discal mide aproximadamente un 40% de la altura del cuerpo vertebral y, en un adulto joven y sano, es aproximadamente un 25% de la del cuerpo vertebral. Esta disminución de altura es en parte resultado de la progresiva osificación de los cuerpos vertebrales, pero también puede reflejar una disminución en la hidratación del tejido discal (20).

En general, conviene destacar que la altura del disco no es la misma en todos los segmentos de la columna, y que los discos cervicales y dorsales son menos gruesos que los de la región lumbar. La altura varía también de delante hacia atrás en relación a la curvatura de la columna.

1.7 NUCLEOTOMIA PERCUTANEA

El abordaje del disco intervertebral, de forma percutánea, posiblemente tiene sus orígenes en las técnicas para biopsia del cuerpo y del disco intervertebral.

Fueron Valls, Ottolenghi y Schajowicz, los que en 1948 ultimaron un sistema para el abordaje percutáneo (por punción) de los cuerpos vertebrales lumbares, con el objeto de obtener muestras para biopsia. Este sistema compuesto de guía, agujas y una grilla metálica, permitía el abordaje con seguridad de las lesiones a biopsiar, con una aguja de 2mm de diámetro, por una vía póstero-lateral (169).

En 1956, Craig presenta un sistema de cánulas para la obtención de biopsias percutáneas de lesiones vertebrales que podría considerarse como el paso previo a la nucleotomía percutánea (34).

En 1963 Lyman Smith, utilizando este abordaje percutáneo del disco intervertebral, trata las hernias discales con la inyección en el interior del disco de quimopapaína (quimonucleólisis) (150).

Esta misma vía de abordaje percutáneo del disco intervertebral fue utilizada para practicar discografías por McCulloch en 1972 (99).

Hijikata, en 1975, describe una técnica para la extirpación del núcleo del disco intervertebral, consistente en un abordaje percutáneo posterolateral, con un instrumental específicamente diseñado a tal efecto.

Básicamente, el instrumental consistía en un sistema de cánulas concéntricas, que iban aumentando de tamaño hasta conseguir colocar una cánula de un diámetro de 5m/m en el interior del ánulus y a través de ella introducir en el núcleo instrumentos que permitieran la extirpación del mismo (pinzas, cucharillas)(66).

La extirpación del núcleo pulposo del disco intervertebral, hecha mediante esta técnica, no deja de ser algo incierta en cuanto a la cantidad de núcleo extirpado, puesto que el control se efectúa de forma radiológica por el posicionamiento del instrumental dentro del disco.

Con el objetivo de mejorar esta parte de la técnica, Schreiber y Suezewa, en 1982, iniciaron la introducción en el disco, y de forma contralateral a la cánula de extirpación, de un sistema óptico que les permitiese visualizar la técnica; de esta forma, mejoraron el resultado. Nació así la discoscopia o nucleoscopia discal (143).

Hoy en día, el abordaje percutáneo del disco intervertebral constituye una técnica habitual en cualquier centro que se ocupe del tratamiento de los problemas de la columna lumbar.

En los últimos años, algunos autores como Shepperd (148), Schreiber (141) y Monteiro (104), han iniciado intentos de artrodesis, o al menos de espondilodesis, introduciendo a través de la cánula de artroscopia tejido óseo esponjoso, con resultados todavía inciertos.

Ultimamente Leu y col. (1993) publican un artículo sobre 33 artrodesis intersomáticas percutáneas. Estos autores parece que han estandarizado un

método para realizar la artrodesis intersomática por vía percutánea con resultados esperanzadores. Mencionar que, en su técnica y de forma sistemática, emplean un fijador externo transpedicular para efectuar una distracción del espacio discal, manteniéndolo durante tres meses (87).

La fusión vertebral la consiguen mediante hueso esponjoso fresco autólogo, obtenido de cresta ilíaca en el momento de la intervención.

1.8 LA ARTRODESIS VERTEBRAL

La unión entre dos segmentos óseos o más de la columna vertebral, saltando los discos intervertebrales o mejor dicho los espacios intervertebrales, es algo que se practica desde hace muchos años, en el tratamiento de distintas patologías.

Los primeros intentos de fijación vertebral, se remontan ya al siglo pasado, cuando Hadra (1891), y Chipault (1900), intentaron fijaciones interespinosas con alambre (59,25).

Más adelante, se realizaron las fijaciones posteriores mediante injertos óseos rígidos, Albee (1911) (1) o usando las apófisis espinosas como injerto Hibbs (1911) (65).

Las técnicas de fijación vertebral posterior han sido muchas, intentando siempre conseguir la máxima estabilidad posible, ya sea sin instrumentación Vilardell (173), McBride (98), Bosworth (18), o con instrumentación con diferentes elementos, Judet (78), Attenborough (10), Wilson (174), Cabot (22), Roy Camille (138).

Cleveland y Bosworth (27), para el tratamiento de los fracasos de las artrodesis posteriores, introducen la artrodesis intertransversa, con muy buenos resultados. Su ventaja consiste en acercar el injerto en un plano frontal al centro de movimiento de flexo-extensión del segmento móvil vertebral.

Otro tipo de artrodesis vertebral es la intersomática, que consiste en colocar un injerto óseo entre dos vértebras, previa extirpación del disco intervertebral y

cruentación de los platillos vertebrales. Este tipo de artrodesis puede realizarse básicamente, de dos formas: por vía anterior, abordando el cuerpo vertebral directamente, Mercer (101), Freebody (45), o por vía posterior, en que se aborda el espacio intervertebral a través del arco posterior y del canal medular, Barnes (11), Cloward (28).

En 1981, Blaimont y Alameh (17) publican un estudio de las condiciones mecánicas que teóricamente están presentes en la realización de una artrodesis lumbar. De este estudio se deduce que las condiciones de estabilidad de una columna artrodesada dependen de factores intrínsecos, es decir, de la cantidad, calidad y disposición de los injertos, además de factores musculares o extrínsecos.

Según estos autores, en el movimiento de flexo-extensión de un segmento móvil vertebral, el eje neutro de movimiento (punto en el que el movimiento sería de menor amplitud o incluso nulo) estaría situado en un punto del disco intervertebral, próximo al ligamento vertebral común posterior (para el segmento lumbar), y a partir de allí, la deformidad que experimenta el sistema va en aumento a medida que nos separamos de dicho punto, siendo esta deformidad máxima en la cara anterior del disco y a nivel interespinoso (fig. 1).

Es por ello que el injerto debe estar lo más próximo al eje neutro de movimiento, ya que es la localización donde estará sometido a menores fuerzas y donde sus posibilidades de incorporación serán mayores.

Rolander, en 1966 (136), demostró que un segmento móvil vertebral artrodesado posteriormente y sometido a una fuerza flexora, acusa una deformación del cuerpo vertebral, que es máxima en su cara anterior. También demostró que en

cualquier tipo de artrodesis vertebral, sea anterior o posterior, queda profundamente modificada la mecánica del segmento móvil vertebral, desplazándose el centro de movimiento al mismo seno del injerto. Esto modifica los brazos de palanca, y en un diagrama de fuerzas, con el individuo en bipedestación, resultaría que la artrodesis anterior exigiría menor esfuerzo de la musculatura posterior para equilibrar el sistema. Blaimont y Alameh (17) (fig.2).

Esto nos llevaría a pensar que es la artrodesis anterior la que más conseguiría el efecto que se pretende con la técnica, que no es otro que la fijación de dos segmentos vertebrales eliminando la movilidad entre ellos.

Las artrodesis intersomáticas, tanto por vía anterior como por vía posterior, presentan una serie de inconvenientes quirúrgicos, sobre todo de abordaje, y no están exentas de complicaciones peroperatorias y postoperatorias (30,50,71,79,89,90,). No obstante, los porcentajes de éxitos que muchos autores refieren superan el 85% (30,50,71,89,90).

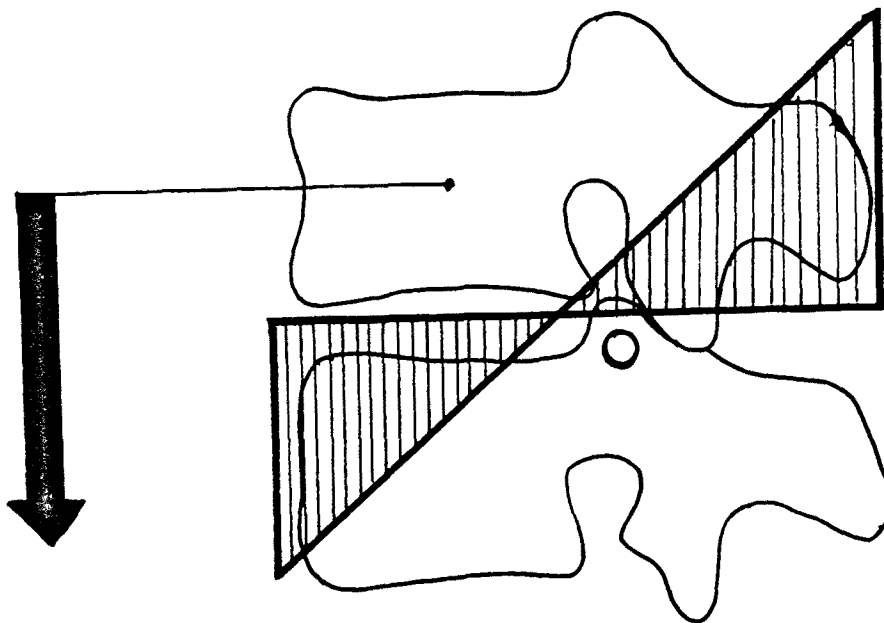


Fig.1- Una fuerza que tienda a flexionar el segmento vertebral provoca unas deformaciones en tracción y compresión que van creciendo linealmente a partir de un punto cerca del ligamento vertebral común posterior, para alcanzar su máxima en la cara anterior del disco y a nivel interespinoso (Tomado de Blaimont y Alameh (17))

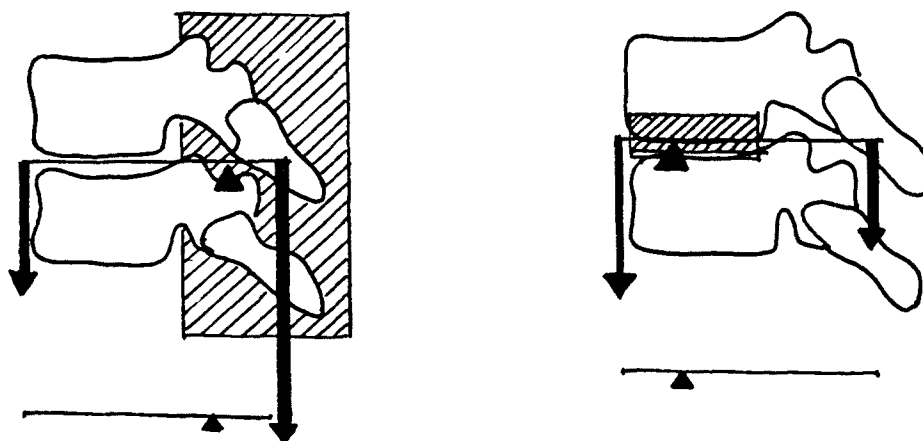


Fig.2- Las artrodesis, sean anteriores o posteriores, introducen modificaciones considerables en el sistema de brazos de palanca, deslizando el centro de movimiento al mismo seno del injerto. (Rolander (136)). Tomado de Balimont y Alameh (17).

2. HIPOTESIS DE TRABAJO

2.1 IDENTIFICACION DEL PROBLEMA

Los problemas de "dolor de espalda", sean por las causas que sean, generan un número de tratamientos quirúrgicos muy elevado, y entre éstos, las artrodesis vertebrales ocupan un lugar destacado.

Actualmente la artrodesis vertebral es una técnica quirúrgica que no ha perdido interés; muy al contrario, cada día se practica más y con técnicas más agresivas.

Una de las técnicas más utilizadas actualmente, por la solidez que confiere al segmento móvil vertebral, es la artrodesis intersomática, por vía posterior o por vía anterior, ambas no exentas de riesgos quirúrgicos y de dificultades técnicas.

Otra de las técnicas de artrodesis que no ha perdido vigencia es la artrodesis póstero-lateral. Esta, que parece ser la que situaría el injerto óseo más cerca del eje de movimiento de flexo-extensión del segmento móvil con el objeto de aumentar los buenos resultados, parece que no garantiza una estabilidad absoluta. Y que en los movimientos de flexo-extensión se producen pequeñas inflexiones a nivel de los cuerpos vertebrales, por deformación de los mismos, siendo máxima a nivel de la cara anterior de éstos (Rolander) (136).

Esto podría ser causa de persistencia de las molestias en pacientes con artrodesis posterolaterales conseguidas.

Ante esta perspectiva, nos preguntamos: ¿sería posible conseguir una artrodesis intersomática estable, con una agresividad quirúrgica mínima, sin utilizar para ello injerto óseo autólogo que pudiera servir para completar la artrodesis

posterolateral y en algún caso, substituir a la artrodesis intersomática clásica?

2.2 PREMISAS PARA EL DESARROLLO DEL TRABAJO

Está claro que es posible el abordaje percutáneo del disco intervertebral y que contamos actualmente con un instrumental adecuado para realizar un intento de artrodesis intersomática sin necesidad de cirugía abierta.

Para ello nos basamos en:

- a- Posibilidad de abordaje percutáneo del disco intervertebral.

El abordaje percutáneo con el instrumental actual, que es perfectamente realizable en el hombre, no es posible utilizarlo en animales de experimentación de pequeño tamaño, por lo que, en este estudio, utilizaremos la cirugía abierta.

- b- Posibilidad de inducir la diferenciación a cartílago y a hueso, de las estructuras fibrocartilaginosas del disco, mediante la "inducción ósea".

La diferenciación ósea es posible inducirla con proteína morfo-genética ósea, complejo proteico de difícil obtención, que no está al alcance de nuestras posibilidades, por lo que utilizaremos para el estudio la matriz ósea desmineralizada , en la cual está presente la proteína morfogenética ósea en muy pequeñas cantidades y de la cual se obtiene por extracción química y cromatográfica.

El periostio es otra de las estructuras orgánicas, capaz de producir hueso. Lo que no parece tan claro, es si ello es debido al fenómeno de "inducción ósea" propiamente dicho, o a un proceso simple de trasplante de células con capacidad osteogénica. No obstante, el hecho de que pueda desarrollar hueso en el lugar trasplantado, y su facilidad de obtención, nos ha hecho utilizarlo en la experiencia.

2.3 OBJETIVOS

Con estas premisas, hemos diseñado un trabajo experimental con el que pretendemos los siguientes objetivos:

- 1- **Averiguar la respuesta del disco intervertebral a la introducción en su interior de sustancias con poder osteoinductor.**
- 2- **Averiguar las posibilidades de provocar una fijación intersomática mediante este proceso.**
- 3- **Comprobar los potenciales osteoinductores de la matriz ósea desmineralizada (D.B.M.) homóloga y del periostio autólogo.**

3. MATERIAL Y METODO

El estudio experimental se ha realizado en el laboratorio de experimentación animal de la Unitat de Cirurgia de la Facultat de Medicina de Reus, Universitat Rovira i Virgili.

El estudio radiológico de los especímenes se ha efectuado en el mismo laboratorio y el revelado de las placas radiográficas se ha llevado a cabo en el Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital Sant Joan de Reus.

El estudio anatomopatológico ha sido realizado en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Sant Joan de Reus, tanto en el apartado de técnicas como de interpretación de los resultados.

3.1 MATERIAL

En este apartado describiremos solamente el animal de experimentación utilizado y los substratos orgánicos y materiales inorgánicos implantados en el animal.

Dejamos el resto para describir en el apartado correspondiente a cada técnica o método.

3.1.1 EL ANIMAL DE EXPERIMENTACION

3.1.1.1 Tipo de animal

Para este trabajo se han utilizado ratas albinas del tipo Sprague Dawley.

La rata Sprague Dawley ha sido escogida como animal más idóneo para este trabajo, por presentar las siguientes características:

- tamaño reducido, que permite adaptarse a las capacidades y características de los estabularios del centro
- gran resistencia a las infecciones y a las intervenciones quirúrgicas, no siendo estrictamente necesaria la práctica de éstas en condiciones de esterilidad
- similitud anatómica entre el disco intervertebral de la rata y del hombre, aunque no en cuanto a su biomecánica

-
- buena respuesta a la inducción ósea por matriz ósea desmineralizada, en implantes ortotópicos y heterotópicos
 - animal empleado por otros muchos autores en trabajos sobre inducción ósea
 - animales de ciclo vital corto, con un índice de actividad metabólica cinco veces superior al del hombre, con la consiguiente reducción de tiempo para obtener resultados (33)
 - facilidad para la obtención de huesos largos, procedentes de congéneres utilizados en otras experiencias por otros equipos de investigadores, sin que esto influya en el resultado final, con el consiguiente ahorro de animales
 - facilidad para su ubicación posterior, que permite mantenerlos en grupos de cuatro a cinco animales por jaula
 - su coste relativamente bajo, tanto de adquisición como de manutención.

En nuestro caso se han utilizado ratas de ambos sexos indistintamente, puesto que los cambios hormonales de la rata hembra no consideramos que alteren significativamente los resultados, máxime cuando no se preveen determinaciones analíticas.

3.1.1.2 Nutrición y cuidados

La rata de laboratorio está alimentada con unos piensos específicos, de los que se conoce su composición, tanto cualitativa como cuantitativamente. El pienso se presenta en forma de cilindros, siendo del tipo PANLAB A.04 (122).

El animal dispone de agua corriente, contenida en unos "biberones" especiales.

La rata de laboratorio, antes y después de la cirugía, se mantiene ubicada en un estabulario, en jaulas de cuatro o cinco individuos del mismo sexo por unidad, lo que les permite cierta libertad de movimientos. Se mantienen unas condiciones ideales de temperatura (20-22°C), de humedad (60-70%) y de luminosidad (12 horas al día).

La alimentación es "ad libitum", es decir, dejando que el animal disponga libremente del alimento según sus necesidades, las cuales dependerán de las fases de crecimiento, gestación o lactancia.

Es importante que la alimentación se efectúe con estos preparados especiales pues sino los animales desarrollan rápidamente deficiencias que los predisponen a infecciones y neoplasias (4).

3.1.1.3 Anatomía de la columna vertebral de la rata

La rata posee de 57 a 60 vértebras, divididas en cinco grupos: cervical, torácico, lumbar, sacro y caudal.

Para nuestro trabajo, inicialmente pensamos en las vértebras del segmento lumbar, que por ser las de mayor tamaño parecían ofrecer mejores posibilidades.

Pronto nos dimos cuenta de las dificultades que entrañaba el abordaje del disco intervertebral a este nivel, debido sobre todo al número elevado de apófisis que poseen las vértebras de estos animales.

Por otra parte, estos animales poseen un grupo de vértebras caudales desprovistas en su mayoría de apófisis, con discos intervertebrales tan voluminosos como los lumbares, lo que unido a la facilidad del abordaje quirúrgico, nos decidió a escoger esta zona para el trabajo experimental.

Las vértebras lumbares en número de seis, poseen anapófisis junto con cigoapófisis bien desarrolladas, apófisis transversas y apófisis espinosas.

Las vértebras caudales libres pueden ser de 27 a 30. Su forma varía progresivamente, desde la morfología de la vértebra lumbar, con todas sus apófisis, excepto las anapófisis, hasta el simple cuerpo vertebral que ha perdido todas sus prominencias.

Según M.A. Rowett (137) esta pérdida de apófisis se efectuaría de la siguiente forma:

- vértebras completas 1 y 2
- completas con excepción de las apófisis espinosas 3 y 4
- con precigoapófisis funcionales, pero poscigoapófisis
no funcionales y sin apófisis espinosas 5
- con pre y poscigoapófisis no funcionales, sin apófisis
espinosas; pero con apófisis transversas diferenciadas 6 - 8
- con cigoapófisis y apófisis transversas reducidas a
pequeñas prominencias y sin apófisis espinosas 8 - 20
- únicamente con cuerpo 21-27 o 30

El disco intervertebral está muy desarrollado en este animal, y en la región de la cola están encajados entre los cuerpos vertebrales mediante seis depresiones dispuestas radialmente que encajan en las prominencias de los cuerpos

vertebrales.

En la cola existen huesos cabriales asociados a las vértebras caudales, en número de dos por cada espacio discal y colocados ventralmente.

En todas las ratas utilizadas las vértebras mantienen unas físis o cartílagos de crecimiento en ambos extremos del cuerpo vertebral, con una epífisis ósea en cada extremo del mismo, donde se encaja el disco intervertebral.

Los cartílagos de crecimiento o físis permiten a la vértebra crecer hasta más o menos los 18 meses de edad, más allá de la edad en que alcanzan el máximo peso, que es aproximadamente sobre los 10 meses (Neufeld y col. 1990) (112).

La curva de edad-peso de estos animales sería la siguiente (95):

- a los dos meses pesan 235-gramos
- a los tres meses pesan 420-gramos
- a los cuatro meses pesan 510-gramos

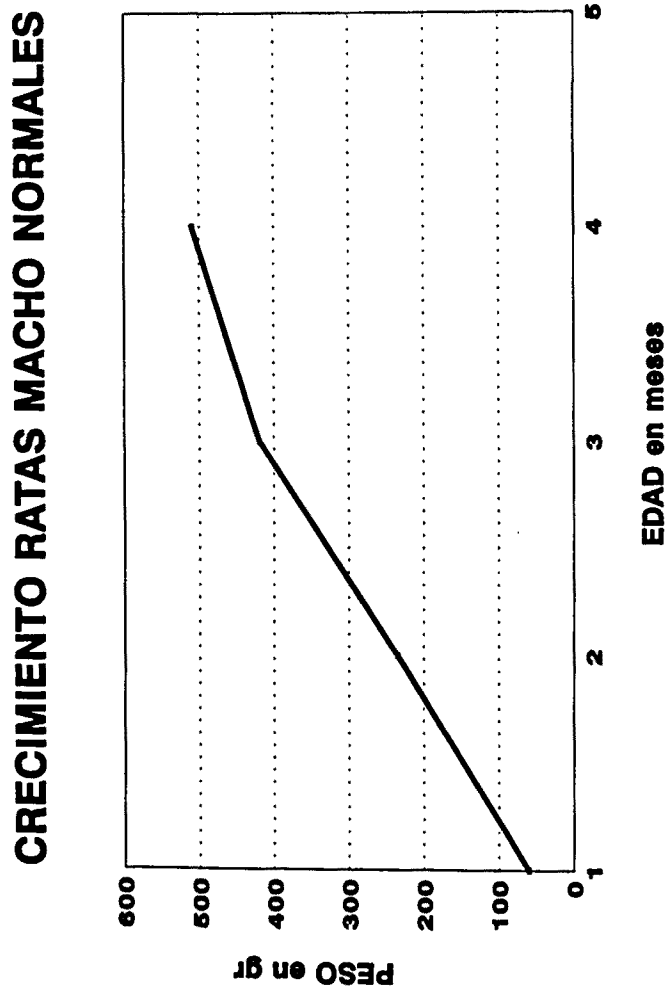




Foto 1

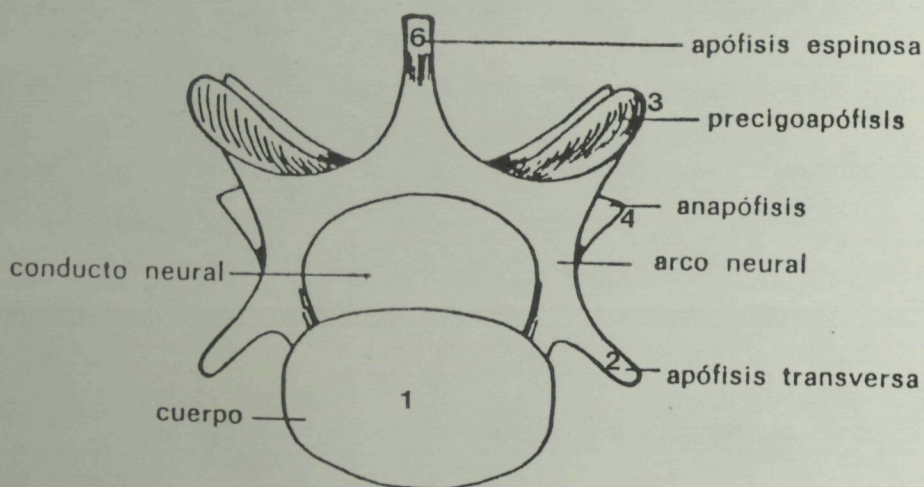


Fig.3-

Vértebra lumbar - visión cefálica



Foto 2

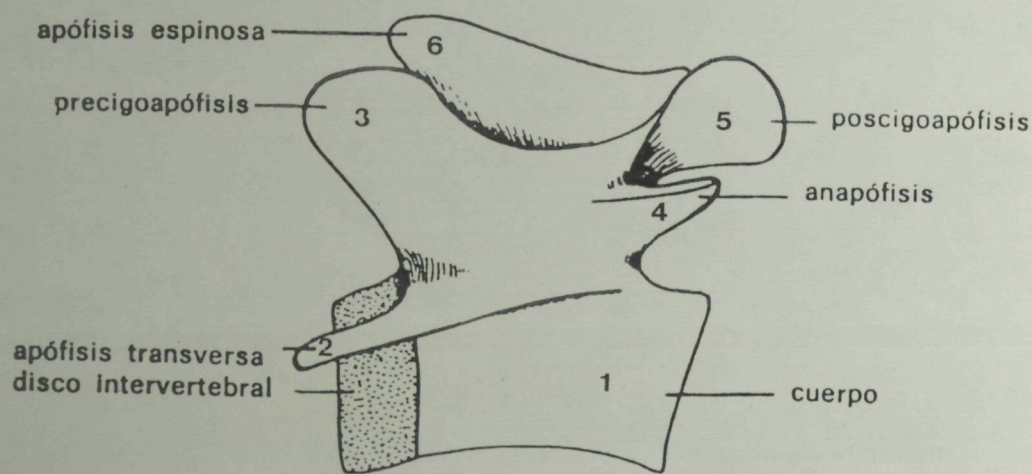


Fig.4-

Vértebra lumbar - visión lateral

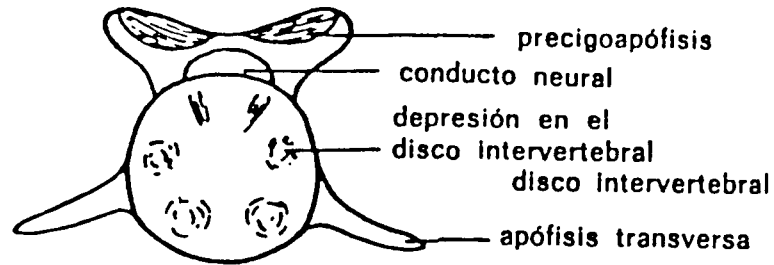


Fig.5- Vértebra caudal proximal- Visión cefálica

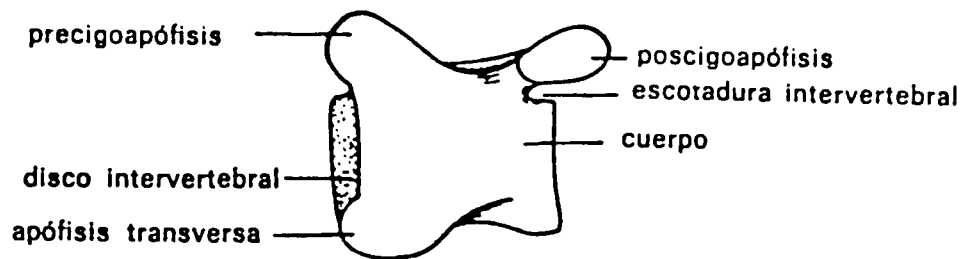


Fig.6- Vértebra caudal proximal - Visión lateral

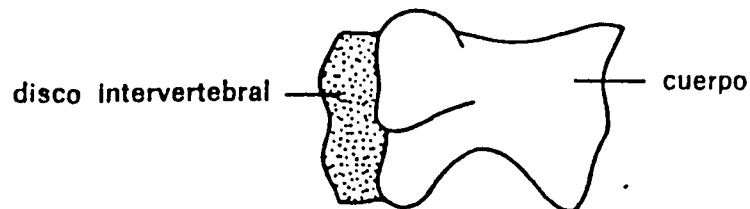


Fig.7- Vértebra caudal media



Foto 3- Detalle del espacio discal
1. Hueso cabrial 2. Disco intervertebral
3. Fisis (cola macerada)

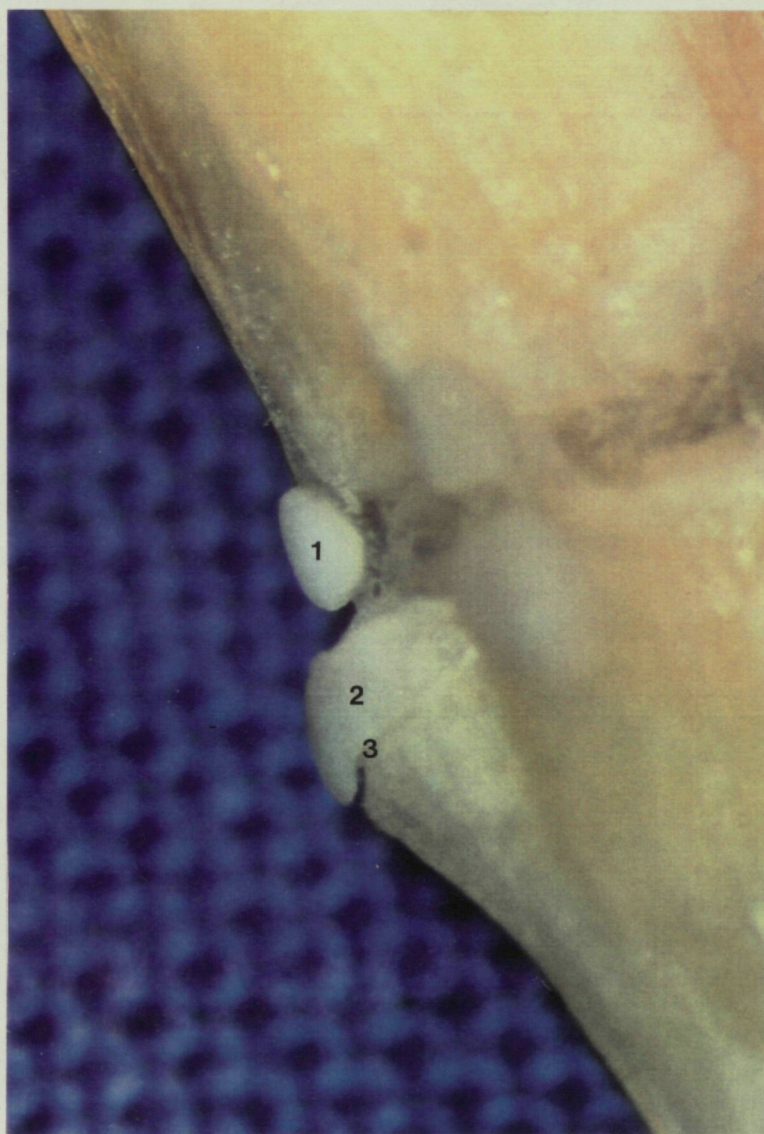


Foto 4- 1. Hueso cabrial en visión oblicua
2. Epífisis vertebral (cola macerada)
3. Fisis

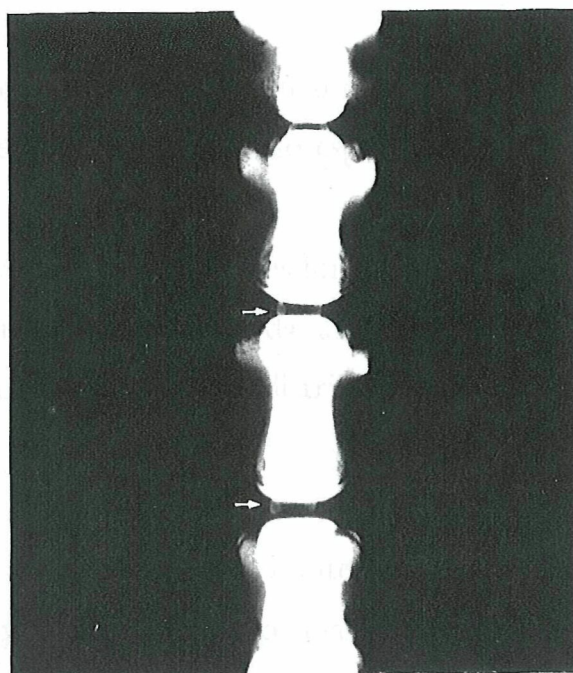


Foto 5- Rx: Huesos cabriales - Visión frontal

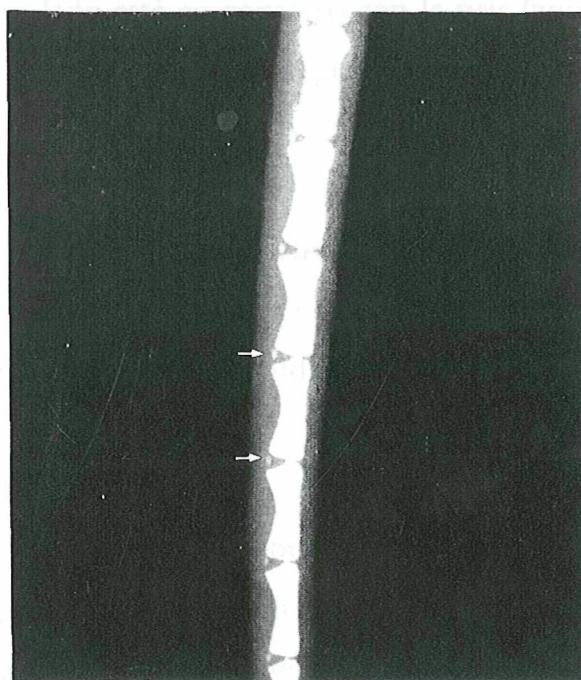


Foto 6- Rx: Huesos cabriales - Visión lateral

3.1.1.4 Descripción microscópica del espacio intervertebral

Las vértebras caudales de la rata terminan en sus extremos con unas placas de cartílago fisario que asienta sobre hueso esponjoso.

El cartílago fisario aparece en los cortes longitudinales de las vértebras (tinción hematoxilina-eosina) como una banda azulada y en disposición ondulada, viéndose en el microscopio con la distribución clásica en columnas de los condrocitos.

Entre el cartílago fisario y el disco intervertebral, existe una placa ósea, verdadera epífisis, que aparece en otros mamíferos pero no en el hombre (23), y que se muestra al corte como hueso esponjoso maduro. Es una placa de diferente grosor, según la zona que ocupe sobre la línea ondulada de la fisis, puesto que si por un lado está en contacto con la fisis (zona ondulada), por el otro forma el platillo vertebral, que es regular en toda su extensión, ofreciendo una concavidad en el centro.

Por encima de la placa epifisaria existe una zona muy delgada de cartílago hialino bien diferenciado, en el que se introducen las fibras de colágeno del disco intervertebral. Este cartílago tendría la estructura del cartílago articular típico (172).

Pon encima de él, el disco intervertebral está formado por capas concéntricas de fibrocartílago, que constituyen el anillo fibroso, rodeando al núcleo pulposo central. El núcleo pulposo está compuesto por una matriz extracelular formada únicamente por sustancia fundamental, que engloba grupos de células, denominadas "células fisalíforas," dispuestos de forma muy irregular (172).

En los bordes laterales de la placa epifisaria, y en contacto con ella, aparecen en todas las preparaciones, pero no en todos los bordes epifisarios, unas estructuras cartilagosas, en forma de cuña, cuyas células se distribuyen en columnas que siguen una dirección inversa a la fisis, es decir, que la capa germinativa se encuentra en la periferia, mientras que la zona de maduración se encuentra casi en contacto con la zona germinal de la placa fisaria. En otras preparaciones, estas estructuras se hallan osificadas totalmente o en parte, iniciando la osificación por el centro de la misma.

Estas estructuras corresponderían posiblemente a una emergencia, en los cortes, de algunos de los procesos articulares, que a este nivel son rudimentarios y no se articulan con la vértebra contigua.

También pueden distinguirse en algunas preparaciones unas estructuras que delimitan los cartílagos de crecimiento lateralmente y que se corresponderían con lo que en el hombre se denomina "anillo pericondral de Lacroix" (111,140).

Igualmente aparece en algunos cortes y de forma siempre unilateral, una estructura ósea que no está en contacto con los cuerpos vertebrales ni con las placas fisarias, de forma redondeada, en algunos casos, compuesta por hueso cortical que rodea a hueso esponjoso con médula ósea. En otros casos, aparece como un núcleo de cartílago muy celular. Las células cartilagosas se distribuyen de forma irregular, no reconociéndose agrupaciones en columnas, siendo más pequeñas las de la periferia y más gruesas las del centro de la estructura. En la periferia las células quedan englobadas en un tejido fibroso muy denso (tendón).

Esta estructura está en el centro de una franja tendinosa que se inserta en parte

en lo que sería un proceso articular de una de las vértebras adyacentes, pero que no parece insertarse en la siguiente.

En un mismo corte que abarcase varios espacios discales, podemos encontrar esta estructura totalmente cartilaginosa en un espacio y totalmente osificada en el espacio siguiente.

Creemos que se correspondería con los huesos cabriales (137), que aparecen en las radiografías en número de dos por cada espacio intervertebral y en posición ventral, a modo de huesos sesamoideos.

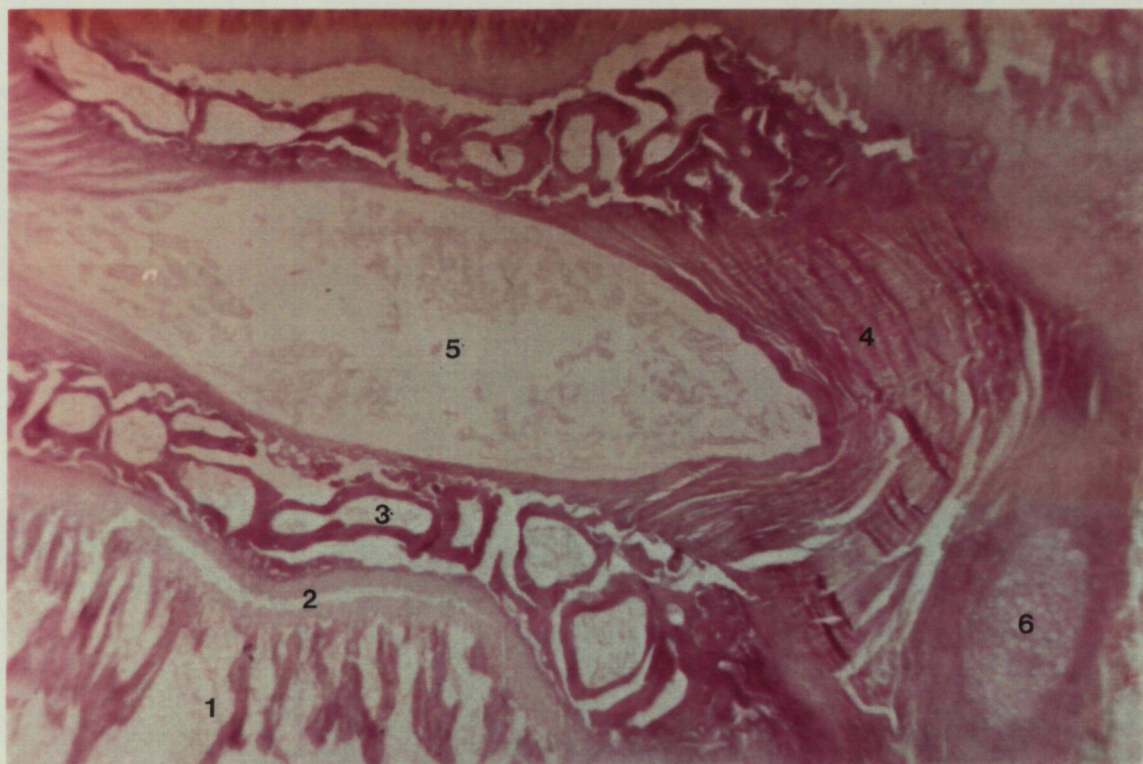


Foto 7- Corte sagital del espacio discal
1. Metáfisis 2. Fisis 3. Epífisis 4. Anulus
5. Nucleo pulposo 6. Hueso cabrial
(tinción H-E 2,5x)

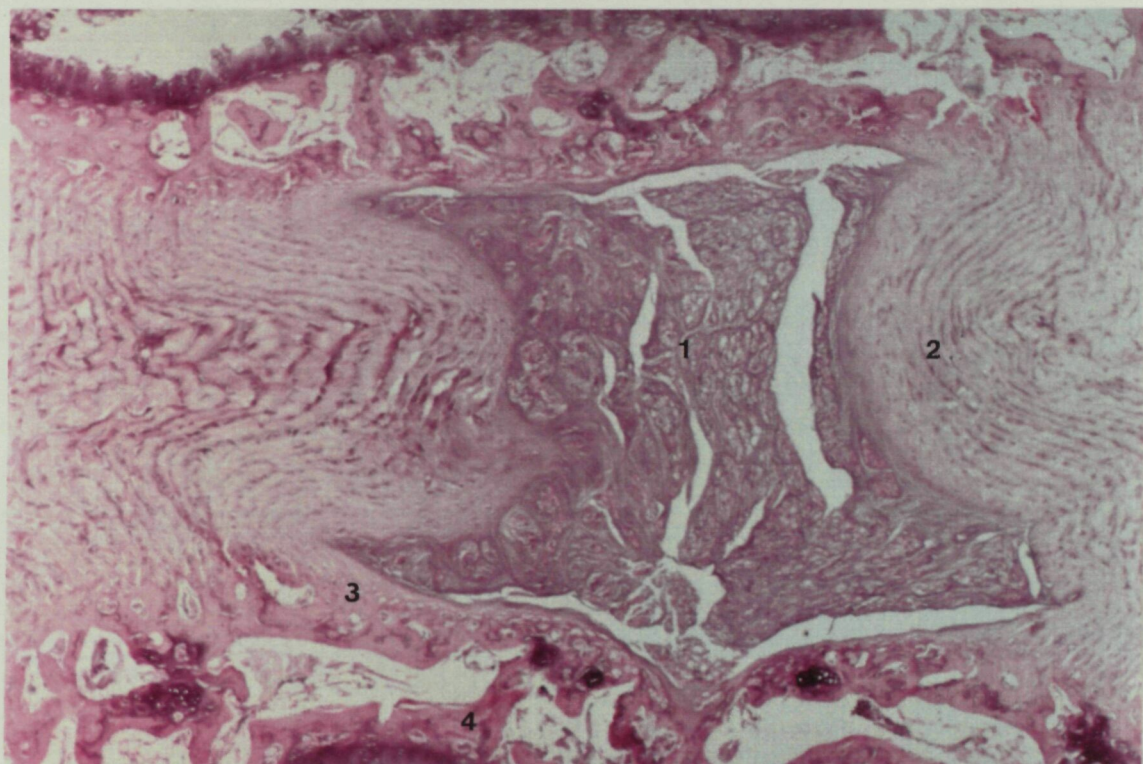
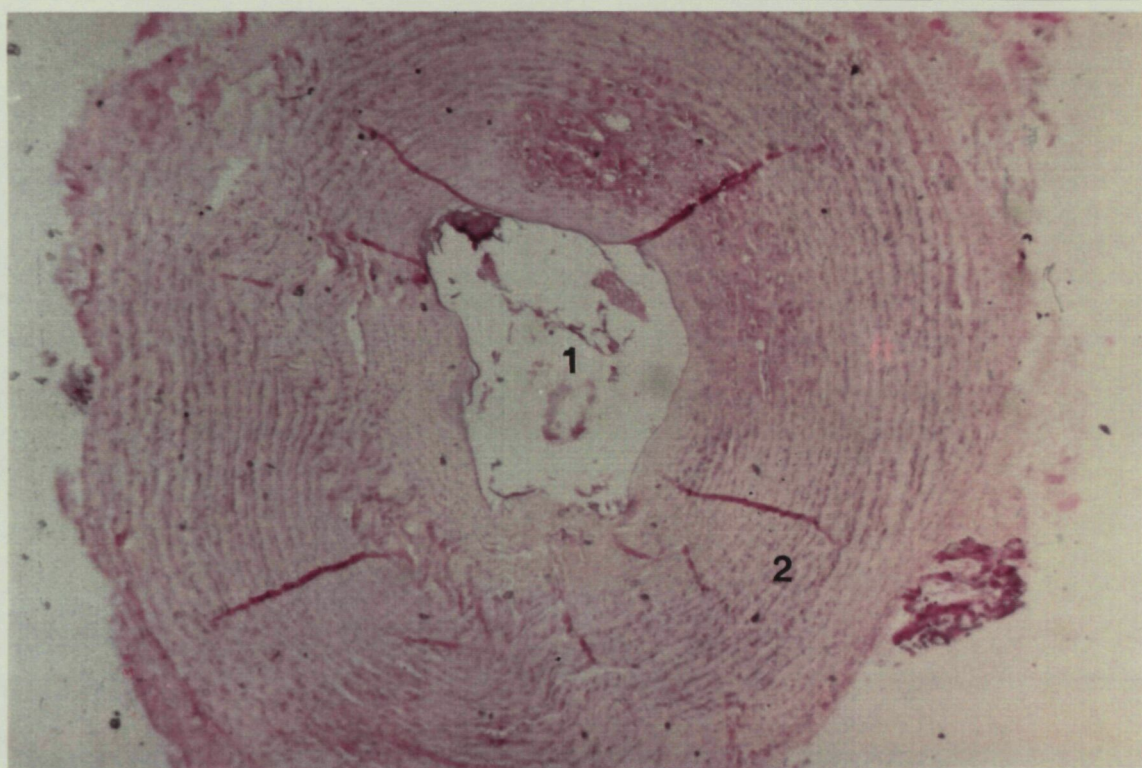


Foto 8- Corte transversal del disco (H-E 2,5x)

Foto 9- Corte sagital del disco

1. Núcleo 2. Anulus 3. Cartílago hialino 4. Epífisis (H-E 4x)

3.1.2 LA MATRIZ OSEA DESMINERALIZADA (D.B.M.)

3.1.2.1 Obtención de la D.B.M.

Para la obtención de la D.B.M., se han utilizado animales del mismo tipo (homóloga) procedentes de estudios preliminares y de otros trabajos realizados en el laboratorio por otros investigadores.

Se obtienen los fémures y tibias de los animales y se mantienen congelados (-30°C) hasta su procesamiento, limpiados previamente y de forma exhaustiva de tejidos blandos adheridos.

En el momento de su procesamiento, son descongelados e introducidos en una solución 0,6 N de HCl (ácido clorhídrico), durante 24 horas, a razón de 100cc de solución ácida por cada cuatro elementos óseos. Todo el proceso de descalcificación se hace a temperatura de 4°C.

A las 24 horas se comprueba la descalcificación obtenida, de forma macroscópica, debiendo aparecer los huesos translúcidos y blandos al tacto.

Si no se ha conseguido la total descalcificación, se repite el proceso durante 24 horas más, renovando la solución de HCl y en las mismas condiciones de temperatura.

Una vez conseguida la descalcificación, se procede a un lavado meticuloso con agua corriente.

Se desprecian las metafisis y epífisis y se limpian bien las diáfisis de médula ósea.

Se introducen las diáfisis limpias en una solución de cloroformo-metanol (1:1) durante una hora, también a 4°C.

Finalmente se procede a un nuevo lavado de las piezas con agua corriente, secado de las mismas y congelado en seco hasta su utilización (115).

3.1.2.2 Descripción macroscópica de la D.B.M.

El resultado del proceso de descalcificación es una estructura tubular, translúcida de color marfileño y con una consistencia blanda (como tubo de goma).

Se secciona en rodajas de un grosor aproximado de 1,5 m/m, para su introducción en el disco intervertebral y en la pared abdominal.

Los fragmentos, en forma de anillo, tienen un peso aproximado de 5 mg.

3.1.2.3 Descripción microscópica de la D.B.M.

En observación microscópica, se aprecia la D.B.M. como una estructura homogénea, que se tiñe de rosa pálido con la hematoxilina-eosina y de verde pálido con el tricrómico de Masson. La estructura está perforada por multitud de agujeros que corresponderían a los conductos de Havers (los más grandes) y a las celdas de los osteocitos (los más pequeños), que se encuentran en una mayoría de los casos vacíos debido al proceso de descalcificación, o con células

en su interior retraídas.

Al observarla con luz polarizada, las fibras de colágeno mantienen la estructura en osteonas, típica del hueso compacto maduro.

RESPUESTA DEL DISCO
INTERVERTEBRAL DE LA RATA A LA
INTRODUCCION EN SU INTERIOR DE
SUBSTRATOS ORGANICOS INDUCTORES
DE LA OSIFICACION



Foto 10- Obtención de huesos largos para la preparación de la D.B.M.

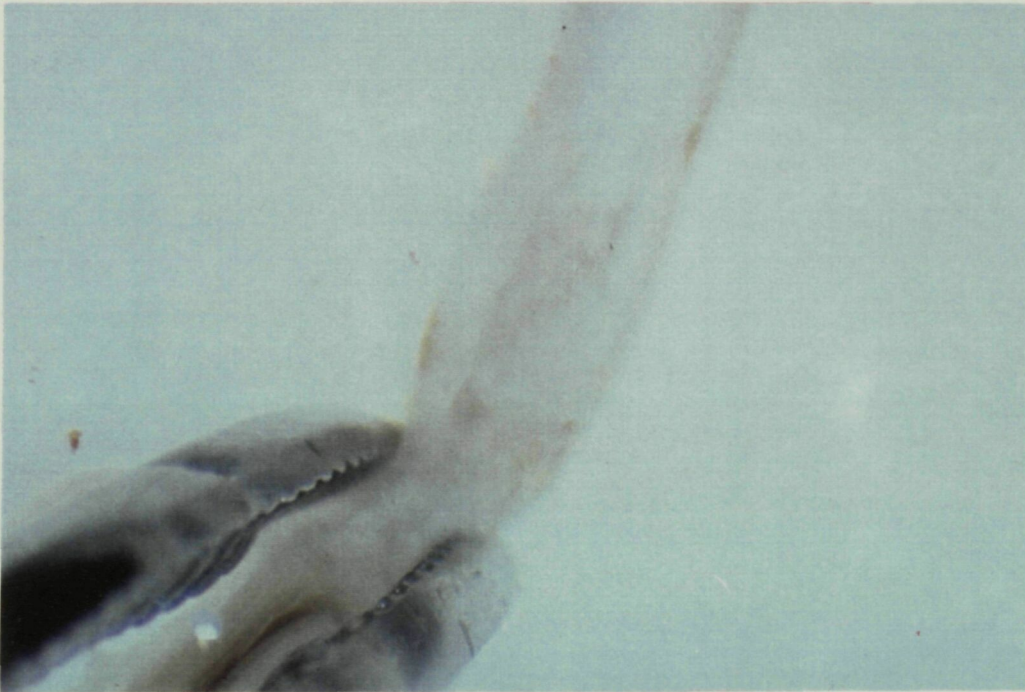


Foto 11- Una diáfisis femoral después del proceso de descalcificación

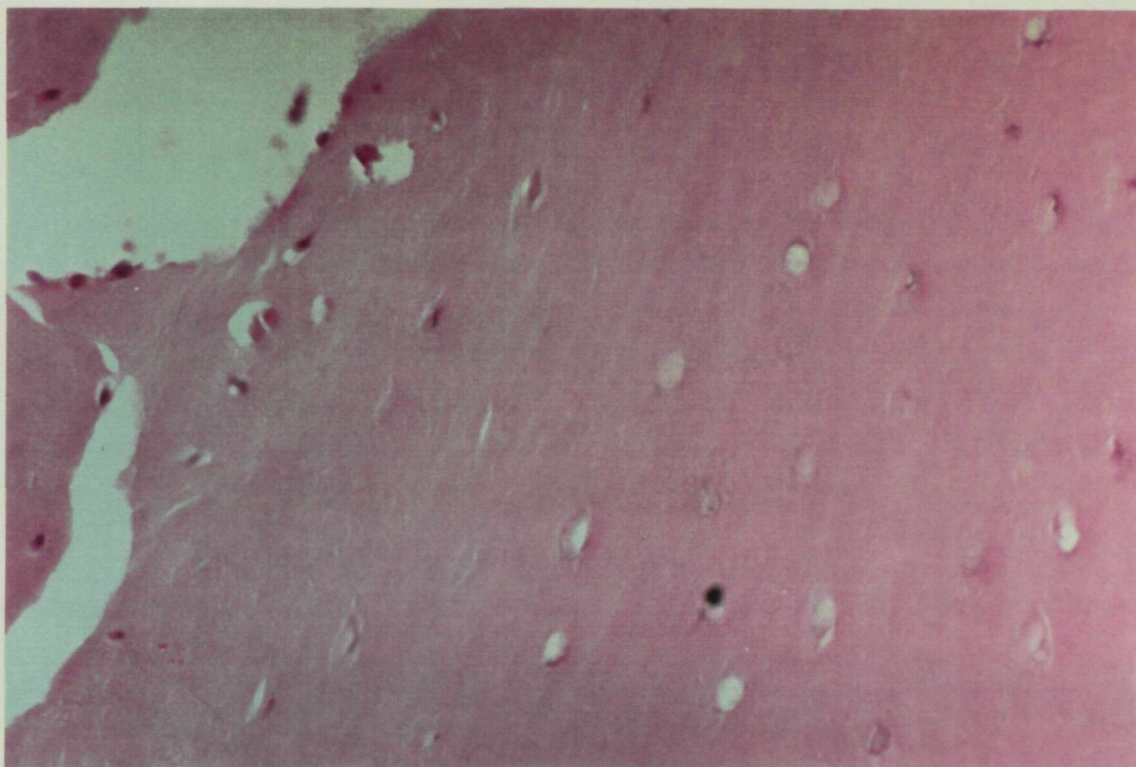


Foto 12- Matriz ósea descalcificada - Aspecto microscópico (H-E 40x)

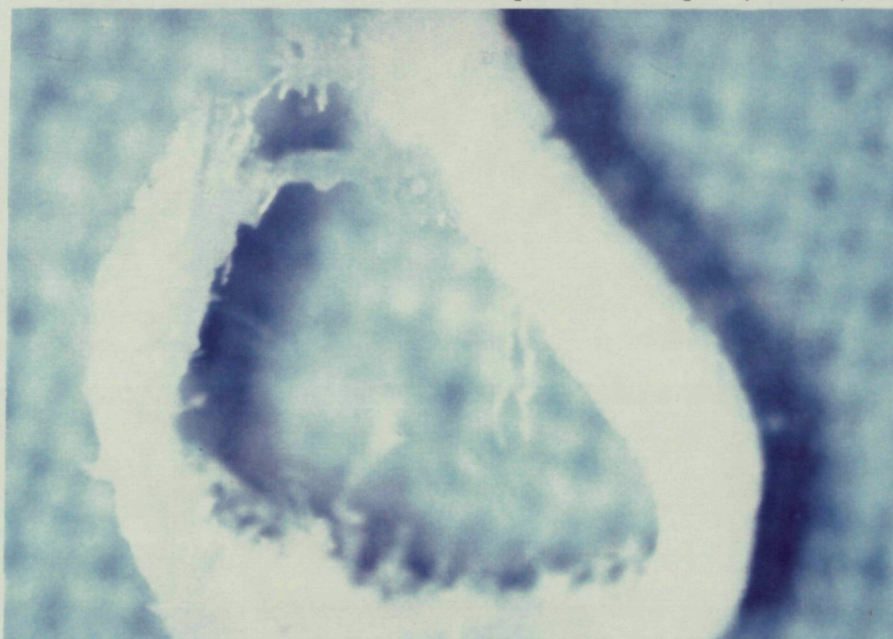


Foto 13- Matriz ósea desmineralizada - Fragmento a implantar
(lupa 5 aumentos)

3.1.3 EL PERIOSTIO

3.1.3.1 Obtención del periostio

Obtenemos el periostio de forma autóloga, en el mismo acto quirúrgico.

Se incide la piel de la cara anterior de la tibia y se separa la musculatura del periostio, de una forma casi circunferencial.

Se practica una incisión del periostio, transversal a nivel de la metáfisis proximal y longitudinal en la cara interna de la tibia, iniciándose el despegamiento del mismo de proximal a distal y de interno a externo, consiguiendo la máxima cantidad posible.

Se obtiene un fragmento de periostio de aproximadamente 0,5 x 0,2 cm.

Se repite la operación en la tibia contralateral con objeto de obtener un segundo fragmento de periostio (uno destinado a la implantación discal y otro para ser implantado en un lecho muscular).

Entre la extracción y su implantación, el periostio se mantendrá en una solución salina (suero fisiológico) para evitar su desecación, y a temperatura ambiente.

3.1.3.2 Descripción microscópica del periostio

Con tinciones con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson, se aprecian dos zonas bien diferenciadas de tejido fibroso (se tiñe de verde con el tricrómico de Masson).

Existe una zona más externa, en contacto con músculo y grasa, constituida por un tejido fibroso denso, poco celular y con presencia de capilares. Las células tienen las características de fibroblastos.

Una zona más interna, que estaría en contacto con el hueso, que está formada por un tejido fibroso menos denso y más celular. Las células tienen los núcleos más poliédricos que en la capa anterior. Es la capa llamada "cambium".

3.1.4 MATERIAL INERTE

Como uno de los controles que se utilizarán durante el trabajo experimental, se ha escogido un material que no sea orgánico y que produzca la menor interacción posible con los tejidos circundantes.

Para este fin utilizamos acero quirúrgico, en forma de fragmentos de un tamaño de 1 m/m, obtenidos de una aguja de Kirschner de 1 m/m de diámetro.

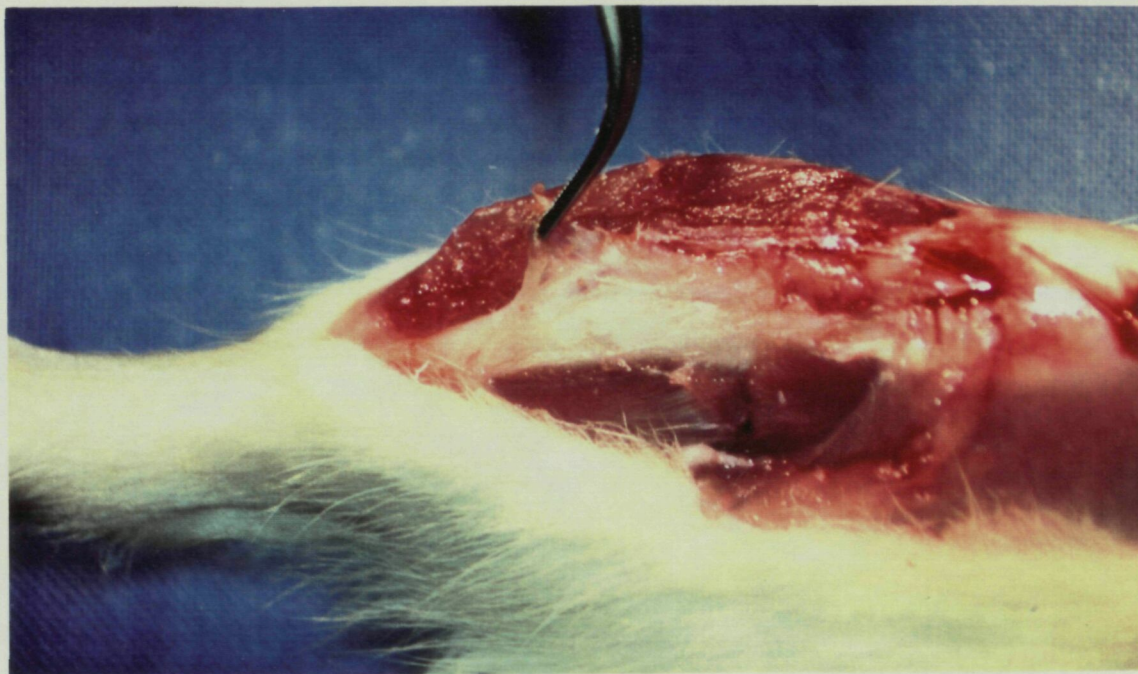


Foto 14- Obtención del periostio autólogo de la tibia

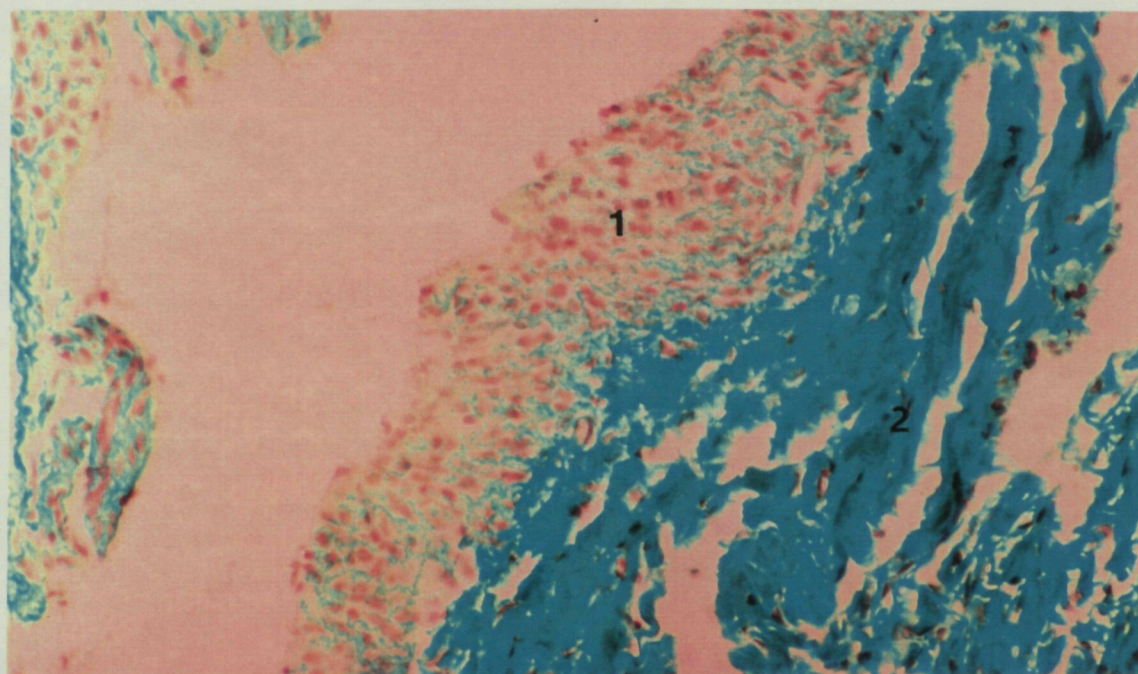


Foto 15- Imagen microscópica del periostio obtenido
1. Capa celular interna 2. Capa fibrosa externa
(tricrómico de Masson 20x)

3.2 METODO

3.2.1 ANESTESIA Y SACRIFICIO

3.2.1.1 Anestesia

Como anestésico se ha utilizado el éter etílico, por las siguientes razones:

- es fácil de conservar
- es fácil de manipular
- se elimina rápidamente, lo que hace que el animal se recupere en poco tiempo
- tiene un coste relativamente económico

Los inconvenientes vienen dados, a parte de sus características físico-químicas (volátil e inflamable) por el riesgo de sobredosificación inhalatoria, que lleva al animal al paro respiratorio, que si no se recupera inmediatamente, acabará con la muerte del animal por paro cardíaco (16,26).

Material

- Eter etílico
- Campana de vidrio de 25 a 30 cm de diámetro.
- Gasa o algodón hidrófilo
- Jeringas de 5 y de 20 cc

Método anestésico

La anestesia se realiza en dos fases:

- La primera fase o de inducción, consiste en que el animal, después de

haber sido pesado (báscula digital SARTORIUS GMBH-Göttingen), se introduce en la campana de vidrio, en cuyo interior se coloca una gasa o algodón empapado en éter, quedando el animal dentro de una atmósfera con un alto porcentaje de anestésico.

Después de un espacio de tiempo de 3 a 5 minutos, el animal inicia una fase de agitación e hipermotilidad que suele durar de 15 a 30 segundos, pasando a una fase de hipotonía con respiración lenta y profunda, en que consideramos que el animal ya está dormido.

- La segunda fase consiste en mantener, durante toda la intervención, la anestesia conseguida en la campana; para ello se coloca el animal sobre una placa de corcho, donde será intervenido. A partir de aquí, se habrá de mantener la anestesia utilizando un tubo de plástico (jeringa de 20cc), dentro de la cual hay una gasa impregnada en éter y que se coloca delante del hocico de la rata.

Se ha de procurar que no se evapore totalmente el éter de la gasa, con lo que el animal despertaría a media intervención. Para que esto no suceda, conectamos el extremo de la jeringa a un tubo de polietileno, el cual está conectado a su vez a otra jeringa de 5 cc llena de éter líquido, lo que permite inyectar éter a la gasa a medida que sea preciso.

La complicación más frecuente es el paro respiratorio, que normalmente va precedido de bradipnea y cianosis. Si esto ocurre, retiraremos la jeringa con éter del hocico del animal y si no se recupera, iniciaremos las maniobras de insuflación de aire por el hocico, mediante un tubo semirrígido de polietileno, soplando a través de él. Puede ser

incluso necesario el masaje cardíaco externo bidigital.

Otra de las complicaciones posibles y que se presenta con menos frecuencia es la hipersecreción traqueobronquial, para la que algunos autores recomiendan la administración de atropina (93,175).

Después de la intervención se retira al animal el sistema de inhalación de éter y se le coloca de nuevo en la jaula correspondiente, dejándole en libertad de movimientos y con alimentación de pienso y agua "ad libitum".

3.2.1.2 Sacrificio

El sacrificio tiene como objetivo la obtención de las muestras para el estudio anatomopatológico de los resultados.

El animal es colocado dentro de la campana de vidrio, en una atmósfera de éter, hasta el fallecimiento del mismo.

Después de la muerte del animal, se controla el peso y se efectúa un estudio radiográfico del mismo. Por último se extraen las muestras para anatomía patológica.

Los animales se sacrifican en grupos de cinco, tal como fueron intervenidos y correspondientes a la misma jaula, a las ocho semanas de la intervención.

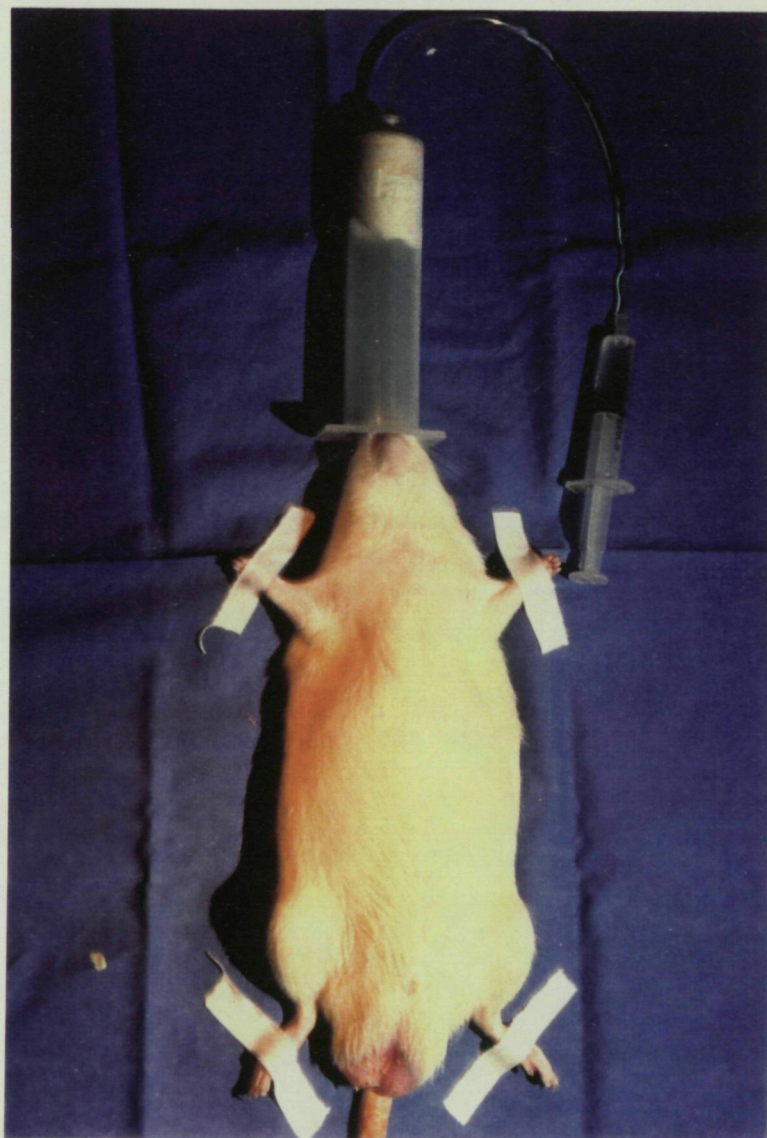


Foto 16- Detalle de la técnica anestésica
(mantenimiento de la anestesia)

3.2.2 BUSQUEDA DEL MODELO EXPERIMENTAL

3.2.2.1 Preliminares

Inicio del trabajo experimental en el laboratorio de cirugía experimental de la Facultad de Medicina de Reus.

Utilización de dos ratas albinas de unos 300 gr de peso, en un intento de encontrar una vía de abordaje válida a la columna lumbar.

Rata Nº 1

Anestesia con éter (inhalatoria)

Abordaje anterior, a través de la cavidad abdominal, debido a que no se encuentra un plano de despegamiento entre el peritoneo y la pared abdominal para realizar una vía al espacio retroperitoneal de forma extraperitoneal. Separación de las asas intestinales, cayendo sobre los grandes vasos abdominales, que se rebaten hacia la derecha del animal (abordaje por la izquierda, para evitar la vena cava inferior). Dificultad con la arteria renal izquierda, que está constantemente dentro del campo quirúrgico. Las masas musculares prevertebrales dificultan la localización de los cuerpos vertebrales y sobre todo de los espacios discales. Durante estas maniobras se produce accidentalmente un desgarro de un vaso grande, que provoca un sangrado excesivo del animal, llevándole al éxitus.

Una vez el animal muerto, se realiza una ampliación de la vía de forma transversal hacia la izquierda, hasta llegar a la línea de las espinosas, apreciando que podría existir una vía de abordaje más sencilla por vía póstero-lateral.

Comentario a la vía

La vía de abordaje abdominal es una vía muy dificultosa que requiere tiempo y mucha minuciosidad en su realización.

Rata Nº 2

Anestesia con éter (inhalatoria). Durante la realización de la misma, la rata sufre un paro cardiorrespiratorio que no se consigue remontar.

Animal en posición de decúbito lateral derecho, incisión póstero-lateral izquierda, transversal, por encima de la cresta ilíaca correspondiente. Abordaje del plano muscular paravertebral izquierdo y localización del plano óseo a través del mismo. Dificultad para identificar el espacio discal, debido a la posición de la apófisis transversa. Finalmente se consigue el abordaje del espacio discal, introduciendo la punta de la tijera por encima de la apófisis transversa a nivel del agujero de conjunción, y con un movimiento de apertura de la misma se consigue abrir el espacio. De esta forma se abren tres espacios discales consecutivos, correspondientes al primer espacio por encima del sacro y a los dos precedentes. Se observa el pequeño tamaño de los platillos vertebrales, que puede ser una dificultad añadida para llevar a cabo la experiencia.

Comentario a la vía

Esta vía pósterolateral puede ser una vía de acceso a la columna útil para este estudio.

Este caso no es valorable, debido a que el animal murió antes del acto quirúrgico.

Se constata el pequeño tamaño de los platillos vertebrales y la dificultad para introducir dentro de ellos cualquier tipo de estructura.

Se realiza un estudio radiográfico del animal (proyección lateral), en el que se aprecia la apertura de los discos vertebrales señalados.

Llama la atención la estructura de la cola de la rata, en que los segmentos óseos son de considerable mayor tamaño que los segmentos lumbares, y sobre todo que su abordaje puede ser mucho más sencillo.

Comentario a esta fase previa

La vía de abordaje abdominal no resulta útil para el trabajo.

La vía de abordaje pósterolateral, sin embargo, puede ser una buena alternativa.

Los platillos vertebrales, a nivel lumbar, son muy pequeños, lo que dificultará mucho el trabajo (las vértebras lumbares son las de mayor tamaño, por encima de la pelvis).

Posibilidad de utilizar los segmentos óseos de la cola de la rata, que son de mayor tamaño y teóricamente de más fácil acceso.

3.2.2.2 Estudio de una vía de abordaje a los cuerpos vertebrales de la cola de la rata

Anestesia inhalatoria con éter y colocación del animal en decúbito supino.

Incisión longitudinal de unos dos cms a nivel de la cara ventral de la raíz de la cola, allí donde se inicia la diferenciación entre cuerpo y cola. Se aprecia un conjunto de fibras blanquecinas nacaradas que rodean el esqueleto de la cola y que son los tendones que gobiernan los movimientos de la misma. En la línea media de este plano anatómico se encuentra un paquete vascular que será difícil de respetar en el curso de las experiencias. Se identifican con facilidad relativa los espacios discales, que son de mayor tamaño que a nivel lumbar.

Una vez terminada la vía de abordaje, se sacrifica al animal y se obtiene un segmento de cola con varios cuerpos vertebrales y sus discos correspondientes con el objeto de iniciar los estudios anatomopatológicos

Comentario

La cola de la rata cumple todos los requisitos necesarios para que se pueda llevar a cabo este trabajo y supera con creces a la región lumbar, ya que a la sencillez del abordaje de los espacios discales se unen unas características anatómicas más favorables, sobre todo en el tamaño de los platillos vertebrales.

3.2.2.3 Estudio radiológico de la circulación a nivel de la cola de la rata

Anestesia inhalatoria con éter y colocación del animal en decúbito supino.

Laparotomía media, abordando los grandes vasos y canalizando la arteria aorta y la vena cava inferior.

3.2.2.3.1 Método

Se ha utilizado el método de perfusión elaborado por Del Castillo y Trías (156), basado en los métodos de Nylander(118), Guth (58) y Hase (63), con bario micronizado.

En un soporte adecuado, se colocan dos recipientes para perfusión a la altura de un metro, para conseguir una presión de llenado suficiente. En un primer recipiente se coloca una solución de glicerina al 10%, que se utiliza para limpiar de sangre el territorio a perfundir, se pasa esta solución a 37°C hasta conseguir que fluya líquido de perfusión limpio por el catéter de la vena cava.

Previamente se ha inyectado al animal 1cc de heparina al 5% subcutánea.

Después de la solución de glicerina, se perfunde con una solución de bario micronizado que se ha preparado con 85,5 gr de Bario Dif (R), 17 gr de citrato sódico, 0,5 cc de etanol y agua destilada hasta 500 cc, colocado el frasco de perfusión a un metro de altura bajo agitación continua, perfundiendo hasta que por el catéter de la vena cava sólo se recoja solución de bario. En este momento se retiran los catéteres y se ligan los vasos, sacrificando al animal.

Comentario

Se trata de una técnica delicada y precisa que requiere varios intentos antes de que puedan conseguirse los resultados apetecidos.

3.2.2.3.2 Estudio a RX de la cola perfundida

Se aprecia:

- Un vaso ventral de grueso calibre que recorre toda la cola en una posición central.
- Dos vasos simétricos, de menor calibre que el anterior, en posición lateral, uno a cada lado de los cuerpos vertebrales y en posición algo posterior con respecto a ellos.
- Un vaso dorsal, de calibre mucho más pequeño que los anteriores, en posición media y simétrica al ventral.
- A nivel de cada cuerpo vertebral y en la zona estrictamente central, todos estos vasos emiten o reciben colaterales, una por cada vaso, formando una especie de entramado vascular en el plano coronal y a nivel de la zona media del cuerpo vertebral, de forma que a partir del cuerpo vertebral situado en el centro emergerían cuatro radios vasculares en las cuatro direcciones del espacio.
- También existe una fina y tupida malla vascular que rodea a los cuerpos vertebrales y que está distribuida por toda la cola.

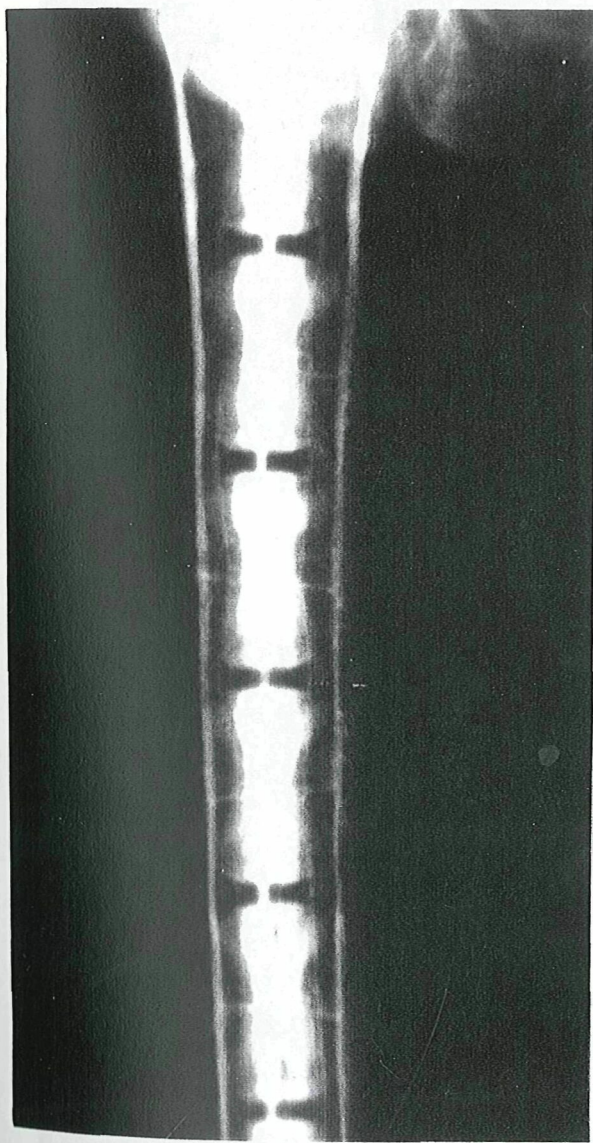


Foto 17- Cola perfundida.
Rx en proyección ántero-posterior.

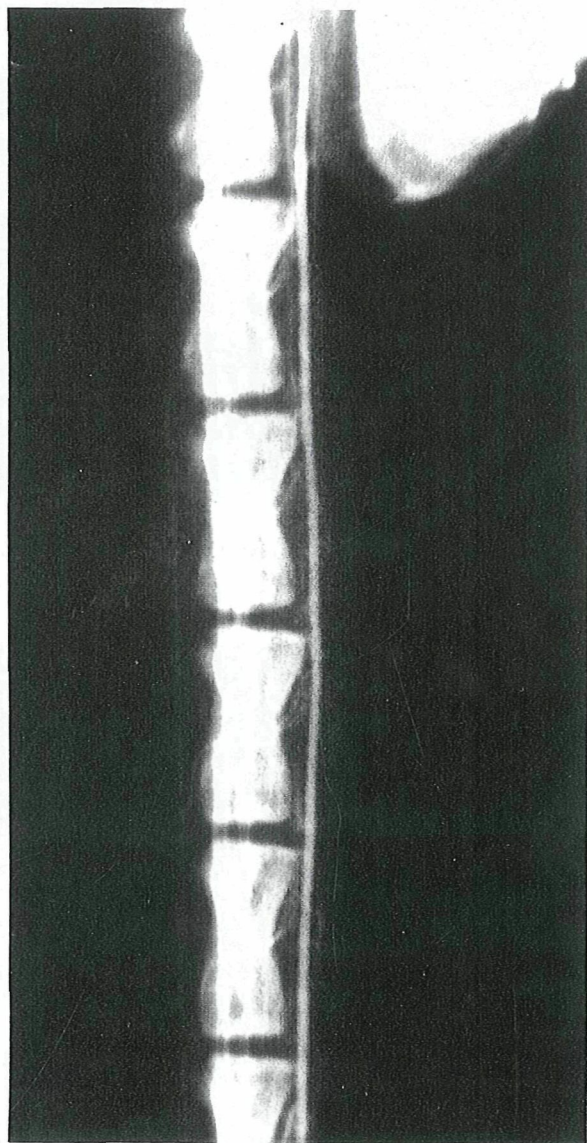


Foto 18- Cola perfundida.
Rx en proyección lateral.



Foto 19- Corte sagital de la cola perfundida y diafanizada
1. Disco 2. Vasos



Foto 20- Corte transversal de la cola perfundida y diafanizada
a nivel del tercio medio de la vértebra
1. Vértebra 2. Vasos

3.2.3 JUSTIFICACION DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

El estudio se diseñó en base a la hipótesis de trabajo con vistas a intentar una artrodesis intersomática mediante una teórica inducción ósea en el disco intervertebral.

Para ello, el grupo de estudio inicial se basa en una agresión mínima del disco, la misma agresión que se produciría al realizar una nucleotomía percutánea en la clínica humana, en la que solamente se extraería el núcleo pulposo, introduciendo en su interior las sustancias orgánicas con poder osteoinductor.

Para confirmar la actividad osteoinductora de los substratos orgánicos empleados, se diseñó un control con el mismo animal, implantándole intramuscularmente (pared abdominal) los mismos substratos.

Los resultados preliminares de esta primera experiencia nos llevaron a diseñar dos experiencias más, con un grado creciente de agresión en el disco, utilizando solamente uno de los substratos como elemento inductor.

En la segunda experiencia, la agresión quirúrgica del disco intervertebral fue máxima, realizando una extirpación en bloque del disco con sus placas epifisarias y cartílagos fisarios para dejar superficies óseas cruentas enfrentadas. El substrato orgánico que se introdujo fue la D.B.M., puesto que el periostio fue desechado en estas dos experiencias.

Este tipo de agresión del espacio intervertebral no podría darse en teoría en la clínica humana sin realizar un abordaje abierto del espacio intervertebral, por lo que no podría efectuarse por vía percutánea.

La tercera experiencia se diseñó en base a una agresión moderada del espacio intervertebral, es decir, se trata de un planteo intermedio entre las dos experiencias anteriores. En esta experiencia solamente se realiza el legrado de las superficies cartilaginosas de los platillos vertebrales, introduciendo entre ellas el elemento inductor de la osificación.

En este tercer caso, creemos que el legrado de la placa cartilaginosa sí podría efectuarse mediante técnica percutánea, pero probablemente utilizando instrumentos especializados (¿curetts sónicas? Lin 1985)(89), o el instrumental diseñado por el grupo de A. Schreiber (Leu y col. 1993) (87).

3.2.4 TECNICA QUIRURGICA

3.2.4.1 Primera serie

En esta primera serie se pretende valorar la respuesta del disco intervertebral al que se le ha extirpado el núcleo pulposo a la introducción en su interior de D.B.M. y de un fragmento de periostio autólogo.

También se utiliza el mismo animal para valorar la respuesta osteoinductora de la D.B.M. y del periostio, implantados en el músculo del abdomen.

Para esta experiencia se utilizaron 32 animales, con un peso medio al inicio de la experiencia de 290,37 gr y sin tener en cuenta el sexo de los mismos.

La técnica operatoria ha consistido en:

- a- Obtención del periostio autólogo de la tibia, de forma bilateral, obteniendo dos fragmentos que se mantienen en suero fisiológico, a temperatura ambiente, hasta su implantación.
- b- Abordaje de los tres espacios discales de la cola de la rata, consecutivos, previa identificación de los mismos por punción percutánea, mediante incisiones transversales separadas.

En un principio, se realizaba una incisión ventral longitudinal que abarcaba los tres espacios, pero luego se pasó a las incisiones transversales discontinuas, debido a su mayor rapidez y sencillez de realización y a que cumplían los mismos objetivos.

Una vez abierto el espacio discal, se extrae el núcleo pulposo con la punta del bisturí.

Colocación en los espacios discales expuestos y de proximal a distal:

- En el más proximal, un fragmento metálico, con la doble función de:
 - Identificar los espacios abordados al realizar las rx.
 - Control de la respuesta del disco a la agresión quirúrgica, pero sin introducir en su interior sustancias orgánicas sino un material inerte.
- En el siguiente espacio en el sentido caudal, se introduce un fragmento de D.B.M. de un peso aproximado de 5 mg
- En el tercer y último espacio abordado, el más caudal, se introduce uno de los fragmentos de periostio autólogo obtenido previamente.

- c- Como control, se realiza la implantación en la pared abdominal de la D.B.M. y del periostio. Para ello realizamos una incisión en la piel del abdomen, longitudinal y media, de unos 3 cm., para poner al descubierto la pared muscular del abdomen, en la cual se realizan dos bolsillos intramusculares, uno proximal y otro distal, siempre en el lado derecho del animal (por protocolo).
- En el bolsillo más proximal se introduce un fragmento de D.B.M. del mismo peso y tamaño que el introducido en el disco intervertebral.
 - En el bolsillo más distal, se coloca un fragmento de periostio autólogo, del mismo tamaño que en el disco.

Esto se lleva a cabo con la intención de que sea el mismo animal el que sirva como control de la actividad osteoinductiva de las sustancias orgánicas introducidas en los discos intervertebrales.

- d- Por último se suturan todas las heridas, cerrando los bolsillos musculares con un punto de material irreabsorbible, para su posterior identificación en el momento del sacrificio del animal.

Los animales son devueltos a sus jaulas, dejándolos a su libre evolución.



Foto 21- Incisiones transversales a nivel de la cola para el abordaje del disco intervertebral

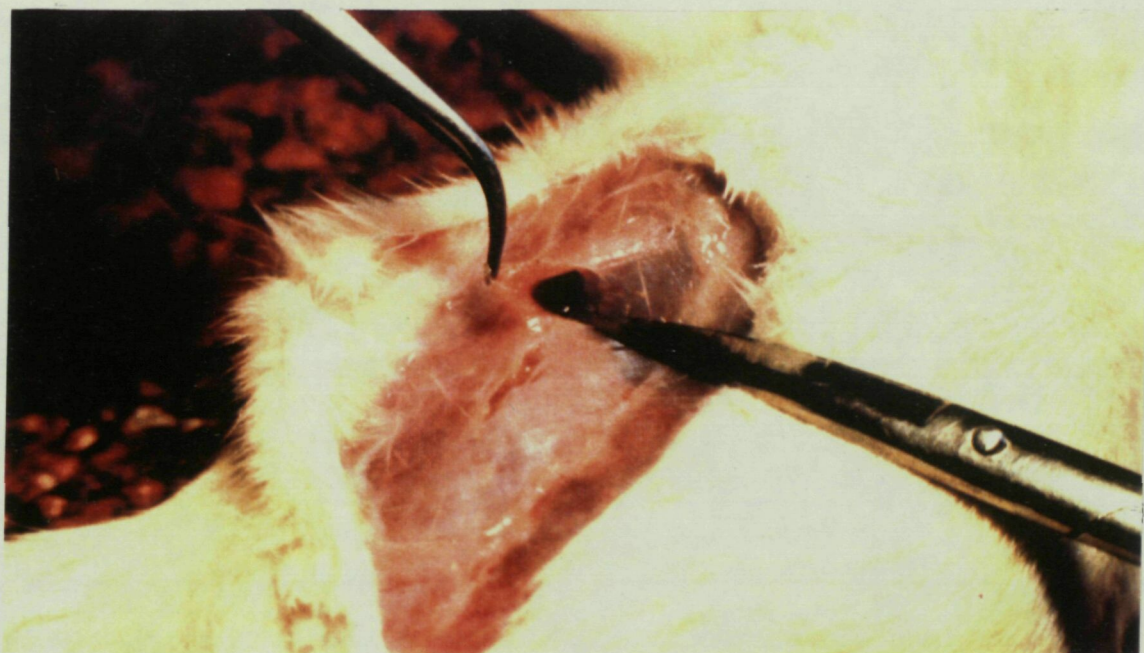


Foto 22- Práctica de los bolsillos en la pared abdominal

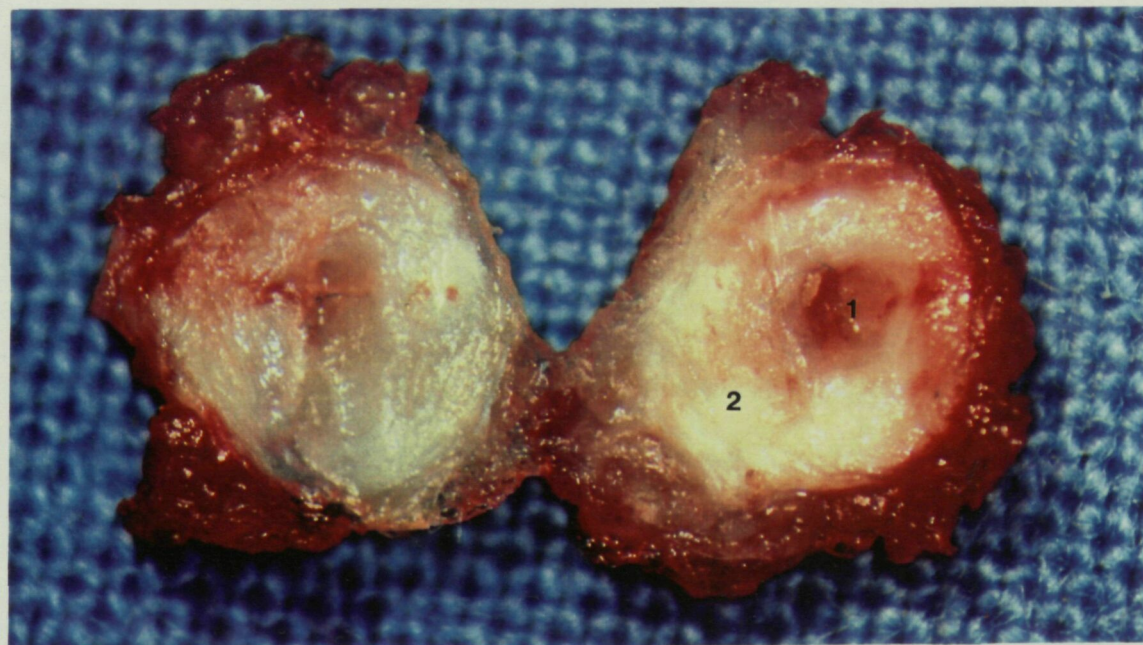
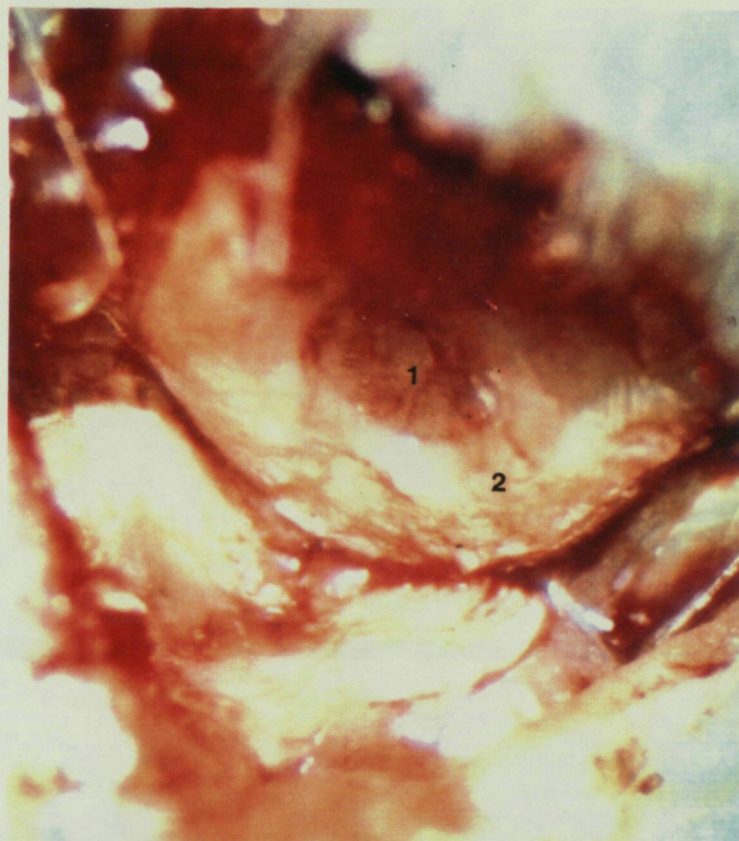


Foto 23- 1ª Serie: Disco intervertebral abierto

Foto 24- 2ª Serie: Disco intervertebral extirpado completamente y abierto

1. Núcleo 2. Anulus (lupa 5 aumentos)

3.2.4.2 Segunda serie

En esta serie se pretende valorar la respuesta obtenida al implantar D.B.M. en un segmento vertebral al que previamente se le ha extirpado completamente el disco vertebral y ambas plataformas (epífisis) vertebrales adyacentes, dejando dos superficies óseas cruentas, separadas por un espacio vacío en el que se implanta la D.B.M.

Para esta experiencia, utilizamos 32 animales de la misma clase que en la serie anterior, con un peso medio de 204,8 gr y con las mismas características.

La técnica operatoria ha consistido en el abordaje de dos espacios vertebrales consecutivos en la cola de la rata, previa identificación de los mismos por punción percutánea, con incisiones transversales.

Una vez abordado el espacio, se procedió a la extirpación del disco, con sus platillos vertebrales adyacentes, procurando hacerlo en un sólo bloque, intentando dejar la menor cantidad de cartílago fisario posible. Esta operación se efectúa de la misma forma en los dos espacios abordados.

Seguidamente se introdujo un fragmento de D.B.M. del mismo tamaño y peso que en la experiencia anterior, en el espacio más proximal. Se deja el espacio más distal sin introducir nada en su interior, para que sirva de control.

El cierre de los espacios se efectuó con puntos sueltos de seda, devolviendo posteriormente los animales a su jaula y dejándolos a su libre evolución.

3.2.4.3 Tercera serie

En esta serie se pretende valorar la respuesta obtenida a la introducción en el interior del espacio intervertebral de un fragmento de D.B.M., habiendo previamente extirpado el disco intervertebral de una forma subtotal, con denudación de los platillos vertebrales hasta hueso escleroso, mediante legrado del cartílago epifisario.

Para esta experiencia empleamos 32 animales, de un peso medio de 411,3 gr, de la misma clase y características que en las series anteriores.

La técnica operatoria ha consistido en el abordaje de dos espacios vertebrales contiguos, en la raíz de la cola, mediante incisiones transversales, previa identificación del espacio por punción percutánea.

Una vez abierto el espacio intervertebral, se extirpa el núcleo pulposo del disco y se procede al rascado mediante la hoja del tenotomo de las superficies cartilaginosas de los platillos vertebrales, hasta llegar a hueso escleroso. La misma operación se lleva a cabo en el siguiente espacio discal.

Una vez preparados ambos espacios vertebrales de la misma forma, se procede a la introducción en el interior del espacio más proximal de un fragmento de D.B.M. de igual forma y peso que en las experiencias anteriores.

El espacio distal se deja como control, no introduciendo nada en su interior.

Las incisiones se cierran con puntos sueltos de seda, devolviendo posteriormente los animales a sus jaulas y dejándolos a su libre evolución.

3.2.5 ESTUDIO RADIOGRAFICO

A las ocho semanas de la implantación, se sacrifican los animales y se efectúa un estudio radiográfico. Los animales son radiografiados por grupos de cuatro o cinco, según fueron intervenidos.

Se utiliza un aparato de Rx portátil (Transportix 25) y placas radiográficas convencionales.

Las características empleadas a un metro de distancia entre el foco y la placa fueron 40 Kw, 15 mA y un segundo de exposición.

3.2.6 OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Una vez el animal fallecido, se procede a la obtención de las muestras para el estudio anatomopatológico de los resultados, de la siguiente forma:

- en la primera serie, se obtiene un fragmento de cola que comprenda los tres discos intervenidos. Dos fragmentos de pared abdominal, cada uno de los cuales comprende uno de los bolsillos realizados en la cirugía.
- en la segunda y tercera series, se extirpa un fragmento de cola que incluya los dos discos intervertebrales intervenidos.

Inmediatamente, los fragmentos de cola son desprovistos de la gruesa piel que los envuelve al objeto de facilitar los cortes y se introducen en una solución de formaldehído al 10%, hasta su procesamiento.

Los fragmentos de pared muscular son introducidos sin más en formaldehído al 10%.

3.2.7 PROCESAMIENTO ANATOMOPATOLOGICO

Una vez las muestras han sido fijadas por el formol, se inicia el proceso de descalcificación de los fragmentos de cola por inmersión en ácido nítrico hasta que ésta se ha completado.

Los fragmentos de pared muscular no son sometidos a descalcificación.

Posteriormente, todas las muestras son incluidas en parafina, cortadas con un microtomo tipo Minot (Leinz) y teñidas mediante el método de la Hematoxilina-Eosina y el Tricrómico de Masson.

3.2.8 MÉTODOS DE ESTUDIO

La valoración y estudio de los resultados se ha realizado en las tres series siguiendo la metodología siguiente para la obtención de datos:

3.2.8.1 Mortalidad y morbilidad

En este apartado se ha hecho un análisis de:

3.2.8.1.1 -La mortalidad

En este caso dividiremos la mortalidad en dos apartados:

- a- Mortalidad asociada a la anestesia y técnica operatoria propiamente dicha. Es decir, que ocurra durante el acto quirúrgico o en el postoperatorio inmediato.

- b- Mortalidad debida a situaciones postoperatorias no inmediatas, que se consideren secundarias al modelo experimental.

3.2.8.1.2 -La morbilidad

Básicamente representada por la aparición de infecciones a nivel de la herida operatoria, o cualquier otro problema que pudiera haber interferido en el proceso y que hubiera sido consecuencia del modelo experimental.

La cirugía se efectuó siempre sin normas estrictas de asepsia, por lo que a pesar de que estos animales se defienden muy bien contra las infecciones, en algunos casos éstas pueden aparecer, ya sean superficiales o profundas.

Algunas infecciones profundas sólo serán detectadas en el análisis anatomopatológico como microabscesos, pero otras pueden provocar la presencia de fístulas al exterior.

De esta forma, dentro de este apartado nos interesaremos por la presencia de:

- microabscesos
- fístulas y otras alteraciones cutáneas

3.2.8.2 Variaciones morfológicas

En este apartado valoramos varios parámetros, todos ellos de difícil cuantificación, por lo que solamente se valorará su presencia o no.

3.2.8.2.1 -Aspecto

Toda cirugía provoca un cierto proceso inflamatorio reaccional, que se manifiesta por un aumento de volumen del área intervenida, máxime si la agresión quirúrgica ha afectado estructuras óseas o directamente relacionadas con el hueso.

En este caso valoramos la presencia o no de un aumento de volumen del área intervenida en el momento del sacrificio del animal.

También se valora la presencia de otras alteraciones morfológicas como puede ser la presencia de una angulación anormal de la cola en el segmento intervenido.

3.2.8.2.2 -Movilidad

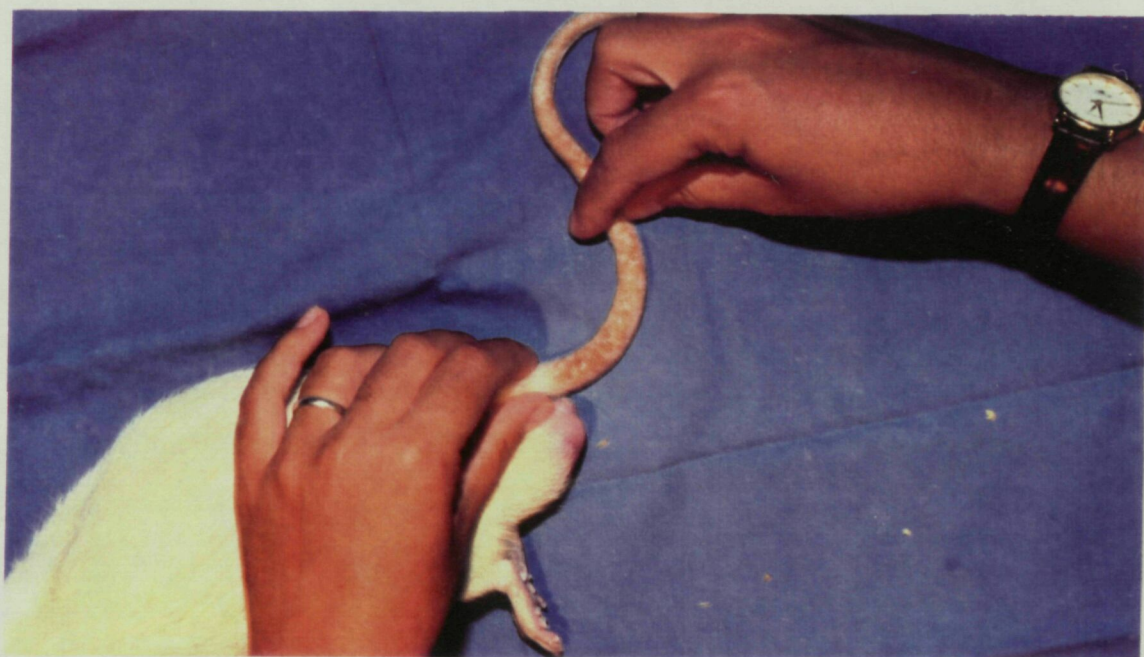
Un aspecto clínico muy difícil de cuantificar se refiere a la movilidad residual del segmento de cola intervenido, que podría servirnos para valorar de alguna forma la estabilidad conseguida.

Optamos por efectuar la comprobación mediante flexión manual de la cola, sujetándola por encima y por debajo del segmento intervenido (conjunto de espacios vertebrales intervenidos).

Conscientes de la dificultad de obtener resultados objetivables y de la subjetividad del método, se optó por efectuar la valoración de la siguiente forma:

- no existe movilidad en el segmento intervenido
- existe movilidad en el segmento intervenido
 - movilidad normal
 - movilidad disminuida

Ragni y Lindholm (1991) (125), efectúan la medición en conejos mediante proyecciones radiográficas laterales de los segmentos de columna en posición neutra y en máxima flexión, valorando después los ángulos que forman los ejes longitudinales de las vértebras adyacentes. Su trabajo fue realizado sobre 26 animales.



Fotos 25 y 26- Valoración de la movilidad residual del segmento intervenido
A. Flexión ventral B. Flexión dorsal

3.2.8.3 Peso

Se valorará también el peso de los especímenes antes de la cirugía y la variación en el mismo después de la experiencia, en vistas a una correlación entre estos parámetros y las alteraciones observadas radiológicamente en los espacios intervenidos.

La determinación de las variaciones en el peso de los animales entre antes y después de la experiencia, se ha hecho de una forma absoluta y en porcentajes (aumento relativo de peso), intentando de esta forma minimizar las diferencias de peso entre los animales al inicio de la experiencia.

El peso de los animales es una forma indirecta de valorar la edad de los individuos(95) y poder relacionar la maduración de los mismos con la respuesta del disco intervertebral.

3.2.8.4 Estudio radiológico

El estudio se ha hecho por interpretación visual de las radiografías obtenidas inmediatamente después del sacrificio de los animales.

En estas radiografías valoramos:

- A- En el primer grupo de estudio, en el que se introdujo metal, valoramos la presencia de éste en el lugar de la implantación, o su ausencia, lo cual sería indicativo de un posible rechazo por parte del organismo del animal.

Además valoramos su situación dentro o fuera del espacio discal, lo que nos puede dar una idea de la incontinencia del disco intervenido.

- B- El resto de las valoraciones han sido iguales para los tres grupos experimentales, efectuando:
- 1- Valoración de la pérdida de paralelismo entre los platillos vertebrales intervenidos, lo que podría interpretarse como signo indirecto de inestabilidad postquirúrgica.
 - 2- Valoración de alteraciones macroscópicas en los discos intervenidos:
 - a- erosión de los platillos vertebrales
 - b- ensanchamiento de los platillos vertebrales
 - c- pérdida de altura de los discos intervertebrales
 - d- presencia de calcificaciones extradiscuales pero en contacto con el disco, lo que indicaría la presencia de osificación heterotópica, a valorar si dependiente o no de la sustancia introducida en el disco intervertebral, en el caso de que éste no sea continente.
 - 3- Osificación en el interior del disco, ya sea:
 - a- total, la totalidad del disco se halla osificado y existe paso de trabéculas óseas de un cuerpo vertebral al otro
 - b- parcial, solamente existe paso de trabéculas óseas de un cuerpo vertebral al otro en parte del disco, pudiendo ser:
 - central
 - lateral

3.2.8.5 Estudio estadístico de los datos obtenidos

El análisis de los datos obtenidos mediante la observación de los parámetros previamente establecidos se ha efectuado de una forma porcentual para cada parámetro por separado y para cada grupo de estudio.

Dentro de cada grupo se han relacionado mediante tablas cruzadas los siguientes parámetros:

- 1- El peso del animal con la aparición de calcificaciones extradiscales y de osificaciones intradiscales, lo cual nos indicará si los resultados han estado muy influenciados por el diferente peso de los individuos al inicio de la experiencia.
- 2- La presencia de calcificaciones extradiscales con la presencia de erosiones en los platillos vertebrales al mismo nivel. Esto nos servirá para valorar si la aparición de calcificaciones es dependiente del mismo proceso inflamatorio que ha provocado la erosión o, por el contrario, se puede considerar producto directamente relacionado con el tipo de implante utilizado.
- 3- La aparición de osificaciones con el nivel intervenido, con lo que se valorará si existe o no una dependencia de la osificación discal (total o parcial) con el material introducido en el interior del disco.
- 4- Por último se han comparado los resultados de las series, relacionando solamente el nivel en el que se introdujo la D.B.M.

Los parámetros que hemos valorado han sido:

- la aparición de calcificaciones extradiscales
- la erosión de los platillos vertebrales
- el ensanchamiento de los platillos vertebrales
- la pérdida de altura de los discos

La valoración se ha hecho seleccionando el número total de apariciones del parámetro estudiado en las series, con las apariciones en cada serie por separado. Esto nos dará una valoración de la influencia de la técnica quirúrgica empleada en la aparición de los parámetros valorados.

3.2.8.5.1 Técnicas estadísticas utilizadas en el análisis de datos

Para el tratamiento estadístico de los datos se han usado las siguientes técnicas:

- a- Prueba de Chi Cuadrado para analizar tablas de contingencia como método para el contraste de la hipótesis de independencia entre dos variables categóricas (43,96).

- b- Prueba de análisis de la varianza para comparar las medias de variables cuantitativas entre categorías o grupos de datos independientes, y analizar, por tanto, la relación de la variable categórica que crea los grupos con la variable cuantitativa considerada (96). Los grupos han sido comparados entre sí por el método de Sheffé cuando el análisis de la varianza detecta globalmente diferencias estadísticamente significativas.

El nivel de riesgo alfa aceptado para todos los contrastes de hipótesis ha sido del 0,05 y los contrastes se han planteado a nivel bilateral, lo cual equivale a identificar la hipótesis nula con la igualdad de medias y porcentajes, y la hipótesis alternativa con la desigualdad.

3.2.8.5.2 Material

Para el almacenamiento de los datos se ha utilizado una base de datos creada mediante el paquete integrado OPEN ACCESS II PLUS (54) con un ordenador compatible 80386.

Los cálculos se han realizado en la Facultad de Medicina de Reus de la Universitat Rovira i Virgili mediante un ordenador IBM 80386 y el paquete estadístico SPSS/PC+ (152).

3.2.8.6 Estudio anatomopatológico

El estudio de las preparaciones microscópicas se ha realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Sant Joan de Reus.

3.2.8.6.1 Material

Se ha utilizado un microscopio óptico binocular de enseñanza con triple cabezal (Olimpus BH2) y un microscopio óptico binocular (Olimpus CHS). Para la reproducción fotográfica de las preparaciones se ha utilizado un microscopio

óptico con accesorio para fotografía (Olimpus BHS) y una cámara fotográfica Olympus PM-10ADS.

3.2.8.6.2 Método

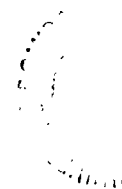
Se ha llevado a cabo una observación visual de las preparaciones, intentando valorar:

- En el disco intervertebral intervenido (en las tres series)
 - reacción de la estructura del hueso metafisario
 - afectación del cartílago fisario
 - afectación de la placa ósea epifisaria
 - afectación del disco intervertebral, tanto en su estructura tisular como en su disposición
 - tejido que aparece "de novo" en el disco intervertebral y estructuras adyacentes
 - presencia o no del material introducido en su interior y reacciones que ha provocado y de que ha sido objeto
 - presencia de calcificaciones heterotópicas
 - presencia de osificaciones en el disco
 - presencia de procesos patológicos intercurrentes (microabscesos)

- En las implantaciones intramusculares (solamente en la primera serie)
 - presencia o no del tejido implantado
 - reacción en el tejido muscular provocada por el tejido implantado
 - presencia de osificaciones heterotópicas inducidas y descripción de las mismas
 - presencia de procesos patológicos intercurrentes (microabscesos)

El resultado de las observaciones se expondrá de forma puramente descriptiva, debido a la dificultad de aplicar los métodos estadísticos.

4. RESULTADOS



4.1 RESULTADOS DE LA OBSERVACION CLINICA

Para la obtención de los resultados se ha aplicado la metodología expuesta en el apartado correspondiente. Realizaremos la exposición siguiendo el mismo orden.

4.1.1 PESO, MORTALIDAD Y MORBILIDAD

4.1.1.1 Peso

En la primera serie:

- antes de la cirugía el peso medio fue de 290,37 gr con una desviación típica de 40,48 gr.
- después de la cirugía el peso medio fue de 411,28 gr con una desviación típica de 54,07 gr.
- la diferencia de peso entre antes y después de la cirugía fue de un aumento medio de 120,90 gr con una desviación típica de 44,25 gr.
- el porcentaje de la diferencia de peso (aumento de peso relativo) fue de una media de 42,6% con una desviación típica de 17,2%

En la segunda serie:

- antes de la cirugía el peso fue de una media de 204,8 gr con una desviación típica de 44,0 gr.
- después de la cirugía el peso medio fue de 289,7 gr, con una desviación típica de 30,2 gr.
- la diferencia de peso entre antes y después de la experiencia fue de una media de 84,8 gr con una desviación típica de 37,8 gr.

-
- el porcentaje de diferencia de peso antes y después de la experiencia (aumento de peso relativo) fue de una media de 45,7%, con una desviación típica de 24,6%

En la tercera serie:

- el peso medio antes de la experiencia fue de 411,3 gr con una desviación típica de 88,6 gr.
- el peso medio al final del proceso fue de 538,9 gr, con una desviación típica de 109,2 gr.
- la diferencia de peso entre el inicio y el final de la experiencia (variación absoluta de peso) fue de una media de 127.6 gr con una desviación típica de 52,7 gr.
- el porcentaje de diferencia de peso (variación de peso relativa) ha sido de una media de 31,7% con una desviación típica de 15,0%.

4.1.1.2 Mortalidad

En ninguna de las tres series han habido casos de éxitus después de que el animal haya sido devuelto al estabulario.

En cambio, la mortalidad durante la cirugía (siempre debido a causas anestésicas) e inmediatamente después de la misma (antes de la recuperación del animal de la anestesia), ha sido de un 8,3% del total de animales, sumando las tres series, y según la distribución siguiente:

- en la primera serie no hubo ningún éxitus en estas circunstancias
- en la segunda serie fallecieron dos animales (6,2%) por esta causa
- en la tercera serie, fueron seis los animales fallecidos (18,7%)

4.1.1.3 Morbilidad

En este apartado se han valorado por separado las observaciones microscópicas (microabscesos) y los hallazgos macroscópicos (fístulas, úlceras, etc.), con el siguiente resultado:

- Observaciones microscópicas
 - En la primera serie:
 - en el primer disco intervenido (metal), no se encontró ningún absceso en las observaciones
 - en el disco intermedio (D.B.M) observamos la presencia de dos microabscesos (6,2%)
 - en el nivel más distal (periostio), solamente en un caso se ha observado un microabsceso
 - en el bolsillo de la pared abdominal, en el que se introdujo la D.B.M., observamos la presencia de microabscesos en cuatro ocasiones (12,5%)
 - en el bolsillo en el que se introdujo periostio se observaron microabscesos en tres ocasiones (9,3%)
 - En la segunda serie:
 - en el disco con D.B.M. se han observado tres microabscesos (10%)
 - en el disco control encontramos dos microabscesos (6,6%)
 - En la tercera serie:
 - en el disco proximal observamos la presencia de cuatro microabscesos (15,3%)
 - en el distal encontramos cinco (19,2%)

-
- Observaciones macroscópicas:
 - En la primera serie no se ha observado ninguna alteración cutánea evidente.

 - En la segunda serie hemos encontrado:
 - una fístula productiva al exterior
 - una dehiscencia de herida cicatrizada por segunda intención

 - En la tercera serie se han observado:
 - cuatro fístulas al exterior
 - tres úlceras en la zona intervenida
 - dos amputaciones espontáneas de la cola, varios segmentos por debajo de la zona intervenida
 - una necrosis dérmica a nivel de la zona de la cirugía

4.1.2 ASPECTO MACROSCOPICO DE LA COLA

En todos los elementos de las tres series hemos observado un aumento del volumen residual del segmento de cola intervenido en forma de huso. En ningún caso hemos observado signos inflamatorios macroscópicos.

En dos casos se ha observado una angulación irreductible de la cola a nivel de uno de los segmentos intervenidos. Ambos casos pertenecen a la segunda serie.

4.1.3 MOVILIDAD

La movilidad del segmento de cola intervenido fue afectada de forma diferente según las series:

- En la primera serie la movilidad se conservó en todos los casos, con una cierta disminución de la misma de forma global. Podríamos decir que la movilidad en esta serie se ha conservado normal.
- En la segunda serie, la afectación de la movilidad fue muy importante, consiguiéndose en todos los casos una artrodesis clínica. Podríamos catalogar la serie como de pérdida de la movilidad a nivel del segmento intervenido.
- En la tercera serie, la afectación de la movilidad ha sido de una forma intermedia con respecto a las anteriores. Se ha observado una disminución importante de la misma en la mayoría de los casos, pero solamente en un caso se llegó a la artrodesis clínica y en unos pocos casos (cinco), la movilidad fue mayor que en la globalidad de la serie. Podríamos catalogar esta serie como de una movilidad claramente disminuida de forma global.

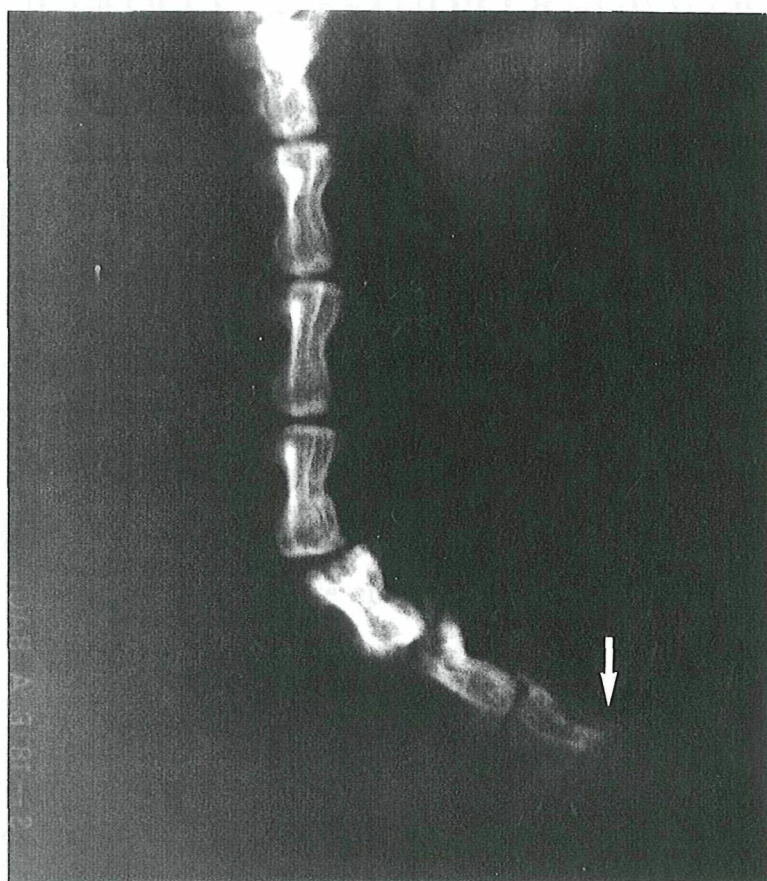


Foto 27- Amputación espontánea de la cola en una rata de la 3ª Serie (Rx)



Foto 28- Demostración radiológica de la pérdida de movilidad del segmento intervenido
Rata de la 3ª Serie (Rx) A. Flexión ventral B. Flexión dorsal

4.2 RESULTADO DEL ESTUDIO RADIOLOGICO

4.2.1 RESULTADO DEL ESTUDIO RADIOLOGICO DE LA PRIMERA SERIE

En este primer grupo de animales, se ha valorado la presencia o no del metal en el disco intervertebral y su situación en él.

Se ha visto que de las 32 ratas de que consta el grupo, en 31 casos el metal permanecía presente y solamente en un caso éste había desaparecido (posible migración al exterior).

En cambio, la posición del metal en relación al disco sufrió variaciones importantes, ya que en 24 casos éste se encontraba fuera del mismo y solamente en 7 casos 22,5%, permanecía en su interior.

En cuanto al paralelismo residual entre los platillos vertebrales que forman el espacio discal en los discos intervenidos, nos hemos encontrado con que:

- en 23 casos no ha habido ninguna pérdida del mismo (71,9%)
- en 6 casos la pérdida se ha producido en un sólo nivel (18,8%)
- en un caso la pérdida se ha producido a dos niveles (3,1%)
- en dos casos la pérdida se ha producido en los tres niveles intervenidos (6,3%)

La erosión de los platillos vertebrales la hemos encontrado:

- en 11 ocasiones (34,4%) en el nivel proximal (metal)
- en 8 ocasiones (25%) en el nivel medio (D.B.M.)

- en 7 ocasiones (21,9%) en el nivel distal (periostio)
no existiendo diferencia significativa entre la erosión y el disco intervenido ($p=0,5037$).

El ensanchamiento de los platillos vertebrales se constató:

- en 9 ocasiones en el nivel proximal (38,2%)
- en 7 ocasiones en el nivel medio (21,9%)
- en 4 ocasiones en el nivel distal (12,5%)

tampoco existe diferencia significativa ($p=0,3011$).

La pérdida de altura del disco se produjo:

- en 26 ocasiones (81,3%) en los tres discos a la vez
- en 3 casos (9,4%) en dos discos a la vez
- en 2 casos (6,3%) en solamente un disco
- en un caso (3,1%) no se produjo pérdida de altura en ningún disco.

En cuanto a los niveles en que se distribuyeron estas pérdidas de altura, se han distribuido de la manera siguiente:

- en 28 casos en el nivel proximal (87,5%)
- en 29 ocasiones en el nivel medio (90,6%)
- en 29 casos en el nivel distal (90,6%)

no existiendo tampoco diferencia significativa ($p=0,8943$).

La aparición de calcificaciones laterales (extradiscales, pero en su vecindad), se ha distribuido de la siguiente forma:

- en el disco proximal (metal) han aparecido calcificaciones en 5 ocasiones (15,6%)
- en el disco medio (D.B.M.) han aparecido calcificaciones en 24

ocasiones (75%)

- en el disco distal (periostio) en solamente dos ocasiones (6,3%)

en este caso sí existe una diferencia muy significativa entre la aparición de calcificaciones y el nivel intervenido ($p < 0,0001$).

Se ha relacionado el peso de los animales con la aparición de calcificaciones.

RELACION ENTRE EL PESO Y LA APARICION DE CALCIFICACIONES

	ninguna calcificación n = 6	calcificación en un disco n = 21	calcificación en dos discos n = 5	P
peso antes	* 273,5 + (22,3)	297,9 (45,6)	279,0 (28,1)	0,3503
diferencia de peso	122,0 (42,4)	121,3 (42,8)	117,9 (61,2)	0,9859
% diferencia de peso	45,5 (17,9)	42,0 (17,0)	41,3 (20,8)	0,9024

n = nº individuos * = media + - (desviación típica)

La presencia de calcificaciones también se ha relacionado con la existencia de erosiones en los platillos vertebrales de cada nivel intervenido, ofreciéndonos los siguientes datos:

- En el disco proximal existe una relación significativa entre las variables, siendo más frecuente la aparición de calcificaciones en presencia de erosión ($p=0,0193$).

RELACION ENTRE CALCIFICACIONES Y EROSIONES DISCO PROXIMAL

nº de casos % líneas	no calcificación	sí calcificación	total líneas
no erosión	20 95,2	1 4,8	21 65,6
sí erosión	7 63,6	4 36,4	11 34,4
total columnas	27 84,4	5 15,6	32 100,0

($p= 0,0193$)

-
- En el disco medio, no existe ninguna relación significativa entre las variables ($p=1,0000$).

RELACION ENTRE CALCIFICACIONES Y EROSIONES

DISCO MEDIO

nº de casos % líneas	no calcificación	sí calcificación	total líneas
no erosión	6 25,0	18 75,0	24 75,0
sí erosión	2 25,0	6 75,0	8 25,0
total columnas	8 25,0	24 75,0	32 100,0

($p= 1,0000$)

-
- En el disco distal tampoco existe relación significativa entre las variables
($p=0,3203$)

RELACION ENTRE CALCIFICACIONES Y EROSIONES

DISCO DISTAL

nº casos % línea	no calcificación	sí calcificación	total líneas
no erosión	24 96,0	1 4,0	25 78,1
sí erosión	6 85,7	1 14,3	7 21,9
total columnas	30 93,8	2 50,0	32 100,0

($p= 0,3203$)

Tampoco existe relación entre el ensanchamiento de los platillos vertebrales y la aparición de calcificaciones extradiscales en ninguno de los tres niveles.

En cuanto a osificaciones radiológicas en el interior del disco intervertebral, no se ha apreciado en ningún caso ningún tipo de osificación, ya sea central, lateral o total, es decir, 100% de resultados negativos.



Foto 29- Rata 1ª Serie
Se observa un osículo bien definido
en el espacio intervertebral medio y
una disminución de altura a nivel de
este espacio y del espacio más distal

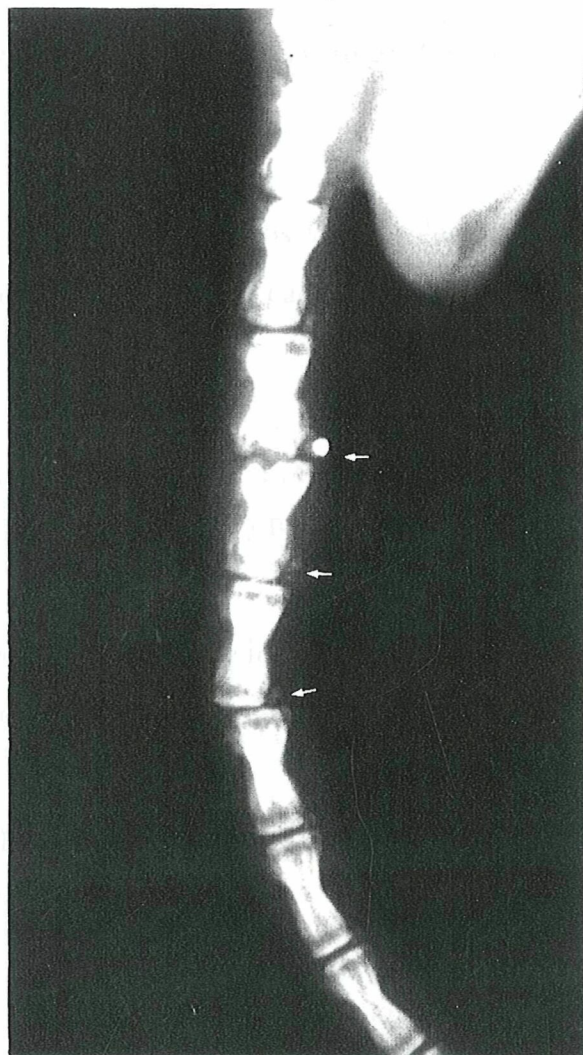


Foto 30- Rata 1ª Serie
- erosión del platillo vertebral en el
disco proximal
- calcificación extradiscal en el disco
medio
- pérdida de paralelismo del disco distal

4.2.2 RESULTADO DEL ESTUDIO RADIOLOGICO DE LA SEGUNDA SERIE

Este grupo está constituido por 30 ratas y sólo se han intervenido dos discos por individuo.

En cuanto a la pérdida o no del paralelismo de los platillos vertebrales en los niveles intervenidos, se observó que en el 100% de los casos no ha habido pérdida del mismo.

La erosión en los platillos vertebrales intervenidos solamente se ha dado en un caso, a nivel de un platillo distal en el disco proximal (D.B.M.).

El ensanchamiento de los platillos aparece en el 100% de los casos, en todos los discos intervenidos y tanto en el platillo proximal como en el distal.

La pérdida de altura del disco se ha producido en el 100% de los casos e igualmente en todos los discos intervenidos.

La aparición de calcificaciones extradiscuales laterales ha sido la siguiente:

- en el disco proximal (D.B.M.) han aparecido 4 calcificaciones (13,3%)
- en el disco distal (control) igualmente han aparecido 4 calcificaciones (13,3%)
- solamente en dos casos ha coincidido la presencia de calcificaciones en los dos discos simultáneamente (6,6%).

Las osificaciones en el interior del disco se han distribuido de la forma siguiente:

- En el disco proximal (D.B.M.)
 - osificación total en 13 casos (43,3%)
 - osificación central en 9 casos (30,0%)
- En el disco distal (control)
 - osificación total en 12 casos (40,0%)
 - osificación central en 6 casos (20,0%).

Si relacionamos los niveles intervenidos con la aparición de osificaciones mediante una tabla cruzada, obtenemos el siguiente resultado, en el cual no se aprecia ninguna relación significativa entre la presencia de osificación discal (del tipo que sea) y el disco intervenido ($p=0,8661$).

RELACION ENTRE EL NIVEL DE INTERVENCION Y LA PRESENCIA DE OSIFICACIONES

nº casos % líneas % columnas	no osificación nivel distal	sí osificación nivel distal	total líneas
no osificación nivel proximal	3 37,5 25,0	5 62,5 27,8	8 26,7
sí osificación nivel proximal	9 40,9 75,0	13 59,1 72,2	22 73,3
total columnas	12 40,0	18 60,0	30 100,0

($p= 0,8661$)

Se ha relacionado también el peso de los animales con la aparición de osificaciones, no apreciándose relación significativa entre el número de osificaciones (totales) presentadas y el peso del animal.

RELACION ENTRE EL PESO Y LA APARICION DE OSIFICACIONES

	ninguna osificación n = 3	osificación en un disco n = 14	osificación en dos discos n = 13	P
peso antes	* 239,6 + (58,5)	203 (51,2)	198,0 (30,2)	0,3460
diferencia de peso	54,0 (31,0)	79,0 (40,6)	98,2 (32,1)	0,1378
% diferencia de peso	25,9 (21,3)	44,0 (27,5)	52,0 (20,6)	0,2475

n = nº de individuos * = media + = (desviación típica)



Foto 31- Rata 2ª Serie
Arthrodesis ósea en ambos espacios intervenidos

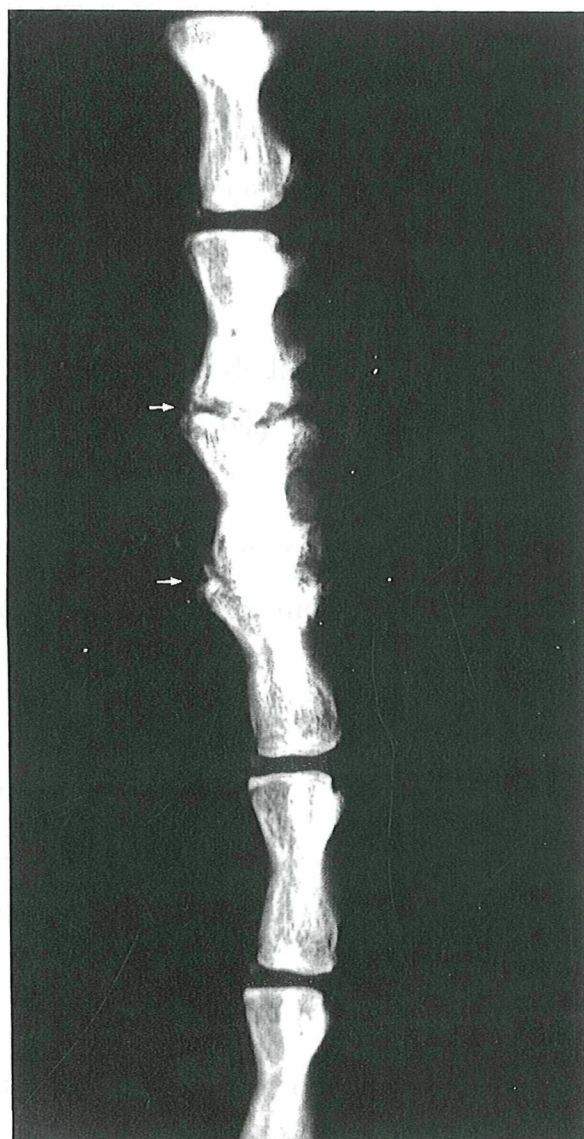


Foto 32- Rata 2ª Serie
- Arthrodesis ósea en el espacio control (distal)
- Unión rígida en el espacio con D.B.M. pero sin llegar a la unión ósea

4.2.3 RESULTADO DEL ESTUDIO RADIOLOGICO DE LA TERCERA SERIE

En este grupo se han podido valorar 26 individuos, y al igual que en el grupo anterior solamente se han intervenido dos espacios discales.

La pérdida de paralelismo entre los platillos vertebrales de los discos intervenidos ha estado presente en una sola ocasión y en los dos niveles a la vez.

La erosión en los platillos vertebrales se ha distribuido de la forma siguiente:

- a nivel proximal, en 12 ocasiones (D.B.M.) (46,1%)
- a nivel distal, en 17 ocasiones (control) (65,4%)

sin distinguir entre platillo proximal y distal, no existiendo diferencia significativa entre la presencia de erosión y el nivel intervenido ($p=0,1626$).

Se ha producido ensanchamiento de los platillos:

- en el disco proximal, en 10 ocasiones (38,4%)
- en el disco distal, en 16 ocasiones (61,6%)

sin distinguir entre platillo proximal y distal no existiendo tampoco diferencia significativa ($p=0,0960$).

La pérdida de altura del disco intervenido se ha presentado como sigue:

- en 8 casos no ha habido pérdida de altura (30,8%)
- en 6 casos se ha presentado en un sólo nivel (23,1%)
- en 12 casos se ha presentado en dos niveles (46,2%)
- en el disco proximal se ha presentado en 13 ocasiones (50,0%)

- en el disco distal se ha presentado en 17 ocasiones (65,4%)
no existiendo diferencia significativa ($p=0,2615$).

La aparición de calcificaciones laterales, se ha producido de la siguiente forma:

- en el disco proximal han aparecido calcificaciones en 15 ocasiones (57,7%)
- en el disco distal han aparecido calcificaciones en 4 ocasiones (15,4%)
existiendo una clara diferencia significativa entre los niveles intervenidos ($p=0,0001$).

RESPUESTA DEL DISCO
INTERVERTEBRAL DE LA RATA A LA
INTRODUCCION EN SU INTERIOR DE
SUBSTRATOS ORGANICOS INDUCTORES
DE LA OSIFICACION

Se ha relacionado el peso del animal con la aparición de calcificaciones con el siguiente resultado:

RELACION ENTRE EL PESO Y LA APARICION DE CALCIFICACIONES

	ninguna calcificación n = 9	calcificación en un disco n = 15	calcificación en dos discos n = 2	P
peso antes	* 414,5 + (123,1)	402,9 (68,5)	460,0 (56,5)	0,7045
diferencia de peso	131,5 (69,7)	127,7 (45,7)	109,0 (21,2)	0,8707
% diferencia de peso	33,7 (21,3)	31,5 (11,2)	24,1 (7,5)	0,7323

n = nº individuos * = media + = (desviación típica)

No existe ninguna relación significativa entre el peso del animal y la aparición de calcificaciones.

Se ha relacionado la presencia de calcificaciones con la existencia de erosiones, con los siguientes resultados:

RELACION ENTRE CALCIFICACIONES Y EROSIONES

DISCO PROXIMAL

nº de casos % líneas	no calcificación	sí calcificación	total líneas
no erosión	4 28,6	10 71,4	14 53,8
sí erosión	7 58,3	5 41,7	12 46,2
total columnas	11 42,3	15 57,7	26 100,0

(p= 0,1257)

RELACION ENTRE CALCIFICACIONES Y EROSIONES

DISCO DISTAL

nº de casos % líneas	no calcificación	sí calcificación	total líneas
no erosión	9 100,0		9 34,6
sí erosión	13 76,5	4 23,5	17 65,4
total columnas	22 84,6	4 15,4	26 100,0

(p= 0,1136)

No se observa ningún tipo de relación entre la presencia de erosiones y la aparición de calcificaciones en ninguno de los dos niveles.

En cuanto a la osificación del disco, solamente en un caso se produjo la osificación total de los dos niveles.

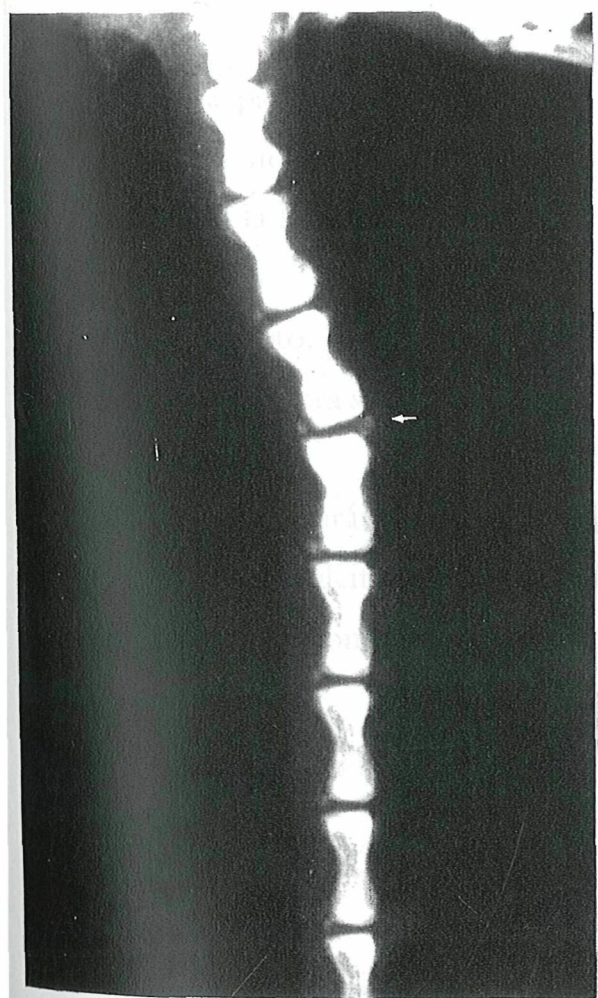


Foto 33- Rata 3ª Serie
- Osificación en espacio con D.B.M.

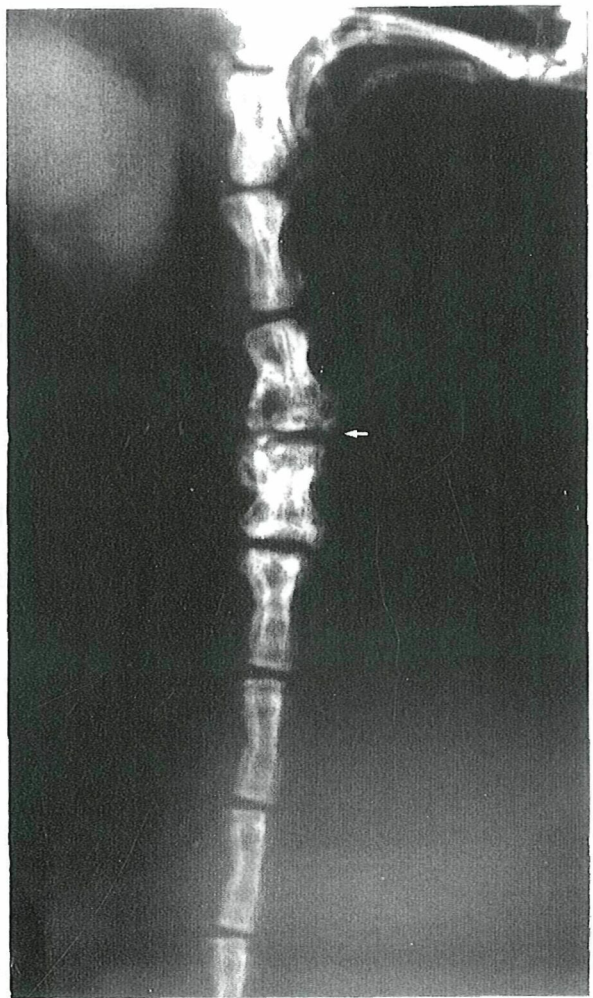


Foto 34- Rata 3ª Serie
- Desestructuración ósea del disco proximal por infección

4.2.4 COMPARACION ENTRE SERIES

Al intentar comparar las tres series entre sí, nos damos cuenta de que los resultados de la segunda serie son tan diferentes a los de las otras dos (primera y tercera), que no precisan ningún tipo de comparación estadística para su valoración.

Por otra parte, de los niveles intervenidos en todas las series, el nivel que realmente nos interesa de cara a las conclusiones finales es aquél en el que se introdujo la D.B.M.

Por todo esto, solamente hemos realizado el estudio comparativo entre la primera y tercera series y solamente para el disco en que se introdujo la D.B.M.

De todos los parámetros valorados, el más significativo en este estudio es la aparición de calcificaciones extradiscales (en ninguno de los dos grupos se obtuvo osificaciones en el interior del disco).

Al relacionar el número de calcificaciones totales (de los dos grupos) con las aparecidas en cada grupo por separado, tendremos una valoración de la importancia de la técnica quirúrgica en la aparición de las mismas. De esta comparación obtenemos la siguiente tabla cruzada en la que no existe diferencia significativa entre los dos grupos de estudio ($p = 0,1625$).

RELACION ENTRE LA TECNICA QUIRURGICA Y LA APARICION DE CALCIFICACIONES

nº de casos % líneas % columnas	Primera Serie	Tercera Serie	Total líneas
no calcificaciones	8 42,1 25,0	11 57,9 42,3	19 32,8
sí calcificaciones	24 61,5 75,0	15 38,5 57,7	39 67,2
total columnas	32 55,2	26 44,8	58 100,0

En la segunda serie la aparición de calcificaciones es despreciable.

De todos los demás parámetros valorados y en las mismas condiciones, la valoración de las tablas cruzadas ha arrojado los siguientes resultados:

- en cuanto a las erosiones de los platillos vertebrales, no existe diferencia significativa ($p=0,0918$)
- en cuanto al ensanchamiento de los platillos vertebrales tampoco existe diferencia significativa ($p=0,1675$)
- en cuanto a la pérdida de altura de los discos, existe una diferencia muy significativa entre los resultados con una técnica o con otra. Mientras que en la primera serie el 90,6% de los casos presentaron pérdida de altura en el disco con D.B.M., solamente lo hicieron el 50% en la tercera serie ($p=0,0005$).

4.3 RESULTADO DEL ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO

4.3.1 RESULTADOS DE LA PRIMERA SERIE

4.3.1.1 Implantes en la pared abdominal

4.3.1.1.1 -D.B.M.

En todas las preparaciones aparece sistemáticamente una formación calcificada de diferentes tamaños, aproximadamente comprendidos entre 0,5mm² y 1,5mm² de superficie y con la siguiente estructura habitual:

- Un centro de médula ósea, madura, poco productiva, en la que predomina el tejido adiposo sobre las células hematopoyéticas.
- Una capa externa, más o menos gruesa, de tejido óseo con apariencia de inmadurez, pero que creemos es debido a las dificultades del corte, ya que se trata de un hueso sin descalcificar que rodea a la médula ósea, en el que se pueden apreciar células (osteocitos) en su interior, con cierta dificultad por ser el corte superior a las 5 micras de grosor. Este tejido óseo no se observa estructurado en láminas alrededor de los vasos sanguíneos, y a la tinción con hematoxilina-eosina adquiere una coloración rosácea con zonas oscuras azuladas, debido a los depósitos de calcio. En alguna preparación se han podido observar zonas de hueso lamelar dentro de esta masa calcificada. A la tinción con tricrómico de Masson, esta estructura adquiere una coloración verde intenso, debido a la gran cantidad de colágeno que contiene, apreciándose mucho mejor en esta tinción las células en el interior de las celdas óseas (osteocitos).

-
- Rodeando a la estructura en anillo irregular que representa lo descrito hasta ahora, se encuentra en muchas preparaciones y no siempre de forma completa otro anillo, más irregular en su grosor, de tejido óseo desmineralizado, con estructura lamelar y con celdas óseas vacías que correspondería a los restos de la D.B.M. que se implantó. Generalmente esta estructura se encuentra invadida, de forma irregular, por un tejido fibroso más o menos denso, muy celular y con vasos sanguíneos, que en ocasiones casi la sustituyen por completo, dejándola reducida a pequeños fragmentos dentro de un anillo de tejido fibroso muy celular.

Habitualmente esta estructura está rodeada de un tejido fibroso laxo con zonas de tejido adiposo y todo ello dentro de la masa muscular.

- La estructura de hueso neoformado acostumbra a estar tapizada internamente por una capa de células poligonales, dispuestas en línea, que podemos identificar como osteoblastos, y externamente por una línea más oscura que la separa del resto de la D.B.M. y del tejido fibroso celular. Esta línea externa está compuesta por una capa de osteoblastos y en algunas zonas se han visualizado osteoclastos. Esto representaría el frente de mineralización del nuevo hueso.

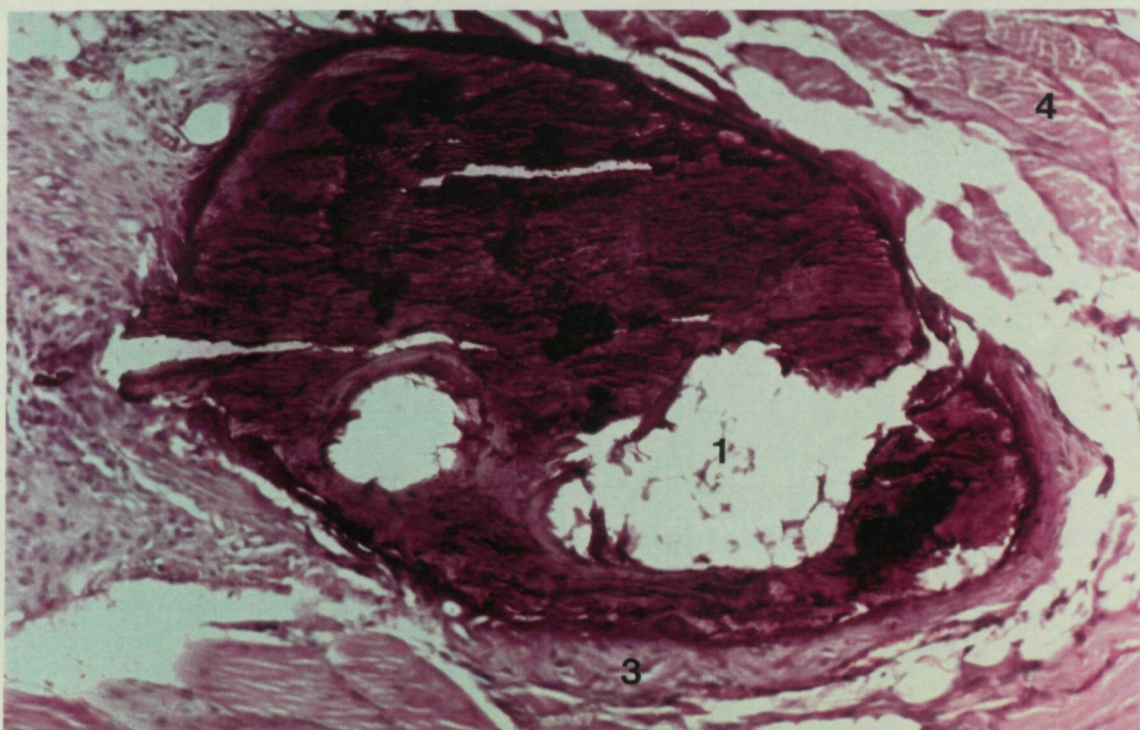
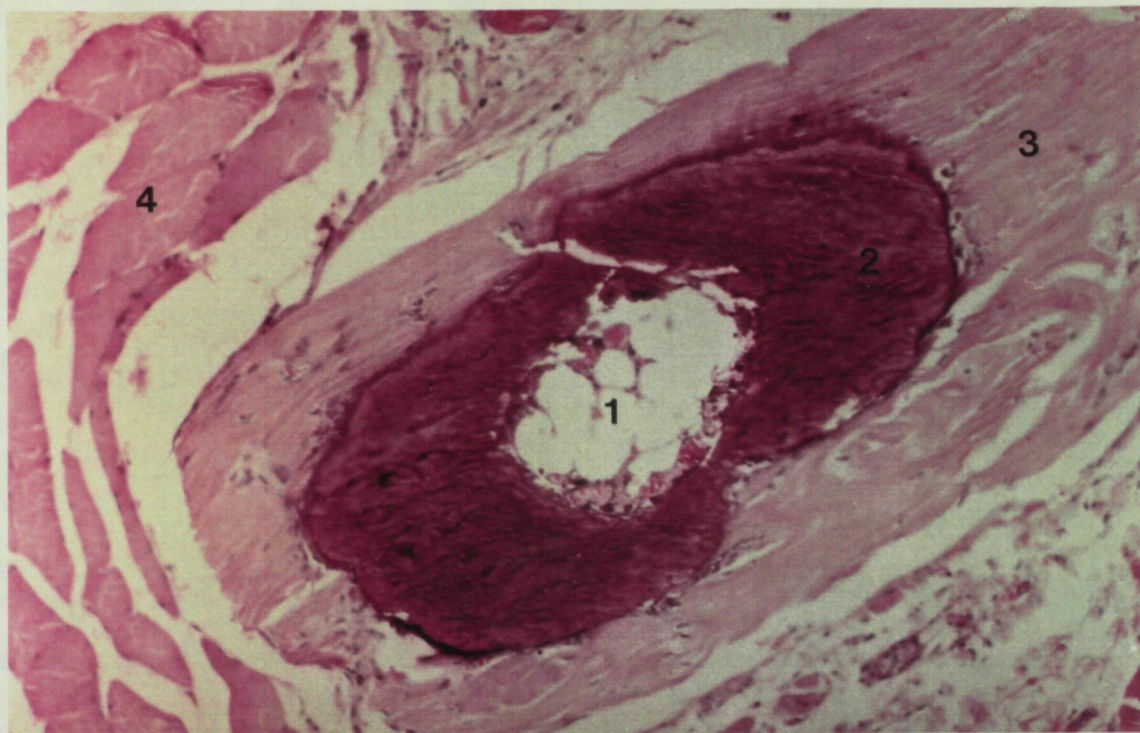
4.3.1.1.2 Periostio

En estas preparaciones se observa siempre la estructura típica del músculo estriado, agrupado en fascículos, entre los cuales aparecen tractos fibrosos más o menos densos y con zonas de tejido adiposo por donde circulan los vasos sanguíneos.

En algunas zonas estos tractos fibrosos aparecen más amplios y más celulares.

El fragmento de músculo está limitado por un lado por una fina capa de tejido fibroso denso, y por otro lado por una capa de tejido fibroso más laxo y más amplio, con muchos vasos.

En ningún caso se ha observado ninguna estructura que pudiera compararse con un osículo de los encontrados cuando se ha implantado la D.B.M., aunque en tres ocasiones se han observado pequeñas calcificaciones de carácter microscópico de nueva formación rodeadas de un tejido fibroso, pero sin médula ósea en su interior.



Fotos 35 y 36- Osículo en músculo, por implantación de D.B.M.
1. Médula ósea 2. Hueso nuevo 3. D.B.M. 4. Músculo (H-E 10x)

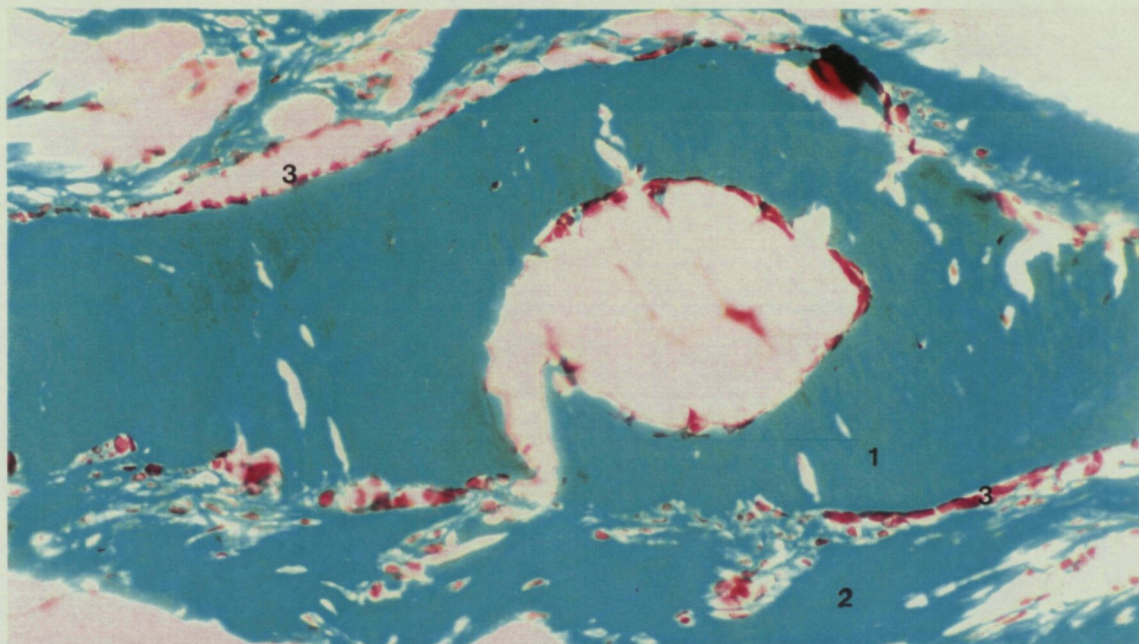


Foto 37- Osículo en músculo por implantación de D.B.M.
1. Hueso nuevo 2. D.B.M. 3. Osteoblastos en la línea de cementación
(tricrómico de Masson 20x)

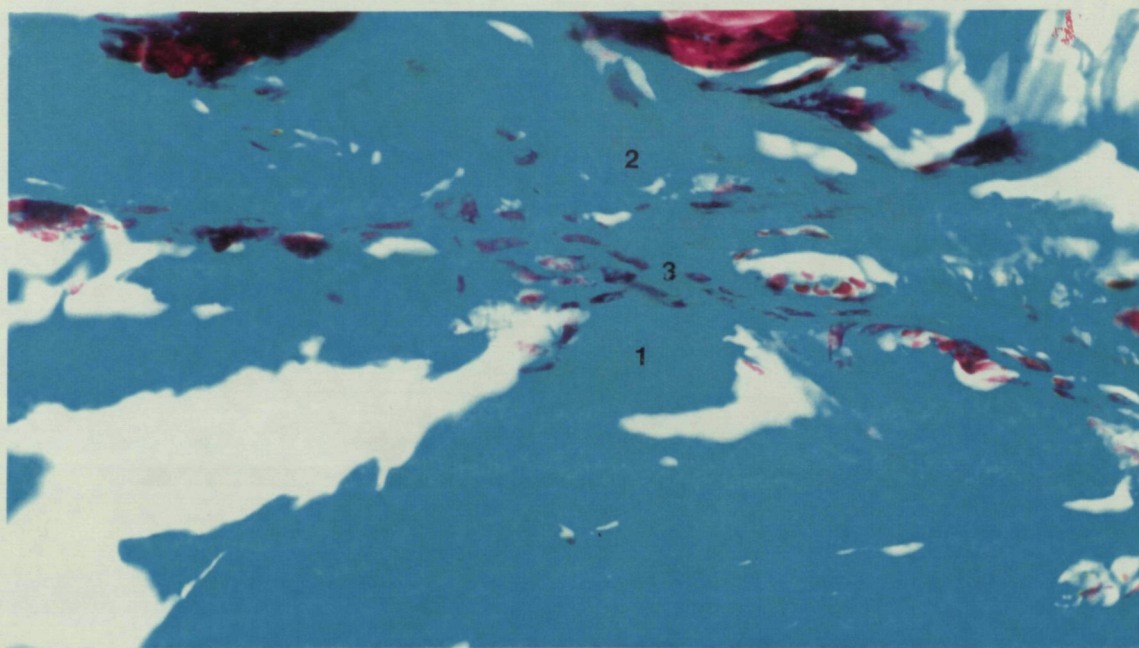


Foto 38- Osículo en músculo por implante de D.B.M.
1. Hueso nuevo 2. D.B.M. 3. Línea de osificación con osteoblastos
(Tricrómico de Masson 40x)

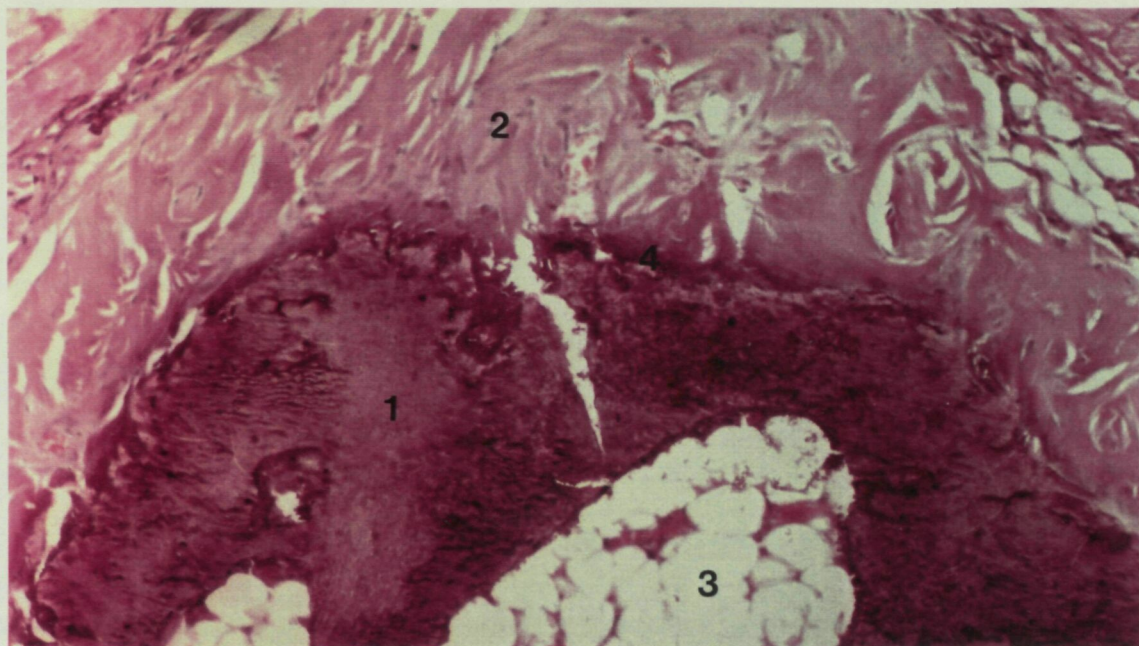


Foto 39- Osículo en músculo por implante de D.B.M.
1. Hueso nuevo 2. D.B.M. 3. Médula ósea
4. Línea de osificación (H-E 10x)



Foto 40- Osículo en músculo por implante de D.B.M.
1. Hueso nuevo 2. Osteoclasto y osteoblastos
3. Línea de osificación con osteoblastos (H-E 40x)

4.3.1.2 Implantes en disco intervertebral

4.3.1.2.1 Disco proximal (metal)

En la gran mayoría de los casos nos encontramos con las siguientes alteraciones microscópicas:

- El hueso metafisario está conservado con trabéculas normales y espacios intertrabeculares rellenos de médula ósea muy poco celular y con mucho tejido adiposo.
- El cartílago fisario mantiene una situación y estructura normal, con la distribución típica en banda ondulada que separa la metafisis de la epífisis y con las columnas de condrocitos de aspecto normal.
- La epífisis ósea está conservada en la mayoría de los casos con trabeculación ósea normal y médula ósea semejante al hueso metafisario. En algunos casos el hueso parece más reaccional, con trabéculas óseas más engrosadas, lo que disminuye los espacios intertrabeculares que se encuentran rellenos de médula ósea más celular.
- La capa de cartílago hialino que cubre el hueso epifisario tiene tendencia a perder la estructura de capa uniforme y la encontramos generalmente desestructurada, con las células cartilaginosas en grupos inconexos. En ocasiones no existen restos de ella.
- El ánulus lo encontramos sistemáticamente en todas las preparaciones engrosado y desestructurado. Existe una irregularidad en la estratificación de las capas de tejido fibrocartilaginoso normal, que

pierden su disposición concéntrica.

Las células del ánulus (condrocitos), que normalmente destacan poco en las preparaciones microscópicas y que están dispuestas entre las capas de fibras colágenas y a lo largo de ellas, aparecen muy destacadas, lo que confiere a los restos del ánulus un aspecto de hipercelularidad.

Normalmente el ánulus se encuentra más íntegro en uno de los ángulos (en la preparación), mientras que en el contrario aparece siempre sustituido por un tejido fibroso denso muy celular, con muchos vasos y sin estructura de ánulus, y que muchas veces presenta en su seno zonas de cartílago bien diferenciadas, generalmente dispuestas en forma de nódulos de condrocitos.

- En muy pocos casos hemos encontrado el disco completamente sustituido por un tejido fibrocartilaginoso muy denso y muy condricado, muy celular y con abundantes vasos, que destruye en parte las placas epifisarias sustituyéndolas, e incluso rompe el cartílago fisario penetrando en el hueso metafisario. En estos casos, el hueso metafisario adyacente se encuentra con trabéculas engrosadas y con los espacios intertrabeculares rellenos de un tejido muy celular que sugiere la presencia de médula ósea muy proliferativa, estando las trabéculas tapizadas por bandas de osteoblastos.
- En ningún caso se ha apreciado la formación de hueso nuevo ni dentro ni fuera del disco intervertebral.

4.3.1.2.2 Disco con D.B.M.

A este nivel las preparaciones microscópicas muestran, en principio, las mismas alteraciones que hemos descrito en el disco anterior y que en síntesis se pueden resumir de la manera siguiente:

- No afectación del hueso metafisario.
- Cartílago fisario de características y situación normal.
- Al igual que en el disco anterior, las epífisis permanecen en la mayor parte de los casos con trabeculación ósea normal y médula ósea poco activa, pero también hemos observado algunos casos en que la epífisis aparece más reactiva, con trabéculas óseas más engrosadas y médula ósea más activa en espacios intertrabeculares más pequeños.
- La capa de cartílago hialino sufre las mismas alteraciones que en el disco anterior.
- En cuanto al ánulus, las alteraciones que presenta son superponibles a las del disco precedente, y al igual que en el caso anterior permanece más íntegro en uno de sus bordes, el correspondiente al lado contrario de la zona de acceso al disco. La mitad del disco correspondiente a la zona de abordaje se encuentra ocupado normalmente por un tejido fibrocartilaginoso muy celular, muy denso y vascularizado, con zonas de condricación y nódulos de células cartilaginosas bien diferenciadas, que ocupa todo este espacio de forma uniforme.
- En el 60% de los casos aparece en la zona de acceso quirúrgico al disco,

y siempre fuera del mismo, algún fragmento de D.B.M. de la que se utilizó como implante, la cual presenta una serie de alteraciones consistentes en:

- Siempre aparece envuelta en un tejido fibroso más o menos denso, que varía según la zona y que acostumbra a ser más denso cuanto más cerca del disco se encuentra y más laxo cuanto más hacia la periferia. Este tejido fibroso presenta áreas de condricificación que en ocasiones están en contacto íntimo con el bloque de D.B.M. y en ocasiones penetran dentro del mismo.
- La D.B.M. aparece penetrada por vasos de nueva aparición y colonizada por células cartilaginosas distribuidas anárquicamente por toda su extensión, ya sea de manera aislada o en grupos.
- Presenta zonas que sugieren una reabsorción de la misma y sustitución por tejido conjuntivo que en parte se está condricificando.
- En la mayoría de las muestras, la D.B.M. está revitalizada en parte, en algunos casos hasta en un 50% de la superficie visible en la preparación, apareciendo zonas de hueso nuevo con células vivas y reosificación de la matriz. En algunos casos incluso se aprecia la presencia de zonas con médula ósea activa.
- Hay zonas donde el hueso nuevo está totalmente rodeado por cartílago bien diferenciado, sugiriendo un proceso de osificación endocondral.
- Normalmente las áreas de hueso nuevo las encontramos en los

bordes periféricos del bloque de D.B.M.

- Existe algún caso en que un fragmento de D.B.M. permanece absolutamente aislado por una envoltura de tejido conectivo denso, sin que haya sufrido ninguna de las transformaciones hasta ahora señaladas, quedando a modo de secuestro.

En dos casos, a nivel de este disco, han aparecido microabscesos que han destruido la parte de disco afectada, incluyendo los platillos epifisarios y los cartílagos fisarios, llegando a infiltrar hueso metafisario. En ambos casos se encuentran secuestros óseos en su interior que parecen pertenecer a las epífisis desaparecidas.

En un caso, el tejido fibroso que rellena el disco intervertebral infiltró el hueso epifisario, reabsorviéndolo y penetrando a través del cartílago fisario en el hueso metafisario.

Al igual que en el disco anterior, en ningún caso se ha observado osificación en el interior del disco intervertebral.

4.3.1.2.3 Disco con periostio

En este tercer disco, las alteraciones encontradas también son básicamente las mismas que en el primero de los discos, con las mismas variaciones en la afectación de los diferentes elementos.

Como particularidad diremos que en ningún caso hemos observado osificación

ni intradiscal ni extradiscal inducida por el periostio, es más, no hemos observado ninguna estructura que nos hiciera reconocer el periostio introducido en el disco.

Al igual que en el disco anterior, en éste hemos observado la presencia de un microabsceso con un secuestro óseo en su interior, perteneciente a un mismo ejemplar que ya presentaba un microabsceso en el disco con D.B.M.

También en este disco hemos visto algunos casos en que ha habido reabsorción del hueso epifisario, y sustitución por el tejido fibrocartilaginoso que ocupa el disco, con rotura de la placa fisaria e invasión del hueso metafisario por el tejido conectivo.

4.3.2 RESULTADOS DE LA SEGUNDA SERIE

4.3.2.1 Disco con D.B.M.

A este nivel hemos encontrado dos tipos de respuesta en el espacio intervertebral:

a- Osificación del espacio

En este tipo de respuesta nos encontramos con un espacio totalmente osificado, con paso de trabéculas óseas de hueso esponjoso maduro de una metafisis a otra.

El hueso metafisario es normal, estando habitualmente algo engrosado a nivel de la osificación intervertebral, con espacios intertrabeculares más o menos amplios y con médula ósea normal, aunque en algún caso se aprecia algo más celular.

En casi todas las preparaciones se aprecian pequeños restos de cartílago fisario en alguno de los bordes de la preparación.

Algunas preparaciones muestran restos de cartílago hialino que señalan la zona donde estuvo el espacio intervertebral.

b- No osificación del espacio

En estos casos aparece el espacio relleno de un tejido fibrocartilaginoso muy denso y celular, con vasos sanguíneos (tejido de cicatrización), con focos evidentes de cartílago hialino que acostumbran a estar en el centro del espacio, siendo más fibroso y



menos cartilaginosa a medida que nos acercamos a los bordes del disco.

Este tejido forma una unión muy íntima entre ambas metafisis e incluso las invade en algunos casos.

El grosor de la banda fibrocartilaginosa varía de una preparación a otra, yendo desde una amplitud de 1mm hasta una banda cartilaginosa testimonial de algunas micras de espesor que separa ambas metafisis.

Al igual que en el disco anterior existen restos de cartílago fisario en algunas preparaciones.

El hueso metafisario puede estar más o menos engrosado, con espacios intertrabeculares con médula ósea poco celular, pero que en algunos casos se observa más celular.

En un 16% de los casos, hemos observado la presencia de restos de la D.B.M. que se implantó, y que en todos estos casos se encuentra en el centro del espacio intervertebral. Esta D.B.M. se halla invadida periféricamente por tejido fibroso, con algunas zonas de cartílago nuevo, y colonizada en su interior por algunas células cartilaginosas aisladas.

El fragmento de D.B.M. no da la sensación de estar secuestrado, sino más bien unido íntimamente en algunas zonas al hueso metafisario a través de zonas de cartílago y de tejido fibroso muy celular.

En este espacio discal hemos encontrado abscesos microscópicos en un 10% de los casos.

4.3.2.2 Disco control

A este nivel, sería de aplicación la misma descripción que hemos efectuado para el nivel anterior, excepto en la presencia de D.B.M. que lógicamente en este espacio no existe, tanto para los espacios osificados como para los que no lo están.

En cuanto a la presencia de microabscesos, los hemos observado en un 6,6% de las casos.

4.3.2.3 Resultados de la serie

Globalmente podríamos expresar los resultados en esta serie de la forma siguiente:

- A nivel del disco con D.B.M. se han obtenido 15 osificaciones del mismo, lo que representa un 50% de los casos.
- A nivel del disco control se han obtenido 16 osificaciones, lo que alcanza un 53,3% de los casos.
- En 10 ocasiones 33,3% no se ha obtenido la osificación en ningún espacio.
- En 13 ocasiones se ha obtenido la osificación de los dos espacios a la vez, lo que supone el 43,3% de los casos.
- En 4 ocasiones se ha obtenido la osificación del espacio control, y no

la del disco con D.B.M., constituyendo el 13,3%.

- En 3 ocasiones se ha obtenido la osificación del espacio con D.B.M. y no del espacio control, es decir en el 10% de los casos.

4.3.3 RESULTADOS DE LA TERCERA SERIE

4.3.3.1 Disco con D.B.M.

En la mayoría de los casos nos encontramos con las siguientes alteraciones microscópicas:

El hueso metafisario está conservado con trabeculación normal y los espacios intertrabeculares rellenos de médula ósea muy adiposa y poco celular.

El cartílago fisario se encuentra en situación y con estructura normal, con aspecto de banda ondulada entre metáfisis y epífisis.

La epífisis ósea acostumbra a estar bastante afectada, en todos los casos existe un aumento de grosor de las trabéculas óseas, con disminución de los espacios intertrabeculares que en ocasiones casi han desaparecido (en zonas). Estos espacios están rellenos de una médula ósea muy activa (muy celular).

En muchas ocasiones existen zonas del hueso epifisario que han sido sustituidas por tejido fibrocartilaginoso, e incluso en algún caso por tejido cartilaginoso hialino bien diferenciado, pero siempre de forma parcial y pocas veces coincidiendo en las dos epífisis del mismo disco.

Normalmente la capa de cartílago hialino que cubre las epífisis no se aprecia en estas preparaciones al haber sido sustituida por el tejido que invade el espacio intervertebral.

El disco intervertebral acostumbra a estar sustituido en casi su totalidad por un tejido fibrocartilaginoso muy denso y celular, con vasos y con zonas de cartílago hialino en su interior.

Este tejido conjuntivo que ha rellenado el disco siempre se prolonga hacia el exterior por uno de los bordes del mismo (zona de abordaje quirúrgico). Es en esta zona donde aproximadamente en un 20% de los casos, y siempre fuera del disco, hemos encontrado un fragmento de D.B.M. que ha sufrido las mismas alteraciones que el de la primera experiencia, es decir:

- se encuentra envuelta siempre en tejido fibroso de características semejantes al de la primera serie y que de igual forma presenta áreas de condricificación que parecen invadir la D.B.M.
- se halla penetrada por vasos sanguíneos neoformados
- existe colonización por células cartilaginosas, ya sea de manera aislada o en grupos
- se hallan zonas de reabsorción de la D.B.M. y sustitución por tejido fibrocartilaginoso en ocasiones condricificado
- aparece revitalización en parte de la D.B.M. con zonas de hueso nuevo y en algunos casos con médula ósea activa.

En cinco casos hemos observado un microabsceso que destruía en parte o en su totalidad el disco intervertebral, incluyendo epífisis y fisis, llegando hasta hueso metafisario, con secuestros óseos en su interior que parecen pertenecer a la fisis.

En dos casos la zona operatoria sufrió una ulceración que puso en contacto el hueso con el exterior. En estos casos se aprecia una epitelización de la zona expuesta.

En el lado contrario a la zona de acceso quirúrgico del disco, aparecen en la mayoría de los casos restos del anulus primitivo, pero generalmente desestructurado en cuanto a su distribución en capas concéntricas.

En ningún caso se ha observado osificación del espacio intervertebral, ni ningún puente óseo que uniera una vértebra con otra.

En algunos casos, el tejido fibrocartilaginoso que ocupa el disco intervertebral sustituye al hueso epifisario, generalmente en la zona central del platillo y habitualmente de forma unilateral rompe la línea de cartílago fisario penetrando a modo de hongo en el tejido óseo metafisario, invadiendo en parte y rellenando los espacios intertrabeculares vacíos.

4.3.3.2 Disco control

En este espacio las alteraciones que encontramos son absolutamente superponibles a las del disco anterior, tanto a lo que se refiere al estado de la metafisis, fisis y epífisis, como a las alteraciones mas características sufridas por estas estructuras.

El disco a su vez, presenta igualmente las mismas características que el disco anterior, tanto en el tipo de tejido que lo ocupa como en su distribución dentro de él, y con las mismas alteraciones a nivel de las epífisis.

Igualmente se han observado eclosiones de este tejido fibrocartilaginoso en el hueso metafisario a través del cartílago fisario.

De la misma forma que en el disco anterior, en éste también hemos encontrado cinco microabscesos, de los cuales sólo en un caso coincide con un absceso en el disco anterior. Las características son las mismas que en los abscesos del disco precedente.

Los dos casos con ulceración en la zona intervenida también encuentran su repercusión a nivel anatomopatológico en este disco.

Al igual que en el disco anterior, en ningún caso se ha observado osificación del espacio intervertebral, ni total ni parcialmente.

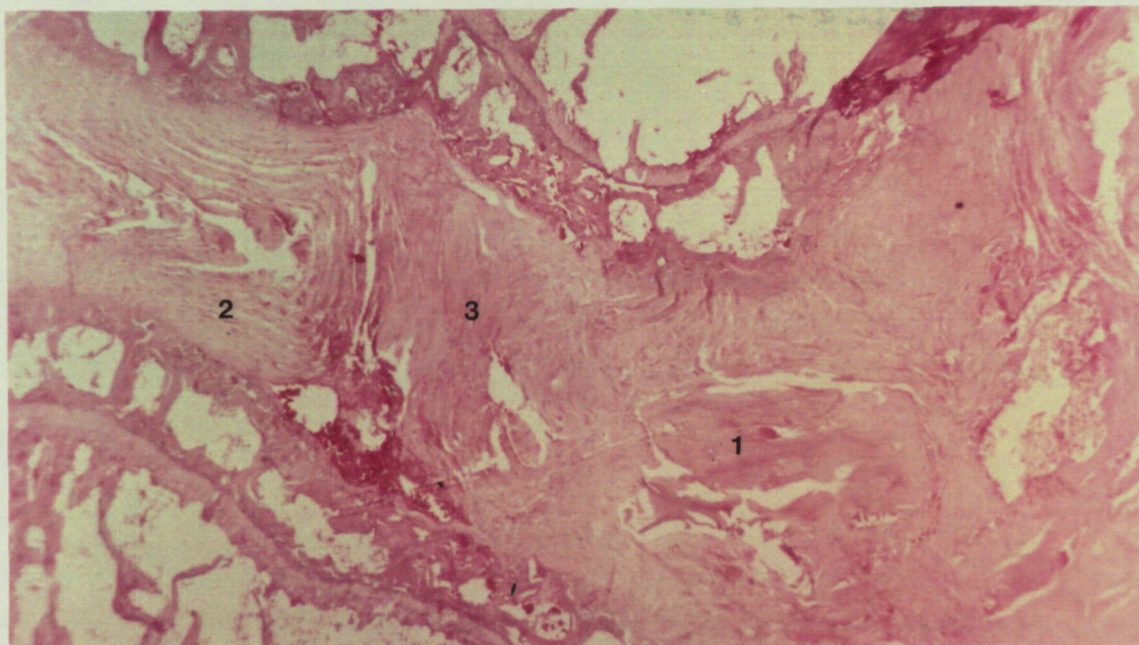


Foto 41- Disco con D.B.M. en la 1ª Serie
1. D.B.M. 2. Restos del ánulus 3. Tejido fibroso (H-E 4x)

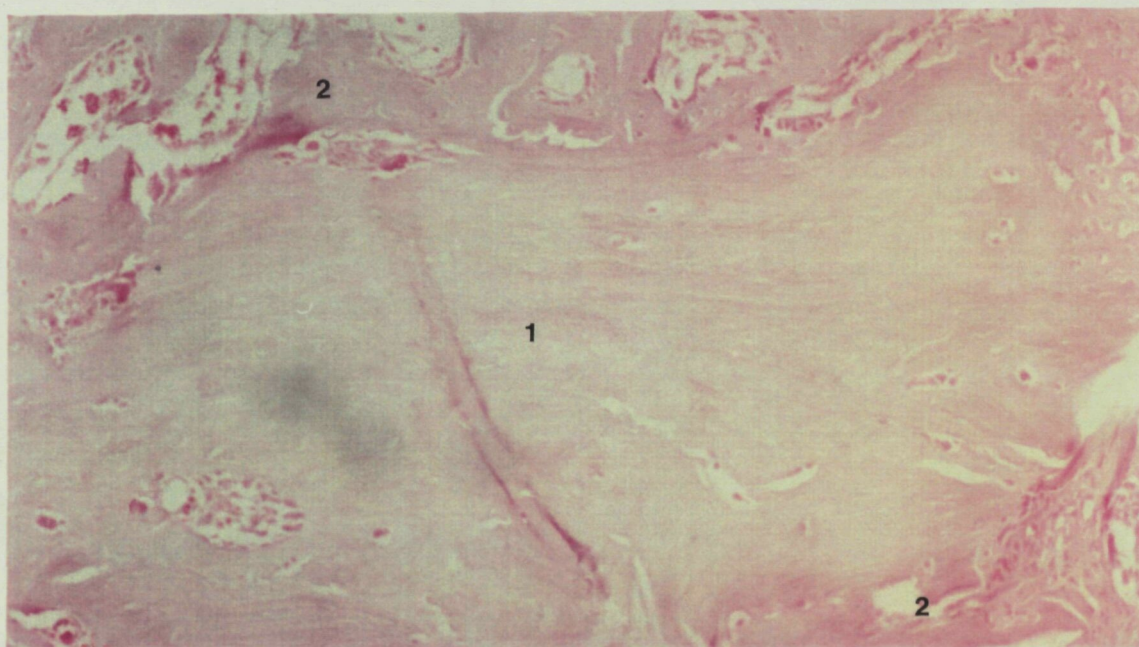


Foto 42- Fragmento de D.B.M. implantado en disco (1ª Serie)
1. D.B.M. 2. Hueso nuevo (H-E 10x)

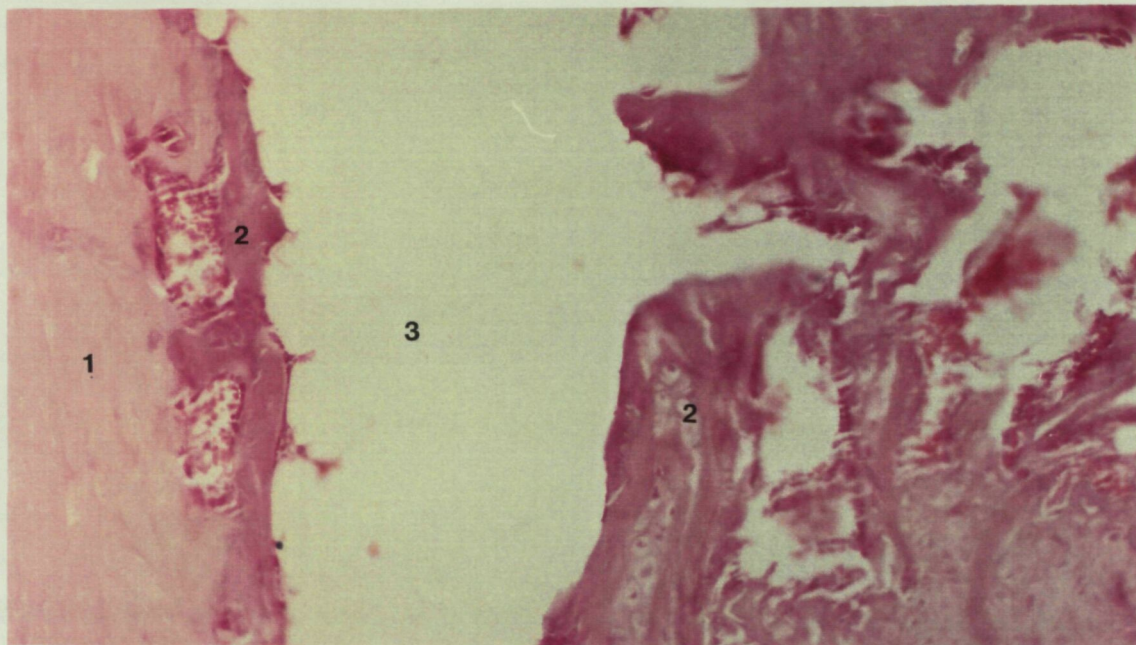


Foto 43- Detalle de fragmento de D.B.M. implantado en disco
1. D.B.M. 2. Hueso nuevo 3. Espacio con médula ósea (H-E 10x)

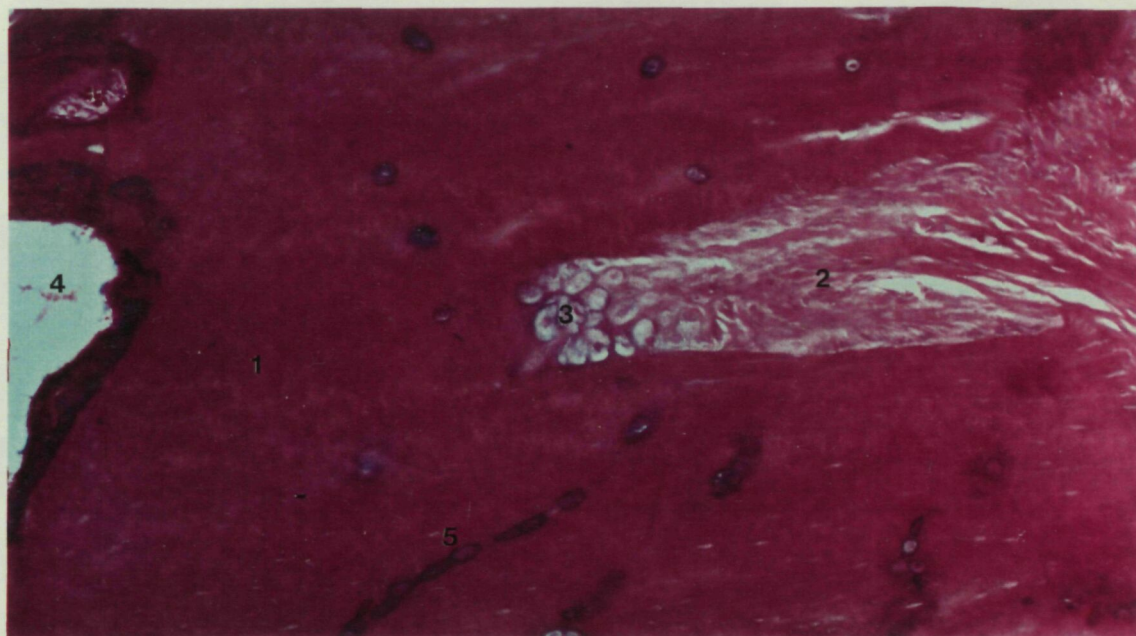


Foto 44- Detalle de fragmento de D.B.M. implantado en disco
1. D.B.M. 2. Tejido fibroso que penetra en la D.B.M.
3. Metaplasia del tejido fibroso a cartílago
4. Espacio con médula ósea
5. Células cartilaginosas que colonizan la D.B.M. (H-E 10x)

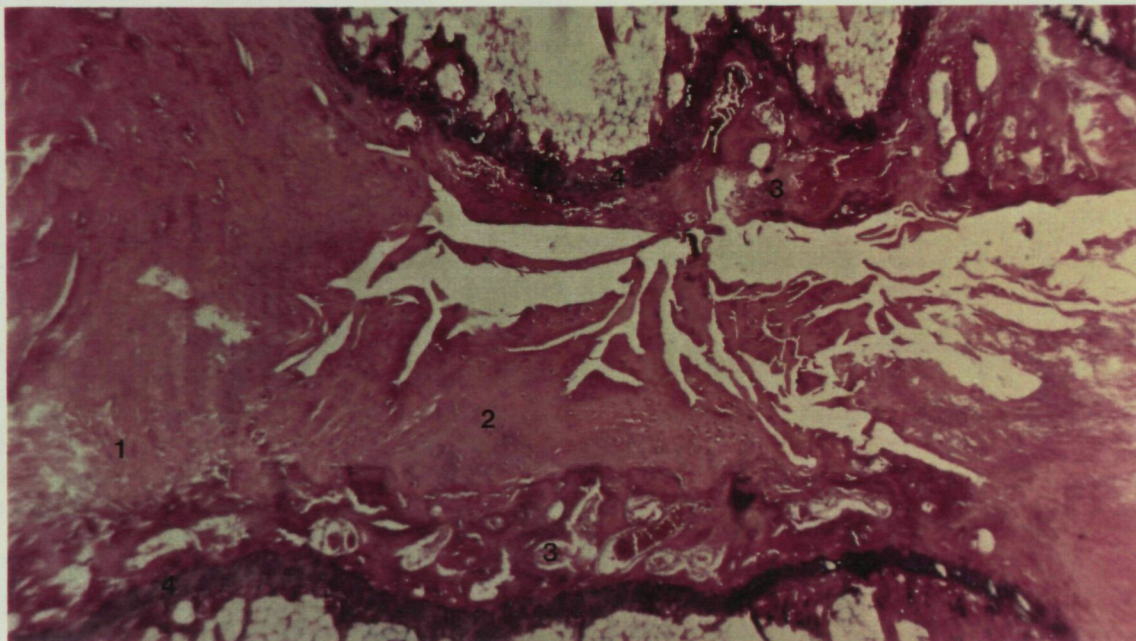


Foto 45- 3ª Serie - Disco típico

1. Restos del ánulus
2. Tejido fibrocartilaginoso que invade el disco
3. Epífisis con trabéculas engrosadas y médula ósea celular
4. Fisis conservadas (H-E-Azul alcian 2,5x)

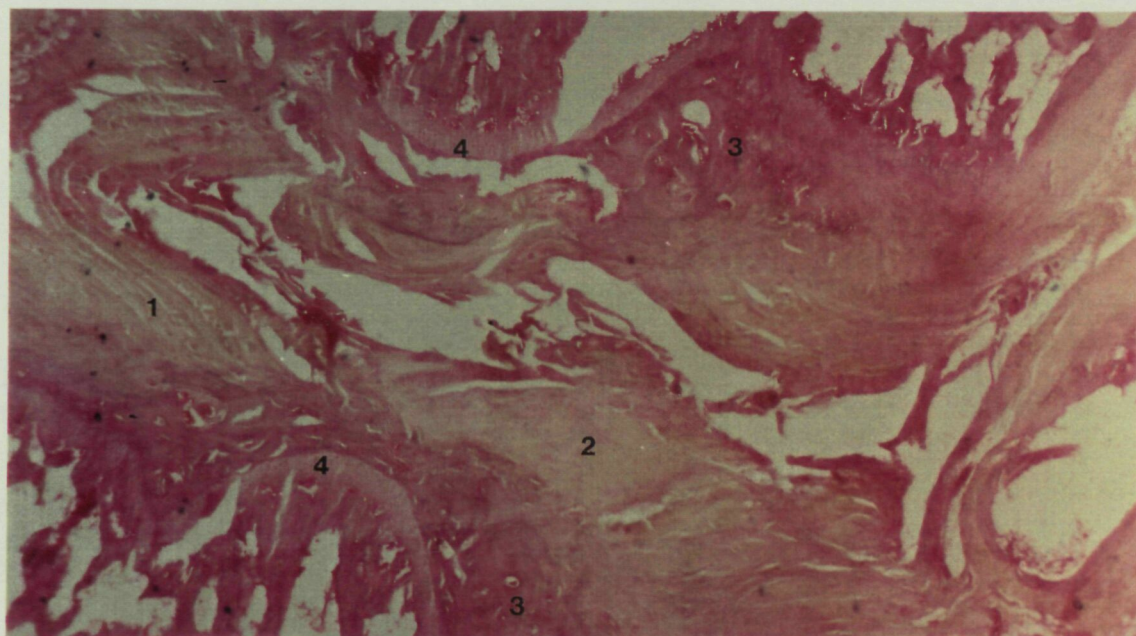


Foto 46- 3ª Serie - Disco típico

1. Restos del ánulus
2. Tejido fibroso denso que invade el disco
3. Epífisis con trabéculas engrosadas y médula ósea celular
4. Fisis conservada (H-E 2,5x)

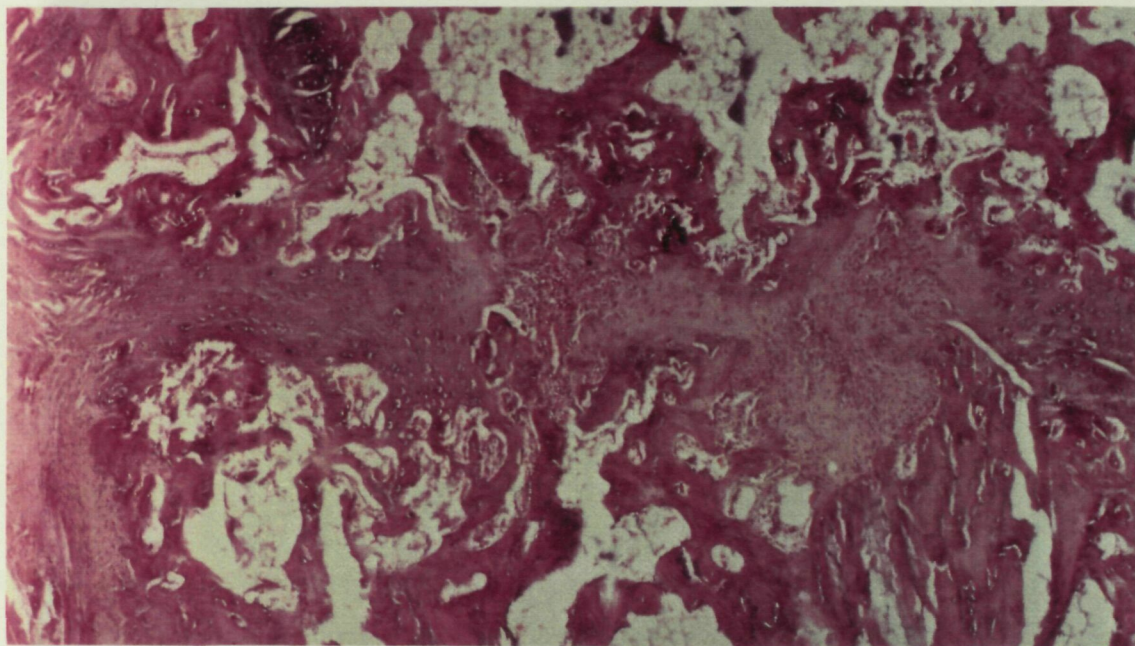


Foto 47- Disco de la 2ª Serie
Capa fibrosa interpuesta entre las dos metáfisis óseas (H-E 4x)

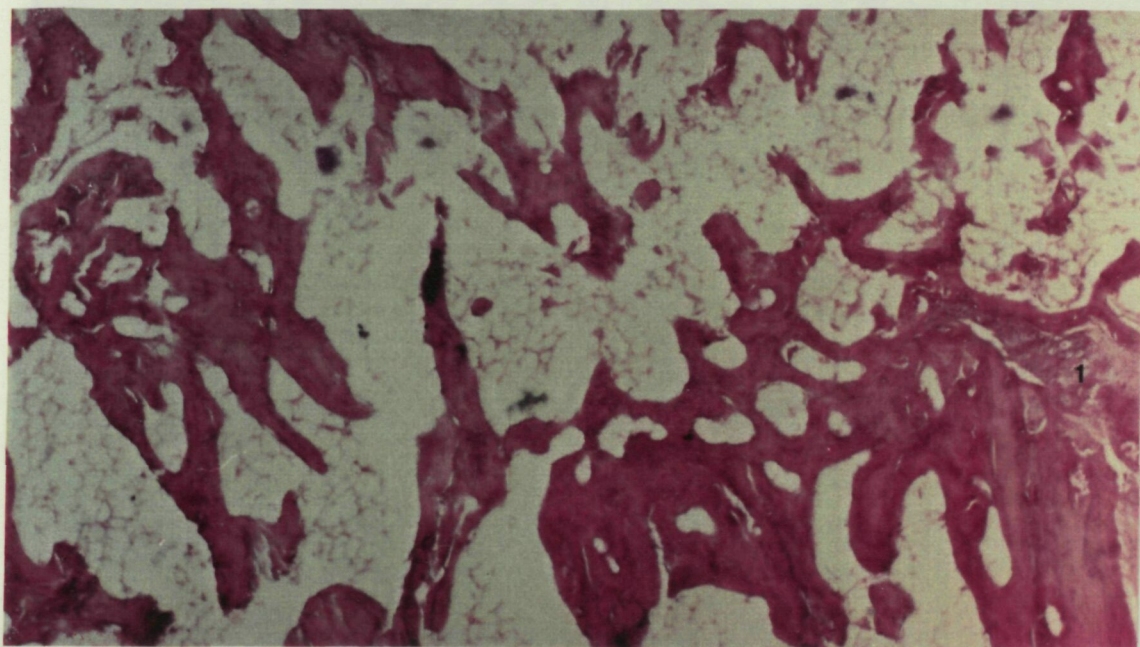


Foto 48- Disco de la 2ª Serie
Osificación total del disco con paso de trabéculas óseas maduras
1. Restos de fisis (H-E 4x)

RESPUESTA DEL DISCO
INTERVERTEBRAL DE LA RATA A LA
INTRODUCCION EN SU INTERIOR DE
SUBSTRATOS ORGANICOS INDUCTORES
DE LA OSIFICACION

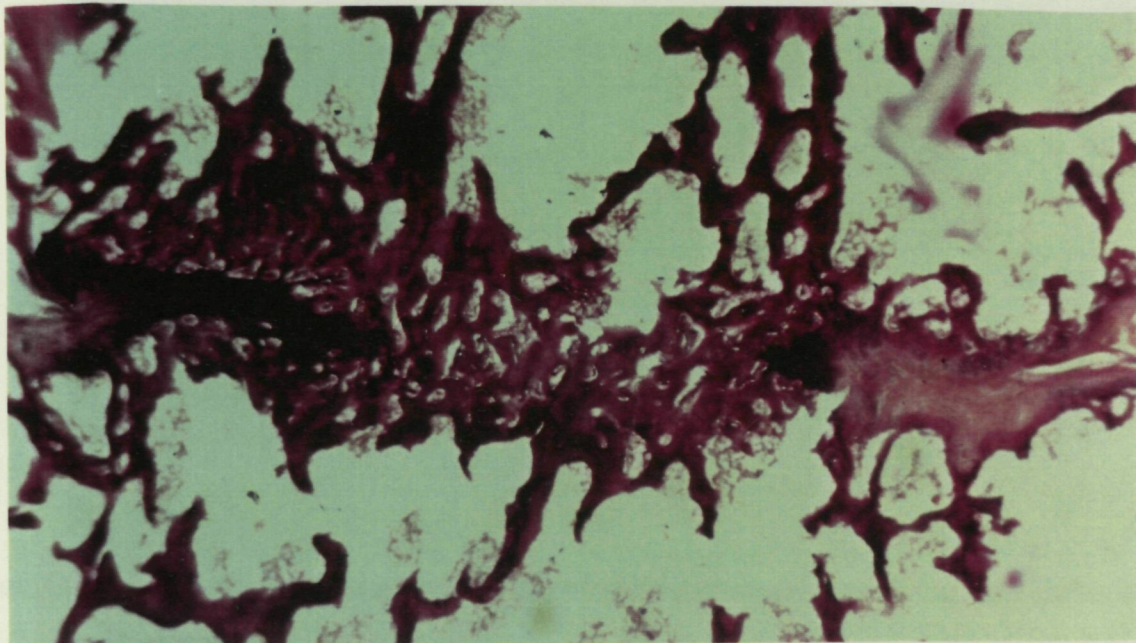


Foto 49- Disco de la 2ª Serie
Disco osificado parcialmente (zona central) (H-E 2,5x)

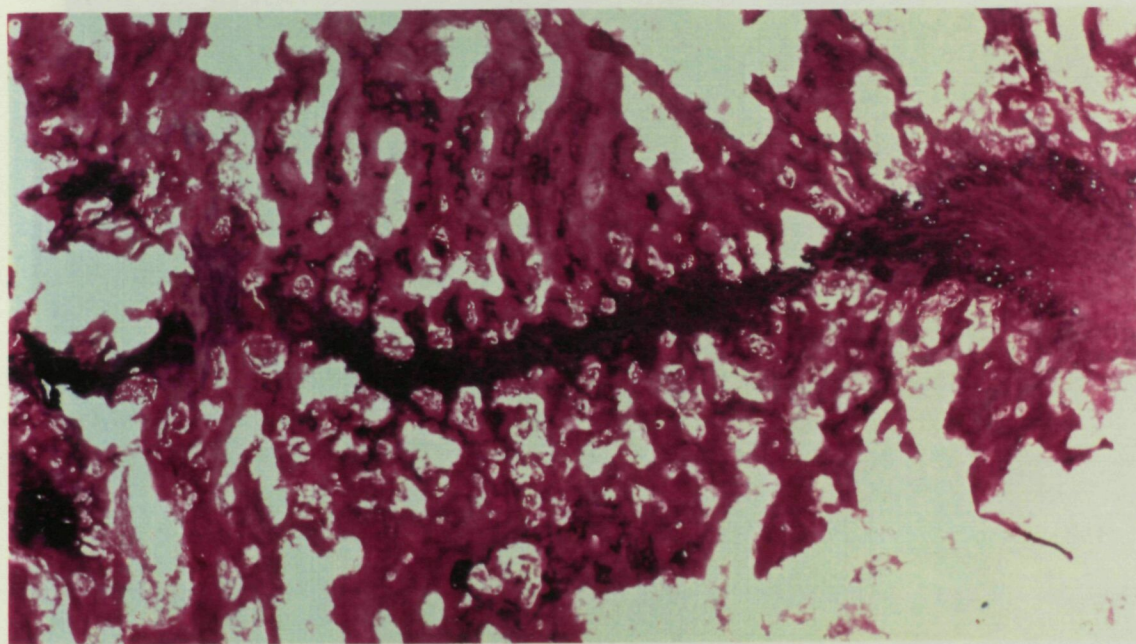


Foto 50- Disco de la 2ª Serie
Disco osificado parcialmente (zona central) (H-E 4x)



Foto 51- Cola de la 2ª Serie (macerada)
Artrodesis ósea conseguida (lupa 6 aumentos)



Foto 52- Cola de la 2ª Serie (macerada)
Artrodesis conseguida en los dos niveles (lupa 3 aumentos)

5. DISCUSION

En toda la bibliografía consultada, ya sea a través de las aplicaciones de la D.B.M., de la B.M.P. o del periostio, y de los trabajos sobre artrodesis experimental, no hemos encontrado ninguno que utilice el disco intervertebral de la cola de la rata y mucho menos en el que se introduzcan substratos osteoinductores en el disco intervertebral de este animal.

Esto hace que la discusión no pueda establecerse en parámetros comparativos con experiencias similares, sino que tendremos que llevarla a cabo a partir de otras experiencias con los mismos elementos osteoinductores realizadas en otros animales o en otros lugares de la anatomía.

Esta discusión la llevaremos a cabo de acuerdo al siguiente orden:

- Discusión de peso, mortalidad y morbilidad
- Discusión de los aspectos clínicos macroscópicos
- Discusión de los resultados radiológicos
- Discusión de las observaciones anatomopatológicas

5.1 PESO, MORTALIDAD Y MORBILIDAD

5.1.1 Peso de los animales de las series

En este apartado cabe consignar la existencia de unas diferencias importantes entre el peso medio de los animales de la primera y segunda series con los animales de la tercera serie al inicio de las experiencias. Mientras que en las dos primeras series los animales se encontrarían entre los dos y tres meses de edad,

según la gráfica edad-peso utilizada como referencia (95), en la tercera serie estarían entre los tres y cuatro meses de edad.

Esto puede tener su importancia en cuanto a la aparición de problemas intercurrentes en los animales durante los dos meses que duró la experiencia, ya que al final de la misma la edad de los animales de la tercera serie estaría entre cinco y seis meses y muy cerca del límite máximo de peso corporal medio para esta especie (Sprague-Dawley) que Neufeld y col.(1990) (112) establecen en su trabajo entre 500 y 600gr, y que se alcanzaría sobre los diez meses de edad. No obstante hay que tener en cuenta que según la curva edad-peso utilizada, a los cuatro meses las ratas ya han alcanzado un peso medio entre 450 y 500gm y que a los ocho meses ya se considera a los animales no aptos para la reproducción (Jergensen y col. 1991) (75).

5.1.2 Mortalidad

Existe una clara diferencia entre la mortalidad de las dos primeras series y la mortalidad en la tercera serie, de forma que si tenemos en cuenta que la cirugía a la que fueron sometidos los animales fue superponible, excepto en la primera serie en que fue más agresiva en conjunto (extracción de periostio autólogo, tres niveles discales, implantes en pared abdominal), que la anestesia fue idéntica en todos los casos, y que la única diferencia apreciable está en el peso de los animales (mayor edad), se puede presuponer que la mayor mortalidad en la tercera serie podría estar relacionada con la mayor edad de los animales.

	PESO MEDIO	MORTALIDAD
primera serie	290,37 ± 40,48	0
segunda serie	204,8 ± 44,0	2 (6,2%)
tercera serie	411,3 ± 88,6	6 (18,7%)
		p < 0,05

Existe una diferencia significativa en la frecuencia de mortalidad entre las diferentes series ($p < 0,05$).

5.1.3 Morbilidad

La aparición de microabscesos seguramente tiene mucho que ver con la práctica de una cirugía sin condiciones meticulosas de asepsia, aunque sabemos que estos animales se defienden bien de las infecciones cuando su alimentación es correcta y no han entrado en la senectud (Altman y col 1979) (4).

En este apartado consignamos también un predominio de abscesos en la tercera serie con respecto a las otras dos, a pesar de que las condiciones de asepsia fueron las mismas para las tres series.

En cambio no se ha apreciado una diferencia importante, dentro de las mismas series, entre un nivel intervenido y otro.

En cuanto a la aparición de alteraciones cutáneas (fístulas y úlceras), éstas tienen una relación directa con la presencia de infecciones, por lo tanto existe un predominio claro de la tercera serie en relación a las dos anteriores.

También en esta tercera serie se presentaron dos amputaciones distales de la cola, cosa que no ocurrió en las series anteriores.

Quizás también sería posible establecer una relación directa entre el grado de agresividad, a nivel de la cola, y la aparición de infecciones profundas y problemas cutáneos, pero si observamos su presencia en conjunto, vemos que éstas no se distribuyen según la agresividad del método,

serie 1... solo apertura del disco	3 alteraciones
serie 2... extirpación del disco y platillos vertebrales	7 alteraciones
serie 3... legrado del platillo	19 alteraciones

sino que parecen obedecer a otras causas, la más aparente de las cuales continúa siendo la edad del animal.

	PESO MEDIO	ALTERACIONES
primera serie	290,37 ± 40,48	3
segunda serie	204,8 ± 44,0	7
tercera serie	411,3 ± 88,6	19
		p < 0,01

Existe una diferencia significativa en la aparición de alteraciones entre las diferentes series (p < 0,01).

5.2 ASPECTOS CLINICO MACROSCOPICOS

En todas las series observamos que todos los animales presentan un engrosamiento fusiforme residual de la zona intervenida, cosa por otra parte lógica como respuesta a la agresión quirúrgica.

La angulación residual que se presentó en dos casos de la segunda serie puede justificarse perfectamente por el grado de agresividad quirúrgica a que se sometió a los animales de esta serie.

En cuanto a la movilidad final de los segmentos intervenidos nos encontramos con que es éste un parámetro difícil de evaluar por la subjetividad de cualquier método que pueda usarse para tal fin; es por ello que se optó por el más sencillo, que es la valoración manual de la misma. Se apreció que la afectación de la movilidad inicial está en función del grado de agresividad de la cirugía practicada.

De forma clara se apreció una abolición de la movilidad (artrodesis clínica) en todos los elementos de la segunda serie, apareciendo los dos espacios intervenidos como un bloque rígido.

En las otras dos series los resultados fueron menos homogéneos, pero observándose de una forma global una movilidad que podríamos considerar normal en los discos en los que solamente se realizó la apertura de los mismos (primera serie), mientras que en la tercera serie, en la que se realizó un legrado de los platillos vertebrales, se apreció una disminución global de la movilidad sin llegar a la fijación completa de los segmentos intervenidos. Esto, como

veremos más adelante, tiene su traducción en la anatomía patológica.

McAfee y col. (1992) (97), usando perros, a los que provocaban una desestabilización de un segmento lumbar (extirpación del ligamento longitudinal anterior, disco intervertebral, láminas, espinosas y articulares), en el grupo control en el que no utilizó ningún tipo de injerto también consiguió una rigidez importante del segmento vertebral, aunque menor que en la que interponía hueso esponjoso.

Schreiber Y Leu (1989) (142), en una serie de intentos de estabilización intersomática en pacientes con inestabilidad vertebral sintomática, consiguen una estabilización del segmento, sin llegar a la fusión ósea, mediante una discectomía percutánea y eliminación del cartílago que cubre al platillo vertebral sin lesionar el hueso cortical y la introducción en el interior del espacio creado en el disco de injerto esponjoso autólogo de cresta ilíaca.

Parece ser, pues, que el hecho de realizar una agresión quirúrgica importante en un espacio intervertebral es suficiente para crear una cierta rigidez de este espacio.

5.3 DISCUSION DE LOS RESULTADOS RADIOGRAFICOS

5.3.1 Sobre el implante metálico

Al observar el resultado radiológico de las tres series, nos llama la atención en primer lugar el hecho de que en la primera serie el metal introducido en el disco proximal se hallara fuera del disco en un 77,5% de los casos. Esto nos lleva a pensar que el disco, una vez abierto, es insuficiente para mantener el metal introducido en su interior, teniendo éste tendencia a salir de su alojamiento por un proceso puramente mecánico.

Otros autores, trabajando con animales de mayor tamaño, realizan plastias con el ligamento vertebral común anterior para evitar estas expulsiones del material implantado. Ragni y Lindholm (1991) (125), Ylinen y col. (1991) (180).

En nuestro caso, debido al pequeño tamaño de los animales, este gesto quirúrgico es poco factible.

5.3.2 Pérdida de paralelismo entre las vértebras

Observamos que ésta ha sido mínima. Solamente en la primera serie esta circunstancia se ha presentado de forma apreciable, mientras que en la segunda serie ha estado ausente y en la tercera solamente se ha presentado en una ocasión.

La explicación de la presencia de esta alteración en la primera serie la encontraríamos en que en los primeros casos que se intervinieron el abordaje al disco se hacía de forma amplia y generosa, con lo que se crearon inestabilidades importantes. A medida que la experiencia fue avanzando, la incisión del disco se fue reduciendo en amplitud. De hecho, estas inestabilidades coinciden con los primeros casos intervenidos.

5.3.3 Erosión de los platillos vertebrales

Esta pérdida de regularidad de los platillos vertebrales, que interpretamos como una reabsorción ósea a nivel de los mismos, con sustitución por tejidos blandos, la hemos encontrado con más frecuencia en la tercera serie, cosa por otra parte lógica ya que es en esta serie donde se provocaba la erosión mecánica (legrado) de los platillos vertebrales.

Llama la atención la presencia mínima (un caso) de erosión en la segunda serie, en la cual la agresividad quirúrgica fue muy importante. Es posible que esta misma agresividad (extirpación de las epífisis), dejando hueso esponjoso al descubierto, sea la causa de la falta de reabsorción.

5.3.4 Ensanchamiento de los platillos vertebrales

Interpretamos el ensanchamiento de los extremos óseos de las vértebras a nivel de los espacios intervenidos como una reacción a la agresión quirúrgica realizada, y así se confirma con las observaciones, en las que se ve que en la

segunda serie el 100% de los espacios intervenidos presentan esta alteración, mientras que no se ha podido demostrar su relación con el substrato inductor introducido en el disco en ninguna de las tres series.

5.3.5 Pérdida de altura del espacio intervenido

También en este caso parece que la presencia de esta alteración residual viene marcada por el tipo de cirugía practicada (agresividad), ya que en la segunda serie se ha presentado en el 100% de los espacios intervenidos.

En las otras dos series, en que se ha presentado esta alteración de una forma menos uniforme, no se ha demostrado ninguna relación entre la presencia de la pérdida de altura y el nivel intervenido (substrato inductor).

En la clínica humana, actualmente, Leu y col. (1993) (87) en su publicación sobre artrodesis intersomática por vía percutánea, para mantener la altura del espacio intervertebral colocan un fijador externo, previamente a la cirugía, y lo mantienen durante 12 semanas.

5.3.6 Aparición de calcificaciones extradiscales

En este caso, intentamos relacionar la presencia de este tipo de calcificación con la presencia de la D.B.M. en el exterior del espacio discal, ya que es de suponer que ha sucedido lo mismo que con el metal, es decir, que ha sido expulsada fuera del disco por incontinencia del mismo.

En la primera y tercera series, se confirma que existe una clara diferencia significativa entre el disco en que se interpuso la D.B.M. y el disco con metal o periostio en la primera serie y el disco control en la tercera serie, confirmando la impresión inicial. Este aspecto también se confirma con la observación anatomopatológica, en que se aprecia la D.B.M. siempre en el exterior del disco, tanto en la primera como en la tercera serie.

En cambio en la segunda serie aparecen muy pocas calcificaciones extradiscales, y las que aparecen lo hacen en igual número en el disco con D.B.M. que en el disco control. Esto también concordaría con lo observado en la anatomía patológica, en la que la D.B.M. se encuentra siempre en el interior del espacio intervertebral, y en ningún caso en los que se ha observado la D.B.M. ésta estaba fuera del disco.

Parece claro, pues, que la D.B.M. sí está directamente relacionada en la aparición de las calcificaciones extradiscales aparecidas en la primera y tercera series.

En implantaciones extraóseas de D.B.M., publicadas en múltiples trabajos, ésta induce la formación de un osículo que es visible radiológicamente (163,164,166,170) cuyo volumen está en dependencia directa con el tamaño del fragmento de D.B.M. implantado. (163).

5.3.7 Relación entre calcificaciones y peso de los animales

En las series primera y tercera no se demuestra ninguna relación significativa entre el peso de los animales y la aparición de calcificaciones, lo que refuerza

la hipótesis de que la aparición de éstas depende, casi exclusivamente, de la presencia o no de D.B.M. en el nivel observado.

En la segunda serie, el número de calcificaciones extradiscales es mínimo.

5.3.8 Relación entre calcificaciones y ensanchamiento de los platillos vertebrales

Parece lógico pensar que la reacción ósea que produce el ensanchamiento de los extremos óseos de las vértebras pudiera ser responsable también de la aparición de calcificaciones.

Este aspecto no se confirma al no existir una diferencia significativa entre las dos series estudiadas (primera y tercera).

5.3.9 Relación entre calcificaciones y erosiones en los platillos vertebrales

En esta relación solamente hemos encontrado una diferencia significativa en el disco más proximal de la primera serie, donde se introdujo el metal, en el cual sí parece ser más frecuente la aparición de calcificaciones en presencia de erosión en los platillos. Posiblemente esto es debido al bajo número de calcificaciones encontradas en este disco, y el mayor número de erosiones con respecto a los otros dos discos de la serie.

En el resto de discos de la primera serie y en los de la tercera serie, no se encuentra ninguna diferencia significativa, lo que también parece apoyar la hipótesis de la relación directa entre la aparición de calcificaciones y la presencia de D.B.M. en el disco observado.

5.3.10 Osificación del espacio discal

Solamente han aparecido osificaciones del espacio discal en la segunda serie (un sólo caso en la tercera serie que creemos no es demostrativo), precisamente en el que las calcificaciones extradiscales han sido mínimas. Esto podría interpretarse como que la D.B.M. en esta serie sí se mantuvo en el interior del espacio discal y dio origen a un mayor número de osificaciones en este espacio.

Esta teoría podría ser apoyada por las observaciones anatomopatológicas, en las que no se aprecian restos de D.B.M. en los espacios osificados, y cuando se observan restos de ésta, se encuentran dentro del espacio intervertebral no osificado.

Pero todo esto queda rebatido con la simple observación de los resultados radiográficos, en que la diferencia en el número de osificaciones entre el espacio con D.B.M. y el espacio control es mínima, no existiendo relación entre el espacio intervenido (presencia o no de D.B.M.) y la observación de osificación del espacio.

Leu y col.(1993) (87), consiguen artrodesis percutáneas intersomáticas mediante injertos de hueso esponjoso autólogo, siempre y cuando realicen un legrado del disco, eliminando la cortical ósea hasta dejar hueso esponjoso sangrante.

Previamente en otros trabajos realizados por los mismos autores (Schreiber y Leu en 1989) (142), en que no eliminaban la cortical ósea, solamente consiguieron la estabilización del segmento vertebral, sin llegar a la artrodesis.

Ragni y Lindholm (1991) (125), realizando intentos de artrodesis intersomática en conejos mediante la interposición de sustancias osteoinductoras, entre ellas la D.B.M. y previo labrado de una trinchera en el hueso cortical de los platillos vertebrales, encuentran una diferencia muy clara en la osificación entre los espacios con D.B.M. y los espacios control.

5.3.11 Relación entre osificación y peso de los animales

En este caso el peso de los animales no parece tener una relación significativa con la aparición o no de osificaciones, aunque en la tabla cruzada existe una tendencia clara a la observación de osificaciones en los espacios discales en los animales de menor peso al inicio de la experiencia, los mismos en los que se ha observado una mayor diferencia de peso entre antes y después de la cirugía y cuyo porcentaje de diferencia de peso (aumento de peso relativo) también ha sido mayor.

5.3.12 Comparación entre series

Al comparar la primera y tercera series, ya que en la segunda los resultados son tan diferentes que no precisan ningún tipo de comparación, escogemos el disco con D.B.M. para valorar la importancia de la técnica quirúrgica en la aparición

de los distintos parámetros radiológicos.

De todas estas comparaciones, observamos que la aparición de calcificaciones laterales no tiene relación significativa con la técnica quirúrgica, lo que apoya la hipótesis de que es la D.B.M. el factor más determinante en la aparición de las calcificaciones.

Tanto la presencia de erosiones como la de ensanchamientos a nivel de los extremos óseos de las vértebras adyacentes al disco vertebral, no parecen tener una relación significativa con el tipo de cirugía empleado.

En cambio, en la pérdida de altura de los discos intervenidos si que existe una diferencia muy significativa entre las dos series en relación a la técnica quirúrgica empleada. Paradójicamente, es en la primera serie donde la cirugía fue menos agresiva (en la cola) en la que encontramos un mayor número de pérdidas de altura del espacio intervertebral.

Quizás se podría explicar el proceso por la menor afectación microscópica que se produce en el disco intervenido en la primera serie con respecto a la tercera, lo que produce una menor proliferación de tejido cicatricial en el interior del disco y consiguientemente una mayor pérdida de altura.

5.4 DISCUSION DEL ESTUDIO

ANATOMOPATOLOGICO DE LAS SERIES

Observando los resultados obtenidos en la lectura de las preparaciones microscópicas, podemos agrupar la primera y tercera series en una sola discusión, puesto que los resultados son superponibles en cuanto a uniformidad de los mismos, mientras que en la segunda serie, en que la agresión quirúrgica fue mucho más importante (a nivel de la cola), estos resultados pierden la uniformidad, por lo que la discusión de esta serie la efectuaremos aparte.

También efectuaremos aparte, por ser una experiencia paralela pero no directamente relacionada con el problema, la discusión de los resultados de los implantes en músculo estriado.

5.4.1 Respuesta del disco intervertebral en la primera y tercera series

A nivel de los discos intervertebrales, la respuesta de los mismos a la agresión es mayor a nivel del ánulus, y va decreciendo a medida que nos vamos alejando del centro del disco.

Esta respuesta es básicamente una reacción de cicatrización, con tejido fibroso muy celular con vasos, que posteriormente evoluciona a cartílago en alguna de sus zonas.

Evidentemente la intensidad de la respuesta va en relación directa con la importancia de la agresión efectuada en el disco. Podemos realizar esta

afirmación puesto que no hemos encontrado una diferencia clara entre la reacción en los discos en los que se introdujo la D.B.M. con los discos control de su serie.

Así observamos que mientras en la primera serie, en la que la agresión quirúrgica (a nivel de la cola) puede considerarse mínima, la afectación más importante la encontramos casi exclusivamente en el ánulus y solamente en la mitad del mismo que corresponde a la zona de penetración en el disco. En esta zona encontramos un tejido de cicatrización, con más o menos áreas de cartílago, mientras que en la otra mitad del disco las alteraciones son mínimas, conservando en parte la estructuración primitiva en bandas concéntricas.

Ragni y Lindholm (1991) (125), implantando D.B.M. en disco intervertebral de conejo, observan a los dos meses que el espacio discal se encuentra ocupado principalmente por restos del disco, tejido fibroso y pequeños grupos de células cartilaginosas. Esta descripción es absolutamente superponible a la que nosotros hemos hecho de las observaciones anatomopatológicas de nuestros resultados.

Vemos que en la tercera serie, en la que la agresión es algo más importante, el ánulus primitivo acostumbra a encontrarse sustituido casi en su totalidad por un tejido de cicatrización, igualmente con zonas de cartílago en su interior, y solamente queda alguna estructura que recuerda al ánulus primitivo en el borde contrario a la zona de abordaje del disco.

La capa de cartílago que cubre el platillo epifisario aparece algo alterada en la primera serie y desaparece en la tercera, como corresponde a una cirugía en la que se ha erosionado esta capa para dejar al descubierto el hueso epifisario.

El hueso epifisario que es normal en la primera serie y en pocas ocasiones está afectado, sí lo está, por el contrario, en la mayoría de los casos de la tercera serie, en que se ha producido una estimulación del mismo engrosándose y disminuyendo los espacios intertrabeculares con aumento de la celularidad de la médula ósea, e incluso en muchos casos ha sido sustituido en parte por tejido cicatricial.

Las demás estructuras que delimitan el espacio intervertebral (cartílago fisario y hueso metafisario) están por lo general conservadas en las dos series.

5.4.2 Respuesta del espacio intervertebral en la segunda serie

En esta serie no podemos hablar de respuesta del disco, puesto que éste no existe al haber sido extirpado junto a la placa epifisaria y junto a parte del cartílago fisario.

Al igual que en las otras series, la respuesta del espacio con D.B.M. es superponible a la del espacio control, pero a diferencia de las otras series, en ésta las respuestas no son uniformes, sino que pueden dividirse en dos grupos bien delimitados:

- a- espacios intervertebrales en que se ha producido la fusión ósea entre las vértebras ($\approx 50\%$)
- b- aquéllos en que no se ha producido la fusión ósea entre las vértebras ($\approx 50\%$)

En el primer grupo, el hueso metafisario de las vértebras adyacentes se ha unido mediante hueso esponjoso bien estructurado de forma que no hay solución de

continuidad.

En el segundo grupo, se mantiene la separación de ambas metafisis óseas por una banda de tejido de cicatrización más o menos condricado.

Si repasamos las cifras dadas en los resultados para esta serie, vemos con claridad que la respuesta está en relación con la agresión quirúrgica y no con la presencia o ausencia de D.B.M. en el disco, ya que los porcentajes de osificación en uno u otro disco no difieren entre si.

Podemos, pues, afirmar después de los resultados obtenidos, que es la agresión quirúrgica efectuada y no el elemento osteoinductor introducido en el interior del disco la causante de la respuesta del mismo, respuesta que no parece estar modificada por la presencia del elemento osteoinductor, puesto que no existe diferencia, en ninguna de las tres series, entre las preparaciones de los discos en que se introdujo la D.B.M. y las preparaciones de los discos control.

Ragni y Lindholm (1991) (125), en su trabajo ya mencionado anteriormente, realizan implantes de D.B.M. en el espacio intervertebral de conejo previa extirpación del disco y labrado de una trinchera ósea en ambos platillos vertebrales.

Estos autores describen la respuesta microscópica del disco a los dos meses de la implantación, que como ya hemos indicado anteriormente se superponía a lo observado en las preparaciones de la primera y tercera series.

A los seis meses del implante, y según describen los autores, las vértebras adyacentes fueron unidas por algunos puentes óseos que cruzaban bandas

fibrosas situadas transversalmente. Los puentes óseos eran principalmente de hueso lamelar maduro.

Esta descripción podríamos identificarla con lo que observamos en los animales de la segunda serie de nuestro trabajo, en los que se ha producido la unión ósea de las vértebras.

5.4.3 Alteraciones en los implantes utilizados

También en este apartado hemos de diferenciar entre la primera y tercera series y la segunda serie, debido al distinto comportamiento de la D.B.M. introducida en el disco intervertebral.

5.4.3.1 En la primera y tercera series

La identificación de la D.B.M. ha sido posible en un 60% de los casos en la primera serie y en un 20 % en la tercera serie.

Creemos que el hecho de haberla identificado en unas preparaciones y no en otras, responde más a un problema de orientación del corte de la pieza anatomopatológica, puesto que los cortes que se procesaron fueron siempre los más centrales, condición indispensable para poder valorar lo que ocurre en el interior del disco intervertebral, entendiéndose que éstos eran siempre longitudinales en el sentido del eje mayor de la cola. Esto unido al hecho de que por otra parte el fragmento de D.B.M. siempre se encontró fuera del disco, hace

que sea absolutamente aleatorio el hecho de que aparezca o no en las preparaciones y que en una serie el porcentaje de observación sea mucho más elevado que en la otra.

Aclarado este punto, diremos que en todos los casos en que se identificó la D.B.M., ésta se encontraba dentro del tejido cicatricial que rellena más o menos el disco intervertebral y siempre fuera del disco, pero en su vecindad, a nivel de la entrada en el mismo.

Las alteraciones que presentaba la D.B.M., descritas en el apartado de resultados, las interpretamos como una invasión-reabsorción de la D.B.M. por tejido de granulación muy celular y con vasos, el cual evoluciona a cartílago y éste en algunas zonas a hueso que incluso contiene médula ósea.

Urist (1965) (161), colocando D.B.M. en lecho óseo, observa que ésta es invadida por vasos sanguíneos neoformados y reabsorbida rápidamente. Por su parte, el hueso nuevo fue depositado en cámaras excavadas en la matriz rellenas de células osteoprogenitoras proliferantes. Esta descripción, podríamos adaptarla perfectamente a los resultados observados en nuestras experiencias.

Estas alteraciones en la D.B.M., podrían superponerse a las que encontramos en ésta cuando la implantamos en músculo, pero a un ritmo más lento.

Aquí, siempre se observa un gran fragmento de D.B.M. con zonas sustituidas por hueso y otras invadidas por tejido conectivo fibroso más o menos condricificado, mientras que en la D.B.M. que se implantó en el músculo, apenas se aprecia restos de la antigua D.B.M., siendo casi todo hueso nuevo.



El punto en común en ambas implantaciones sería el hecho constatado de que la osificación nueva siempre se produce en el interior de la D.B.M. y nunca en los tejidos de alrededor, cosa por otra parte ya enunciada por Van de Putte y Urist en 1965 (170).

Según esta afirmación, podríamos deducir que difícilmente la D.B.M. implantada en el disco, inducirá la osificación del tejido fibrocartilaginoso del ánulus, con mucho, se conseguirá una fibrosis (tejido cicatricial) entre las dos vértebras, pero que creemos sería más consecuencia de la agresión quirúrgica que de la inducción provocada por la D.B.M.

El hecho de que los restos de D.B.M. siempre los hayamos encontrado fuera del disco, unido a los resultados del examen radiográfico en que apreciábamos el metal también fuera de él, nos hace pensar que el espacio dejado por la extirpación del núcleo pulposo (en la primera experiencia) a pesar de ser agrandado mediante curetaje (en la tercera experiencia), es del todo insuficiente para albergar el fragmento de D.B.M. introducido y que ésta y no otra es la causa de que siempre se encuentre en el exterior del disco.

Según estos resultados, del todo negativos para nuestra hipótesis de trabajo, la D.B.M. introducida en el interior del disco intervertebral, previa extirpación simple del núcleo pulposo o añadiendo un curetaje del ánulus, no induce la osificación del espacio intervertebral, ni consigue una unión ósea de las vértebras, a lo sumo provoca una unión fibrosa.

Ya hemos apuntado antes que Schreiber y Leu en 1989 (141), al realizar percutáneamente intentos de artrodesis intersomáticas, con hueso esponjoso autólogo, sin eliminar el hueso cortical del platillo vertebral, solamente

consiguieron estabilizaciones del segmento vertebral (se supone que por tejido fibrocartilaginoso) sin llegar a la artrodesis ósea.

El periostio utilizado en la primera experiencia, como elemento potencialmente generador de la osificación e introducido dentro del disco en las mismas condiciones de agresión quirúrgica que la D.B.M., tampoco provocó en ningún caso vestigios de osificación en el interior del disco; es más, en este caso ni siquiera fuera del mismo. En ningún caso pudimos identificar ninguna estructura que pudiéramos relacionar con el periostio introducido, ni fuera ni dentro del disco.

Todo esto nos lleva a pensar que el periostio no parece ser un buen elemento inductor de la osificación, al menos cuando no ha sido previamente estimulado y que por lo tanto no es factible su utilización en este estado para la consecución de artrodesis intersomáticas por osificación del ánulus discal.

Como era de esperar, el metal que se utilizó en la primera experiencia y que nos sirvió como control, no apareció en ninguna de las preparaciones, ya que al procesar la muestra, éste era expulsado. De todas formas, cabe reseñar que la respuesta del disco fue exactamente la misma que con la M.O.D. y el periostio.

Lindholm y col. (1982) (88), implantan periostio entre las espinosas de ratas, observando la presencia de células cartilaginosas y osteoblastos, pero no observaron la presencia de puentes óseos durante el período de experimentación (máximo de 4 semanas).

Pousa y Ritsilä (1979) (124), interponen periostio libre en un lado del arco posterior de la vértebra e injerto osteoperióstico en el otro lado, llegando a la

conclusión de que el injerto de periostio libre forma hueso más rápidamente.

Ritsilä y Alhopuro (1975) (133), de 57 trasplantes de periostio libre, en arco posterior de la vértebra de conejos jóvenes, previa desperiostización del lecho óseo, consiguen 47 fusiones óseas.

Parece ser, por lo tanto, que el periostio cuando se implanta en contacto con hueso, tiene tendencia a producir osificación (60,158), especialmente si con anterioridad se ha producido la estimulación del mismo (39,40,83).

5.4.3.2 En la segunda serie

En lo que a esta serie se refiere, en las pocas ocasiones en que identificamos la D.B.M., esta aparecía siempre en el interior del espacio intervertebral, y siempre en los casos en que no había habido osificación de este espacio.

El hecho de encontrar la D.B.M. dentro del espacio intervertebral es debido, en mi opinión, a que éste es mucho más amplio que en las series anteriores, ya que aquí hemos extirpado disco y placas epifisarias, con lo que el fragmento de D.B.M. quedaba alojado perfectamente dentro del espacio creado.

La baja incidencia de observaciones de D.B.M. (16,6%) en esta serie no puede ser atribuida a la orientación de los cortes, ya que si hemos escogido los más centrales, al estar la D.B.M. en el interior del espacio intervertebral, debería haberse observado de haber estado presente (en ningún caso se observaron fragmentos de D.B.M. fuera del disco, ni estructuras que pudieran confundirse con ella). Hemos de admitir pues que en esta serie la reabsorción de la D.B.M.

ha sido más importante que en las otras series, sobre todo en los casos en los que se ha producido la osificación (50%), y que sin embargo, ésta no puede atribuirse a efectos inductores de la D.B.M., puesto que en el espacio control se ha observado un porcentaje de osificaciones superponible (53,3%).

Una explicación lógica de este proceso podría ser el hecho de que al exponer el hueso esponjoso, dejamos un espacio más vascularizado que en las otras series, con lo que el proceso de reabsorción de la D.B.M. pudiera estar acelerado, quedando incorporada una vez reosificada al hueso esponjoso que une las dos vértebras, de una forma más bien pasiva.

Ragni y Lindholm (1991) (125), interponiendo D.B.M. en el espacio intervertebral previamente cruentado, obtienen unos resultados diametralmente opuestos a los nuestros, ya que ellos comunican unos resultados absolutamente contrarios entre los discos en que interponen D.B.M., en los cuales consiguen la unión ósea, y los discos control en los que no la consiguen.

5.4.4 Implantes en músculo estriado

La D.B.M. implantada en músculo estriado de pared abdominal ocasiona como respuesta y de forma sistemática, un verdadero "osículo", en el que apreciamos un centro con médula ósea madura y una corteza con hueso denso que la envuelve.

Son muchos los autores que describen este osículo en sus implantes de D.B.M. en músculo. Así Urist y col (1967) (168), trabajando sobre el principio de inducción ósea (posteriormente asimilado a la B.M.P.), afirman que los

substratos inductivos provocan la diferenciación de las células mesenquimales en condroblastos, osteoblastos y mieloblastos, los cuales desarrollan tejidos especializados para formar un órgano u osículo relleno de médula ósea funcional.

De la misma forma Chalmers Y col. (1975) (24), en una serie de implantes de D.B.M. en distintos órganos, describen el resultado del implante de la siguiente forma: "el hueso nuevo junto con el implante, formó un osículo en el que se desarrolló médula ósea".

Este osículo se encuentra generalmente dentro de los restos de la D.B.M., lo cual confirma que la inducción ósea se produce en el interior del implante y no en el tejido de alrededor (músculo), que en este caso reacciona englobando todo el conjunto en un tejido fibroso muy celular.

Van de Putte y Urist (1965) (170), trabajando sobre osteogénesis en el interior de implantes intramusculares de D.B.M., describen la osteogénesis y condrogénesis a partir de una diferenciación de células osteoprogenitoras pluripotenciales que tiene lugar en el interior de la matriz descalcificada, allí donde ésta ha sido invadida por tejido conectivo joven. Afirman también que el hecho de la formación ósea ocurre solamente en el interior de la matriz descalcificada y nunca en el tejido de alrededor.

Bernick y col. (1989) (12), por su parte, describen paso a paso los cambios sufridos por un fragmento de hueso desmineralizado implantado en músculo. Según sus experiencias, el fragmento de hueso es primeramente recubierto de tejido conectivo, a modo de envoltorio, relleno también los agujeros existentes en el fragmento óseo. Este tejido conectivo está muy vascularizado.

Posteriormente aparecen acúmulos de condrocitos, tanto en la perifería como en el interior del fragmento de hueso descalcificado. Más tarde se produce una osificación de todas estas zonas, a medida que se va reabsorbiendo la matriz descalcificada, siendo por último sustituida totalmente por hueso nuevo a las cuatro semanas.

Todas estas experiencias y descripciones concuerdan absolutamente con los resultados obtenidos en nuestros implantes de D.B.M. en músculo estriado, tanto en lo que se refiere a la descripción del proceso de osificación, que en nuestro caso siempre ha estado muy avanzado y con el fragmento de D.B.M. casi completamente reabsorbido y sustituido por hueso nuevo (nuestras lecturas se hicieron a las ocho semanas del implante), como en el hecho de que la osificación nueva solamente se produce en el seno de la D.B.M.

Por esta razón pensamos que de la implantación de D.B.M. en el disco intervertebral teóricamente podríamos esperar, como mínimo la formación de un osículo. Esto no lo hemos observado completamente ya que sólo hemos obtenido osificaciones parcelares en el interior de los fragmentos de D.B.M., que, no obstante podría considerarse como una fase más atrasada de la formación del osículo completo y se correspondería perfectamente con lo que describen Bernick y col. (12) en una fase intermedia de la formación del osículo.

Se podría interpretar este retraso en la evolución de la D.B.M. hacia el osículo como una consecuencia de la diferente vascularización que ofrece el lecho receptor, ya que a nivel del disco intervertebral y su perifería existe una perfusión sanguínea menor que a nivel del músculo estriado.

El tamaño de los osículos obtenidos, que en nuestro caso oscilan entre 0,5 y

1,5mm² de superficie, estaría condicionado por el tamaño del implante de D.B.M. utilizado en la experiencia.

Esta relación entre el tamaño del implante y la del osículo inducido ha sido establecida por varios autores (9,49,75,103,155,163).

En cuanto al periostio, queda claro que no ha sido un buen elemento inductor de la osificación. En ninguno de los implantes musculares hemos observado una inducción ósea (formación de un osículo) y solamente en tres casos se han observado pequeñas osificaciones, pero sin estructura de osículo, que podrían muy bien explicarse como implantes de células óseas unidas al periostio y que se transportaron junto a él.

De todas formas, el periostio ha demostrado no ser un buen substrato inductor de la osificación y no podemos esperar ningún resultado favorable con él, como de hecho así ha sucedido.

Ya Ollier en 1867 (119), obtuvo unos resultados irregulares en la formación de hueso con trasplante de periostio.

Otros autores también han fracasado en sus intentos de obtener hueso mediante implantes de periostio (19,37,85,123).

Sin embargo han sido muchos los autores que han conseguido la producción de hueso mediante el trasplante de periostio (21,29,60,132,134,165).

En un trabajo semejante al nuestro, Li y col. (1989) (91), implantan periostio tibial en pared abdominal de conejos, obteniendo la formación de hueso, con

la característica de que esta formación era mayor cuando el periostio provenía de animales jóvenes.

5.5 Reflexión final

Después de todo lo expuesto, estamos en condiciones de dar una respuesta a los tres puntos que señalábamos en los objetivos de nuestra hipótesis de trabajo.

Respecto al primer punto, en que nos planteábamos la intención de averiguar la respuesta del disco intervertebral a la introducción en su interior de sustancias con poder osteoinductor, creemos haber cumplido sobradamente con nuestro objetivo, y podemos decir, según nuestra experiencia, que la respuesta del disco intervertebral no está en relación con el substrato inductor empleado por nosotros (D.B.M. y periostio), sino más bien con la agresión quirúrgica a que ha sido sometido el disco. Esto queda demostrado por el hecho de que la misma respuesta se obtiene en los discos con diferente substrato inductor o sin él, siempre y cuando la agresión quirúrgica haya sido la misma.

Por otra parte también parece claro que la intensidad de la respuesta está en relación directa con la intensidad de la agresión.

Esta respuesta siempre fue mediatizada por la aparición de un tejido de granulación rico en células y vasos, que presenta en su seno acúmulos de células cartilaginosas. Este tejido sustituye en parte al anillo fibrocartilaginoso del disco cuando la agresión es mínima, o totalmente cuando la agresión es más importante, pero solamente se ha conseguido una unión ósea entre ambos extremos óseos vertebrales en los casos en que la agresión fue máxima, extirpando el disco completamente y los platillos vertebrales, dejando hueso esponjoso expuesto.

En el segundo punto, nos propusimos averiguar las posibilidades de provocar una fijación intersomática mediante este proceso, y referente a ello podemos decir que estas posibilidades existen, siempre y cuando se produzca una lesión de los platillos vertebrales, eliminando el disco, cartílago y hueso cortical (al menos en parte) para dejar hueso esponjoso expuesto, y que en este caso, el substrato inductor que se coloque puede tener una importancia secundaria.

Lo que sí parece claro es que no podemos conseguir una artrodesis ósea intersomática mediante la introducción de D.B.M. o periostio si antes no hemos realizado una cruentación del lecho óseo.

Esto vendría también apoyado por el hecho de que la D.B.M. induce la osificación en su interior y siempre se rodea de un tejido fibroso no induciendo la osificación en los tejidos que la envuelven, con lo que difícilmente podrá inducir la osificación del ánulus discal.

En cuanto al tercer punto, pretendíamos comprobar los potenciales osteoinductores de la matriz ósea desmineralizada homóloga y del periostio autólogo, y podemos decir que también hemos llegado a unas conclusiones que en parte coinciden plenamente con lo que otros autores han publicado anteriormente (en implantaciones en músculo). Según nuestras experiencias, la D.B.M. implantada en músculo induce de una forma clara la osificación en su interior y en unos plazos de tiempo semejantes a lo que han publicado otros autores, con el resultado final de una estructura ósea rellena de médula ósea activa que como máximo alcanzará el tamaño del fragmento de matriz implantado.

Este mismo substrato, cuando es implantado en el disco intervertebral, sufre las

mismas transformaciones, pero de forma más lenta, habiendo observado solamente osificaciones parciales de la D.B.M. implantada.

En cuanto al periostio, hemos de admitir que no hemos conseguido en ningún momento osificaciones valorables en el lugar del implante, tanto en el músculo como en el disco intervertebral, por lo que no lo podemos considerar como un elemento osteoinductor.

6. CONCLUSIONES

-
1. Es la agresión quirúrgica efectuada y no el elemento osteoinductor introducido en el interior del disco, el causante de la respuesta del mismo, respuesta que no parece estar modificada por la presencia del elemento osteoinductor.
 2. La intensidad de la agresión quirúrgica es directamente responsable del grado de respuesta en el disco intervenido.
 3. Para que se produzca la unión ósea entre las vértebras (artrodesis), parece ser fundamental que previamente se haya realizado una cruentación del lecho óseo hasta hueso esponjoso.
 4. La D.B.M. implantada es reabsorbida en parte e invadida por tejido de granulación que posteriormente se condrifica y finalmente se osifica.
 5. La osificación inducida por la D.B.M. siempre se produce en su interior y nunca en los tejidos de su alrededor.
 6. La D.B.M. introducida en el interior del disco intervertebral, previa extirpación simple del núcleo pulposos o añadiendo un curetaje del anulus, no induce la osificación del espacio intervertebral ni consigue una unión ósea de las vértebras, todo lo más consigue una unión fibrosa.
 7. La D.B.M. implantada, tanto en la pared abdominal como en el disco intervertebral, da lugar a un proceso de inducción ósea cuya meta final es la producción de un osículo con médula ósea en su interior, pero esto se desarrolla a mayor velocidad en el músculo que en la zona del disco intervertebral.

-
8. El método utilizado para la obtención de la D.B.M. ha demostrado su efectividad, pues la D.B.M. obtenida ha cumplido el objetivo de inducir la formación ósea en los implantes efectuados.
 9. El periostio, en estado de reposo, no produce ningún tipo de inducción a la osificación, tanto en los implantes musculares como en los implantes discales.
 10. El espacio discal de la cola de la rata es insuficiente para albergar cualquier elemento que se introduzca en su interior, teniendo tendencia a la expulsión del mismo y quedando éste alojado en el tejido peridiscal.
 11. En nuestras series, la edad del animal parece influir en la mortalidad anestésica y en la aparición de problemas intercurrentes (morbilidad).

7. BIBLIOGRAFIA

-
1. **Albee F.H.** Transplantation of a portion of the tibia into the spine for Pott's disease: A preliminary report. *J Am Med Assn* 1911;57:885-886
 2. **Aldinger G., Herr G., Küsswetter W., Reis H.J., Thielemann F.W., Holz U.** Bone morphogenetic protein: a review. *Int Orthop* 1991;15:169-177
 3. **Alper G., Bernick S., Yazdi M., Nimni ME** Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. *Am J Med Sci* 1989;298(6):371-376
 4. **Altman HN., Goodman D.G.** Neoplasie disease in "the laboratory rat". New York; Ed. Academics Press;1979:vol 1
 5. **Annersten** Citado por Martín Lagos. 1941
 6. **Aspenberg P., Andolf E.** Bone induction by fetal and adult human bone matrix in athymic rats. *Acta Orthop Scand* 1989;60 (2):195-199
 7. **Aspenberg P., Lohmander LS, Thorngren KG.** Failure of bone induction by bone matrix in adult monkeys. *J Bone Jt Surg* 1988;70 (4):625-627
 8. **Aspenberg P., Thorngren KG., Lohmander LS.** Rabbit bone matrix induces bone formation in the athymic rat. *Acta Orthop Scand* 1988;59 (3):276-278

-
9. **Aspenberg P., Wang E., Thorngren K.G.** Bone morphogenetic protein induces bone in the squirrel monkey, but bone matrix does not. *Acta Orthop Scand* 1992;63(6):619-622
 10. **Attenborough C.G., Reynolds M.T.** Lumbo-sacral fusion with spring fixation. *J Bone Joint Surg* 1975;57-B:283-288
 11. **Barnes W.P.** The use of blade guides in intervertebral interbody bone grafting. *J Bone Joint Surg* 1958;40-A:401-403
 12. **Bernick S., Paule W., Ertl D., Nishimoto K., Nimni M.E.** Cellular events associated with the induction of bone by demineralized bone. *J Orthop Res* 1989;7:1-11
 13. **Bessho K., Tagawa T, Murata M.** Comparison of bone matrix-derived bone morphogenetic proteins from various animals. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50(5):496-501
 14. **Bhaskar S.N., Cutright D.E, Boyers R.E.** Autogenous bone marrow transplants in the rat. *Oral Surg* 1970;29(3):472-479
 15. **Bier** Citado por Martín Lagos. 1924
 16. **Bismuth H., Berthelot P., Desbuquois B., Benhamou J.P., Fauvert R.** L'anostomose porto-cave expérimentale chez le rat normal. Etude de quelques anomalies biologiques. *Rev Fr Etud Clin Biol* 1964;6:608-613

-
17. **Blaimot P., Alameh M.** Biomécanique de l'arthrodèse lombaire. Acta Orthop Belg 1981;47:605-618
 18. **Bosworth D.M.** Clotheshpin graft of the spine for spondylolisthesis and laminal defects. Am J Surg 1945;67:61-65
 19. **Brown W.L., Brown C.P.** Preliminary report on experimental bone and transplantation. Surg Gynec Obstet 1913;17:681-689
 20. **Bullough P.G., Boachie-Adjei O.** Atlas de enfermedades de la columna. Anatomía descriptiva: macro y microscópica. Barcelona; Edika-Med S.A.; 1990:11-33
 21. **Burman M.S., Umansky M.** An experimental study of free periosteal transplants, wrapped around tendon. J Bone Joint Surg 1930;12:579-593
 22. **Cabot J.R., Roca J., Fernández-Fairen M., Diaz J.** Cirugía del dolor lumbo-sacro. Ponencia oficial XI congreso SECOT 1977;154-182
 23. **Cañadell J.** Lesiones del cartílago de crecimiento. Pamplona; Ediciones Universidad de Navarra; 1976:135-145
 24. **Chalmers J., Edinburgh G., Rush J.** Observations on the induction of bone in soft tissues. J Bone Jt Surg 1975;57-B:36-45
 25. **Chipault A.** Un cas de gibbosité avec paraplégie traité avec succès par les ligatures apophysaires. Trau Neurol Chir 1900;5:20-26

-
26. **Clarke N.P., Zuidema G.D., Smith G.D.** A method of producing controlled automatic inhalation anesthesia. *J An Med Vet Assoc* 1957;130:347-349
 27. **Cleveland D.M., Bosworth D.M., Thompson F.R.** Pseudoarthrosis in the lumbosacral spine. *J Bone Joint Surg* 1948;30-A:302-312
 28. **Cloward R.B.** Lesions of the intervertebral disc and their treatment by interbody fusion methods. *Clin Orthop* 1963;27:51-77
 29. **Cohen J., Lacroix P.** Bone and cartilage formation by periosteum. *J Bone Joint Surg* 1955(Am);37:717-730
 30. **Collins J.S.** Total disc replacement: a modified posterior lumbar interbody fusion. *Clin Orthop* 1985;193:64-67
 31. **Connolly J.F., Guse R., Tiedeman J., Dehne R.** Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin Orthop* 1991;266:259-270
 32. **Copher y Key.** Citado por Martín Lagos. 1934
 33. **Coulson R.A.** Relationship between fluid flow and O₂ demand in tissues in vivo and in vitro. *Prospect Biol Med* 1983;27:124-127
 34. **Craig F.S.** Vertebral body biopsy. *J Bone Jt Surg* 1956;38-A:93-102

-
35. **Crock H.V., Yoshizawa H., Kame S.K.** Observations on the venous drainage of the human vertebral body. *J Bone Jt Surg* 1973;55-B:528-533
 36. **Cuadrado M.A., De Pedro J.A., De Lucas F.G., Cebrian J.L., Furio V., Asenjo J.A., Valor R., López-Duran.** Reparación experimental de grandes defectos óseos mediante el implante de un extracto parcialmente purificado de B.M.P. *Rev Ortop Traum* 1992;36:488-494
 37. **Davis J.S., Hunnicutt J.A.** The osteogenic power of periosteum; with a not on bone transplantation. *Ann Surg* 1915;61:672-685
 38. **De Pablos J., Alfaro C., Martinez-Lotti G., Nilsson O., Barrios C.** Valor de la desmineralización de aloinjertos en el tratamiento de grandes defectos óseos. *Rev Ortop Traum* 1992;36:495-503
 39. **Domingo Pech J.** Autotransplante de periostio hipertrofiado. *Anales del Centro de Cirugía Experimental de la Mutua Sabadellense* 1971;1:57-75
 40. **Domingo Pech J.** Autotransplante de periostio hipertrofiado (II). *Anales del Centro de Cirugía Experimental de la Mutua Sabadellense* 1972;2:19-40
 41. **Dubuc F.L., Urist M.R.** The accessibility of the bone induction principle in surface-decalcified bone implants. *Clin Orthop* 1967;55:217-223

-
42. **Dziedzic-Goclawska A., Ostrowski K., Stachowicz W, Michalik J., Grzesik W.** Effect of radiation sterilization on the osteoinductive properties and the rate of remodeling of bone implants preserved by lyophilization and deep-freezing. *Clin Orthop* 1992;72:30-37
 43. **Everit B.S.** The analysis of contingency tables. Chapman and Hall 1977
 44. **Fell H.B.** The osteogenic capacity in vitro of periosteum and endosteum isolated from the limb skeleton of fow embryos and young chicks. *J Anat* 1932;66:157-185
 45. **Freebody D., Bendall R., Taylor R.D.** Anterior transperitoneal lumbar fusion. *J Bone Joint Surg* 1971;53-B:617-627
 46. **Friedenberg ZB., Brighton CT., Michelson JD., Bednar J., Schmidt R., Brockmeyer T.** The effects of demineralized bone matrix and direct current on an "in vivo" culture of bone marrow cells. *J Orthop Res* 1989;7 (1):22-27
 47. **Garcés G.L., Hernandez Hermoso J.A.** Bone growth after periosteal stripping in rats. *Int Orthop* 1991;15:49-52
 48. **Gendler E.** Perforated demineralized bone matrix: a new form of osteoinductive biomaterial. *J Biomed Mater Res* 1986;20 (6):687-697
 49. **Gepstein R., Weiss R.E., Hallel T.** Bridging large defects in bone by demineralized. Bone matrix in the form of a powder. *J Bone Jt Surg* 1987;69-A:984-992

-
50. **Ghosez J.P., Cambier P., Goguin J.P.** La place de l'arthrodèse antérieure intersomatique dans le traitement des lombalgies. *Acta Orthop Belg* 1981;474-5:643-656
 51. **Glass D.A., Mellonig J.T., Towle H.J.** Histologic evaluation of bone inductive proteins complexed with coralline hidroxyapatite in an extraskeletal site of the rat. *J Periodontol* 1989;60 (3):121-126
 52. **Glowacki J., Kaban L.B., Murray J.E., Folkman J., Mulliken J.B.** Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. *The Lancet* 1981;May:959-962
 53. **Goel S.C., Tuli S.M., Singh H.P., Sharma S.V., Saraf S.K., Srivastava T.P.** Allogenic decalbone in the repair of benign cystic lesions of bone. *Int Orthop* 1992;16:176-179
 54. **Gómez-Mascaraque M.A., Gómez Iniesta A.** Open Access II. Madrid; Editorial Paraninfo; 1988
 55. **Guijarro Jorge R., Smith Agreda v. V., Montesinos Castro-Girona M., Marti Huedo F., Sanchez-Palencia Ramos A., Cueto Ladrón de Guevara A.** Estudio experimental de la influencia de la bioestimulación láser infrarroja de 904 nm en la producción de hueso por autoinjertos periósticos libres usados para la reparación de defectos traqueales por pérdida de sustancia parietal. *Inv Clin Laser 2ª Epoca* 1989;1-2:3-14

-
56. Guo M. ZH., Xia ZH. SH., Lin L.B. The mechanical and biological properties of demineralised cortical bone allografts in animals. *J Bone Jt Surg* 1991;73-B:791-794
 57. Gupta D., Khanna S., Tuli S.M. Bridging large bone defects with a xenograft composited with autologous bone marrow. *Int Orthop* 1982;6:79-85
 58. Guth P.H., Epseberg A. In vivo microscopy study of the gastric microcirculation. *Digestive Diseases* 1972;17:391-393
 59. Hadra B.E. Wiring the spinous processes in Pott's disease. *Trans Amer Orthop Ass* 1891;4:206
 60. Haldeman K.O. The influence of periosteum on the survival of bone grafts. *J Bone Jt Surg* 1933;15:302-319
 61. Hanamura H., Higueki Y., Nakagawa M., Iwata H., Urist M.R. Solubilized bone morphogenetic protein (B.M.P.) from mouse osteosarcoma and rat demineralized bone matrix. *Clin Orthop* 1980;148:281-290
 62. Harada K., Dida S., Sasaki S. Chondrogenesis and osteogenesis of bone marrow-derived cells by bone-inductive factor. *Bone* 1989;9(3):177-183
 63. Hase T., Moss B.J. Microvascular changes of gastric mucosa in the development of stress ulcer in rats. *Gastroenterology* 1973;65:224-227

-
64. Heckman J.D., Boyan B.D., Aufdemorte TH.B., Abbott J.T. The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J Bone Jt Surg* 1991;73-A(5):750-763
 65. Hibbs R. An operation for progressive spinal deformities. *New York Med J* 1911;93:1013
 66. Hijikata S., Yamagishi M., Nakayama T., Oomori K. Percutaneous nucleotomy: A new treatment method for lumbar disc herniation. *J Toden Hosp* 1975;5:39-43
 67. Hollinger J.O., Mark D.E., Goco P., Quigley N., Desverreaux R.W., Bach D.E. A comparison of four particulate bone derivatives. *Clin Orthop* 1989;267:255-263
 68. Horisaka Y., Okamoto Y., Matsumoto N., Yoshimura Y., Kawada J., Yamashita K., Tagaki T. Subperiosteal implantation of bone morphogenetic protein adsorbed to hydroxyapatite. *Clin Orthop* 1991;268:303-312
 69. Huang DS., Kao RT., Shteyer A., Kaban L. Mitogenic response of cells in culture to demineralized bone matrix. *J Oral Maxillofac Surg* 1988;46(6):460-464
 70. Hulth A., Johnell O., Henricson A. The implantation of demineralized fracture matrix yields more new bone formation than does intact matrix. *Clin Orthop* 1988;234:235-239

-
71. **Inque S.I., Watanabe TS., Hirose A., Tanaka T., Matsui N., Saegusa O, Sho E.** Anterior discectomy and interbody fusion for lumbar disc herniation. *Clin Orthop* 1984;183:22-31
 72. **Isaksson S., Alberius P.** Comparison of regenerative capacity elicited by demineralized bone matrix of different embryonic origins. *J Craniomaxillofac Surg* 1992;20(2):73-80
 73. **Itoman M., Nakamua S.** Experimental study on allogenic bone grafts. *Int Orthop* 1991;15:161-165
 74. **Jaroma H.J., Ritsilä V.** Effect of diffusion chamber pore size on differentiation and proliferation of periosteal cells. An experimental study. *Clin Orthop* 1988; Nov(236):258-264
 75. **Jergesen H.E., Chua J., Kao R.T., Kaban L.B.** Age effects on bone induction by demineralized bone powder. *Clin Orthop* 1991;268:253-259
 76. **Johnson EE, Urist MR., Finerman GA.** Repair of segmental defects of the tibia with cancellous bone grafts augmented with human Bone Morphogenetic protein. A preliminary report. *Clin Orthop* 1988;236:249-257
 77. **Johnson EE., Urist MR., Schmarlzried TP., Chotivichit A., Huang HK., Finerman GA.** Autogeneic cancellous bone grafts in extensive segmental ulnar defects in dogs. Effects of xenogeneic bovine Bone Morphogenetic Protein without and with interposition of soft tissues and interruption of blood supply. *Clin Orthop* 1989;243:254-265

-
78. **Judet R., Judet J.** Immobilisation vertebrale par endoprothese avec grelle. Presse Med 1950;58:579-582
 79. **Jung A., Kehr P., Lang G., Nuss J.M.** Les arthrodèses lombaires antérieures intersomatiques. Ann Chir 1974;28:203-211
 80. **Jung y Sureyva Cemil.** Citado por Martín Lagos. 1935
 81. **Kim NH., Yang KH., Lee HM., Oh SH.** Effect of porcine bone morphogenetic protein on healing of bone defect in the rabbit radius. Yonsei Med J 1992;33(1):54-63
 82. **Klinkerfuss G.H.** Study of growing power of periosteal callus when transplanted to costal cartilages. Surg Gynec Obstet 1924;38:625-631
 83. **Küntsch G.** El enclavado intramedular. Barcelona; Científico-Médica; 1965:7-10
 84. **Köhler P., Ehrnberg A., Kreicbergs A.** Osteogenic enhancement of diaphyseal reconstruction. Acta Orthop Scand 1990;61(1):42-45
 85. **Leriche R., Policard A.** The normal and pathological physiology of bone. St Louis; Hosby; 1928
 86. **Leriche y Lucinesco.** Citado por Martín Lagos. 1935
 87. **Leu H., Hauser R., Schreiber A.** Percutaneous lumbar spine fusion. Acta Orthop Scand (suppl 251) 1993;64:116-119

-
88. Lindholm T.S., Nilsson O.S., Lindholm T.C. Extraskeletal and intraskeletal new bone formation induced by demineralized bone matrix combined with bone marrow cells. *Clin Orthop* 1982;171:251-255
 89. Lin P.M. Posterior lumbar interbody fusion technique: complications and pitfalls. *Clin Orthop* 1985;193:90-102
 90. Lin P.M., Cautilli R.A., Joyce M.F. Posterior lumbar interbody fusion. *Clin Orthop* 1983;180:154-168
 91. Li W.G., Tang J.Q., Cui Q.L., Zhou R.Z. Experimental study of free periosteal autograf. Increasing osteogenesis of periosteum. *Chin Med J Engl* 1989;102(6):411-415
 92. Lucas PA, Syftestad GT., Goldberg VM, Caplan AI Ectopic of cartilage and bone by water-soluble proteins from bovine bone using a collagenous delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 1989;23 (A-1Suppl):23-29
 93. Marquet R., Hess F., Kort W., Boeckx W. *Microsurgery: Experimental techniques in the rat and clinical applications*. Belgium; European Press, Ed. Ghent;1976:vol 1
 94. Martín Lagos F., Zarapico Romero M. Obtención experimental de hueso metaplástico. *Instituto Nacional de Ciencias Médicas* 1946;6:173-215

-
95. **Martinez Gonzalez S.** Mecanismos de compensación de la microcirculación hepática después de la derivación portocava. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona 1988
 96. **Matthews D.E., Farewell V.T.** Using and understanding medical statistics. Second revised edition, Karger, Basel 1988
 97. **McAfee P.C., Regan J.J., Farey I.D., Gurr K.R., Warden K.E.** The biomechanical and histomorphometric properties of anterior lumbar fusions: a canin model. *J Spinal Disord* 1992;1:101-110
 98. **Mc. Bride E.D.** Mortised transfacet bone block for lumbosacral fusion. *J Bone Joint Surg* 1949;31-A:385-393
 99. **McCulloch J.A., Vadell G.** Lateral lumbar discography. *Brit J Radiol* 1978;51:498-501
 100. **McWilliams C.A.** The funtion of the periosteum in bone transplants based on four human transplantation without periosteum and some animal experiments. *Surg Gynec Obstet* 1914;18:159-169
 101. **Mercer W.** Spondylolisthesis: With a description of a new method of operative treatment and notes of ten cases. *Edimburg Med J* 1936;43:545-572
 102. **Miller AG.** A case of bone grafting with decalcified chips. *Lancet* 1890;20:618-619

-
103. **Mohr H., Kragstrup J.** Morphostereometry of heterotopic ossicles in the rat. *Acta Orthop Scand* 1991;62 (3):257-260
 104. **Monteiro A., Gastambide D.** Artrodès et prohèse: Artrodès percutanée intersomatique. Symposium: percutaneous nucleotomy 1989; cinquième session: comunicació
 105. **Munting E., Wilmart J-F., Wijne A., Hennebert P., Delloye CH.** Effect of sterilization on osteoinduction. *Acta Orthop Scand* 1988;59 (1):34-38
 106. **Muthukumaran N., Ma S., Reddi AH.** Dose-depedence of and threshold for optimal bone induction by collagenous bone matrix and osteogenin-enriched fraction. *Coll Relat Res* 1988;8 (5):433-441
 107. **Nachemson A., Lewin T., Moroudas A., Freeman M.A.R.** In vitro diffusion of dye through the end-plates and the annulus fibrosus or human lumbar intervertebral disc. *Acta Orthop Scand* 1970;41:589-607
 108. **Nade S., Burwell R.G.** Decalcified bone as a substrate for osteogenesis. *J Bone Jt Surg* 1977;59-B:189-196
 109. **Nathan R.M., Bentz H., Armstrong R.M., Piez K.A., Smestad T.L., Ellingsworth L.R., Mcpherson J.M., Seyedin S.M.** Osteogenesis in rats with an inductive bovine composite. *J Orthop Res* 1988;6 N° 3:324-334
 110. **Naylor A.** Changes in the human vertebral disc with age. *Proc R Soc Med* 1958;51:23-27

-
111. **Netter F.H.** Sistema musculoesquelético. Colección Ciba de Ilustraciones médicas. Edit. Salvat, Barcelona 1990;8.1:166-167
 112. **Neufeld J.H., Haghighi P., Machado T.** Growth related increase in rat intervertebral disc size: a quantitative radiographic and histologic comparison. *Laboratory Animal Science* 1990;40:303-307
 113. **Neuhoff.** Citado por Martín Lagos. 1920
 114. **Niedermann B., Boe S., Lauritzen J., Rubak J.M.** Glued periosteal grafts in the knee. *Acta Orthop Scand* 1985;56:457-460
 115. **Nilsson O.S., Bauer H.C.F., Brosjö O., Törnkvist H.** A comparison of indomethacin and diclofenac in the inhibition of experimental heterotopic new bone formation. *Int Orthop* 1987;11:283-287
 116. **Nimni ME., Bernick S., Ertl D., Nishimoto SK., Paule W, Strates BS, Villaneuva J.** Ectopic bone formation is enhanced in senescent animals implanted with embryonic cells. *Clin Orthop* 1988;234:255-266
 117. **Nolan P.C., Nicholas R.M., Mulholland B.J., Mollan R.A.B., Wilson D.J.** Culture of human osteoblasts on demineralised human bone. *J Bone Jt Surg* 1992;74-B:284-286
 118. **Nylander G., Olerud S.** The vascular pattern of the gastric mucosa of the rat following vagotomy. *Surg Gynec Obs* 1961;112:475-483

-
119. **Ollier L.** *Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux.* París; Masson & Fils; 1867
 120. **Owen R., Goodfellow J., Bullough P.** *Fundamentos científicos de ortopedia y traumatología.* Barcelona; Salvat Editores; 1984:106-115
 121. **Padilla J., Tarazona V., Paris F., Camanas A., Borro J.M.** *Comportement biologique et mécanique de greffons libres de péricondre et de périoste implantés sur la paroi intestinale du chien.* *Ann Chir* 1981;35:643-644
 122. **Panlab S.L.** *Análisis nutritivos de las dietas Panlab. Resultados estadísticos.* Barcelona; Ed. Panlab S.L.; 1986
 123. **Phemister D.B.** *The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents.* *Surg Gynec Obstet* 1914;19:303-333
 124. **Poussa M., Ritsilä V.** *The osteogenic capacity of free periosteal and osteoperiosteal grafts.* *Acta Orthop Scand* 1979;50:491-499
 125. **Ragni P., Lindholm T.S.** *Interaction of allogenic demineralized bone matrix and porous hydroxyapatite bioceramics in lumbar interbody fusion in rabbits.* *Clin Orthop* 1991;272:292-299
 126. **Ray R.D., Holloway J.A., Washington S.** *Bone implants.* *J Bone Jt Surg* 1957;39-A:1119-1128

-
127. **Ripamonti U.** Bone induction in nonhuman primates. *Clin Orthop* 1991;269:284-294
 128. **Ripamonti U.** Calvarial regeneration in primates with autolyzed antigen-extracted allogeneic bone. *Clin Orthop* 1992;282:293-303
 129. **Ripamonti U., Ma S., Reddi A.H.** The critical role of geometry of porous hydroxyapatite delivery system in induction of bone by osteogenin a bone morphogenetic protein. *Matrix* 1992;12(3):202-212
 130. **Ripamonti U., Ma SS., Reddi AH.** Induction of bone in composites of osteogenin and porous hydroxyapatite in baboons. *Plast-Reconstr-Surg* 1992;89 (4):731-739
 131. **Risto O., Wahlström O., Abdiu A., Walz TH.** Effect of platelet derived growth factor on heterotopic bone formation in rats. *Acta Orthop Scand* 1991;62(1):49-51
 132. **Ritsilä V., Alhopuro S.** Reconstruction of experimental tracheal cartilage defects with free periosteum. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1973;7:116-119
 133. **Ritsilä V., Alhopuro S.** Espinal fusion with free periosteal grafts and its effect on vertebral growth in young rabbits. *J Bone Jt Surg* 1975;57:500-505
 134. **Ritsilä V., Alhopuro S., Rintala A.** Bone formation with free periosteum. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1972;6:51-56

-
135. **Rohde C.** Does bone form from osteoblast or from metaplasia of the surrounding tissue?. *Surg Gynec Obstet* 1925;41:740-772
 136. **Rolander S.D.** Motion of the lumbar spine. With special reference to the stabilizing effect of posterior fusion. *Acta Orthop Scand* 1966;90 suppl.1:54-60
 137. **Rowett M.A.** Guías de disección: III La rata, con notas sobre el ratón. Barcelona; Ediciones Ucrania; 1976:53-57
 138. **Roy Camille R., Demeureneare C., Barcard E., Sailland E.** Osteosintesis du rachis dorsal et lombaire par voie posterieure. *Nlle Presse Med* 1973;12:1309-1312
 139. **Sacerdotti y Frattin.** Citado por Martín Lagos. 1901
 140. **Sánchez Martin M.M.** Traumatología y Ortopedia: Estructura y función del hueso. Aula Médica, Edit. C.E.A., Madrid 1987;1:167-192
 141. **Schreiber A., Leu H.J.** Arthrodèse et prothèse: Arthrodèse percutanée intersomatique. Symposium: Percutaneous nucleotomy, cinquième session, Bruxelles 1989
 142. **Schreiber A., Leu H.J.** Stabilisation vertébrale et arthrodèse intersomatique percutanée: possibilités actuelles. *Rachis* 1989;1:173-179
 143. **Schreiber A., Suezawa Y.** Transdiscoscopic percutaneous nucleotomy in disc herniation. *Orthop Rev* 1986;15:35-38

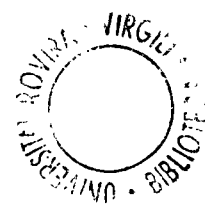
-
144. **Schwarz N., Redl H., Schiesser A., Schlang G., Thurnher M., Lintner F., Dinges H.P.** Irradiation-sterilization of rat bone matrix gelatin. *Acta Orthop Scand* 1988;59:165-167
145. **Schwarz N., Redl H., Schlag G., Schiesser A., Lintner F., Dinges HP, Thurnher M.** The influence of fibrin sealant on demineralized bone matrix-dependent osteoinduction. A quantitative and qualitative study in rats. *Clin Orthop* 1989;238:282-287
146. **Schwarz N., Schlag G., Thurnher M., Eschberger J., Dinges H.P., Redl H.** Fresh autogeneic, frozen allogeneic, and decalcified allogeneic bone grafts in dogs. *J Bone Jt Surg* 1991;73-B:787-790
147. **Senn N.** On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am J Med Sci* 1889;98:219-143
148. **Shepperd J.A.N.** Arthrodèse et prothèse: Arthrodèse percutanée intersomatique. Symposium: Percutaneous nucleotomy, cinquième session, Bruxelles 1989
149. **Sigholm G., Gendler E., Mckellop H., Marshall GJ., Moore TM., Sarmiento A.** Graft perforations favor osteoinduction - Studies of rabbit cortical grafts sterilized with ethylene oxide. *Acta Orthop Scand* 1992;63(2):177-182
150. **Smith L.** Enzyme dissolution of the nucleus pulposus in humans. *JAMA* 1964;187:137-142

-
151. **Solheim E, Pinholt E.M, Andersen R., Bang G., Sudmann E., Norway HAGAVIK.** The effect of a composite of polyorthoester and demineralized bone on the healing of large segmental defects of the radius in rats. *J Bone Jt Surg* 1992;74-A:1456-1463
 152. **SPSS.** Statistical Package for sciences. SPSS Inc, Chicago, USA
 153. **Strates BS., Connolly JF.** Osteogenesis in cranial defects and diffusion chambers. Comparison in rabbits of bone matrix, marrow, and collagen implants. *Acta Orthop Scand* 1989;60(2):200-203
 154. **Strates BS., Stock AJ., Connolly JF.** Skeletal repair in the aged: a preliminary study in rabbits. *Am J Med Sci* 1988;296 (4):266-269
 155. **Tiedeman J.J., Connolly J.F., Strates B.S., Lippiello L.** Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. *Clin Orthop* 1991;268:294-302
 156. **Trias M.** Conseqüències de la vagotomia gàstrica proximal i en especial sobre la curvatura menor de l'estómac. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona 1979
 157. **Tuli S.M., Singh A.D.** The osteoinductive property of decalcified bone matrix. *J Bone Jt Surg* 1978;60-B:116-123
 158. **Uddströmer L., Ritsilä V.** Osteogenic capacity of periosteal grafts. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1978;12:207-214

-
159. Umemura M., Kawai T., Miki A., Kataoka H., Kurita S., Koie M., Kishi M., Ohno Y., Hasegawa J., Kawai T., Et AL. Bone inductive activity of hydroxyapatite-bone morphogenetic protein complex. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi* 1989;31 (3):860-869
 160. Uretzky G., Appelbaum J., Sela J. Inhibition of the inductive activity of demineralized bone matrix by different percutaneous implants. *Biomaterials* 1988;9:195-197
 161. Urist M.R. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899
 162. Urist M.R. Proteína morfogenética en la generación y regeneración del hueso. *Rev Ortop Traum* 1990;34(2):240-252
 163. Urist M.R., Dowell T.A. Inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix. *Clin Orthop* 1968;61:61-77
 164. Urist M.R., Dowell T.A., Hay P.H., Strates B.S. Inductive substrates for bone formation. *Clin Orthop* 1968;59:59-96
 165. Urist M.R., Mclean F.C. Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone Jt Surg* 1952;34-A:443-476
 166. Urist M.R., Mikulski A., Boyd S.D. A chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone banks. *Arch Surg* 1975;110:416-428

-
167. **Urist M.R., Silverman B.F., Büring K., Dubuc F.L., Rosenberg J.M.** The bone induction principle. *Clin Orthop* 1967;53:243-283
 168. **Urist M.R., Strates B.S.** Bone morphogenetic protein. *J Dental Res* 1971;50(Suppl.6):1392-1406
 169. **Valls J., Ottolenghi E.E., Schajowicz F.** Aspiration biopsy in diagnosis of lesions of vertebral bodies. *JAMA* 1948;136:376-382
 170. **Van de Putte K.A, Urist M.R.** Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop* 1965;43:257-270
 171. **Varlet A., Dauchy PH., Hingrez M.** Ostéogénèse indvite par l’addition de matrice osseuse déminéraliséeà des billes de plâtre aux antibiotiques. *Rev Chir Orthop* 1985;71(2):73-78
 172. **Wheater P.R., Burkih H.G., Daniels U.G.** Histología funcional. Barcelona; Edit. Jims; 1987:2ª edición:142-160
 173. **Vilardell J.M.** Indicaciones del bloqueo vertebral. *Cir Aparat Locomotor* 1949;6:155-159
 174. **Wilson P.D., Straub L.** Lumbosacral fusion with metallicplate fixation. *Amer Acad Orthop Surg Tnts Corse Lect* 1952;9:53-57

-
175. **Whittle B.J.R.** Mechanism underlying gastric damage induced by indometacin and bilesalt and the actions of prostaglandins. *Br J Pharmacol* 1977;60:455-460
176. **Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitsock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M., Wang E.A.** Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-1534
177. **Wu CH., Hara K., Ozawa H.** Enhanced osteoinduction by intramuscular grafting of BMP-beta-ICP compound pellets into murine models. *Arch Histol Cytol* 1992;55(1):97-112
178. **Wyke B.** Neurological aspects of low back pain. In: Yaison M.I.V. (ed). *The lumbar spine and back pain*. New York; Grune and Etratton; 1976
179. **Yasko A.W., Lane J.M., Fellingner E.J., Rosen V., Wozney J.M., Wang E.A.** The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). *J Bone Jt Surg* 1992;74-A(5):659-670
180. **Ylinen P., Kinnunen J., Laasonen E.M., Lamminen A.** Lumbar spine interbody fusion with reinforced hydroxyapatite implants. *Arch Orthop Traum Surg* 1991;110:250-256
181. **Young M.H.** The repair of experimental defects in rabbit skulls. *J Bone Jt Surg* 1964;46B:329-335



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RESPUESTA DEL DISCO INTERVERTEBRAL DE LA RATA A LA INTRODUCCIÓN EN SU INTERIOR DE SUBSTRATOS ORGÁNICOS
INDUCTORES DE LA OSIFICACIÓN
Antonio Ruiz Guillén
DL:T-1559-2009 / ISBN: 978-84-692-4519-4

