

Revista Mexicana de Ortopedia y Traumatología

Volumen
Volume **16**

Número
Number **3**

Mayo-Junio
May-June **2002**

Artículo:

Modelo experimental de fracturas y consolidación ósea en ratas

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Sociedad Mexicana de Ortopedia, A. C.

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Medigraphic.com

Modelo experimental de fracturas y consolidación ósea en ratas

Dra. María del Pilar Diez García,* Dr. Daniel Chávez Arias,** Dr. Rosalío Mercado Camargo,*** M. en C. Víctor Manuel Domínguez Hernández,**** Dr. Marco Antonio Torres,***** M. en C. Pedro Alejandro Lomelí Mejía,**** T.L. Joel Méndez Heredia*****

Instituto Nacional de Rehabilitación
Del Centro Nacional de Rehabilitación. Ciudad de México

SUMMARY. *Introduction.* This is an experimental model of osseous fracture and fracture healing, which begins with the design and manufacture of a machine to produce standard fractures (Brighton and Landry, 1996). *Material and methods.* The study of 25 male Wistar rats 300-450 g of weight, managed for tibial shaft fracture and intramedullary nail. Biochemical evaluation: Na+ K+ Ca+ P. Biomechanics: Bending strength, yield point, stiffness, absorbed energy. Histological study (pathology). *Results.* There were 2 transversal fractures, 22 short oblique, 1 multifragmentary; Bending strength, yield point 103.8 ± 28.9 N. Observe increase of (CaNaPKMg) with a maximum at approximately 15 days. Sacrifice rats: at 3 days, osseous material on edge, minimum granulation, inflammatory cells; 7 days: hemorrhage hyperplasia on margins, osteoblasts, immature cartilage; 13 days: osseous tissue, bridge of periosteum and endosteum, immature cartilage cells, new bone; 21 days: healing of fracture days complete fracture healing. *Statistics.* Student's t test, ANOVA. *Discussion.* The model has been repeated in 25 rats, fracture at 80% of energy (transverse and short oblique fractures), bone absorbs more energy than intramedullary nail. Histological study has normal process of osseous growth on the induction stage; formation of soft callus, hard and remodeling, agree with the sanguineus increase (Na Ca P K Mg). *Conclusion.* It is possible to have an experimental model of fracture production and bone fracture healing.

Key words: experimental model, rats, osteogenesis, regeneration, bone.

Resumen en Español al final

El proceso de producción de fracturas se ha estudiado desde la época de Galeno e Hipócrates, hoy en día los avances tecnológicos han encontrado nuevas soluciones y diferentes investigaciones para su consolidación.²

Yuehuei, explicó la necesidad de tener métodos estándar para la producción de fracturas que se pudieran comparar⁹ ya que existen estudios publicados en la literatura de habla inglesa de métodos manuales y tridimensionales (Bak y Andreassen) o los que usan guillotina (Jackson, Sarmiento, Northmore Ball, Bonnarens y Ehinborns). Las técnicas manuales no son aceptables porque no tienen control sobre la fuerza que producen, debiendo además tener un grado variable de desplazamiento y de los movimientos de los fragmentos. En los métodos que usan tres puntos de apoyo, no se puede medir la fuerza de aplicación. Con el uso de guillotina se tiene un control del sitio, velocidad, aceleración y, por ende, la energía con que se produce la lesión.

Después de la producción de la fractura se analizan los procesos de consolidación. Hay nuevas técnicas de biología molecular disponibles para el estudio de la consolidación ósea, los grupos de estudio se han enfocado a la expresión génica de la colágena, proteínas y los factores de crecimiento en que participa la matriz ósea durante el proceso de reparación de las fracturas. Hiltunen, estudió la producción de fracturas y describe las características bioquímicas, histopatológicas y biomecánicas.¹⁰

En el proceso de consolidación, el hematoma favorece la consolidación en el hueso y en el perióstio, proceso que es controlado por la angiogénesis.¹⁰

La valoración del nitrógeno da la información del contenido de proteínas; la hidroxiapatita valora el total de colágena, que aumenta en el curso de 9-14 días; el proceso de mineralización, y la concentración de calcio se incrementan hasta en el 60% en relación con el hueso intacto a los 28 días, histológicamente el tejido mesenquimatoso tiene un máximo en 5 a 7 días, el cartílago se forma a partir del quinto día y hasta el noveno. La formación perióstica de hueso nuevo, membranoso, formará osificación endocondral, el nuevo hueso tiene una formación lineal que se incrementa en la consolidación ósea.

Landry publicó en 1996, la respuesta a la lesión ósea explicando los diferentes grupos celulares que aparecen día con día hasta la consolidación; en el 1^{er} día, existen células inflamatorias, en el 3^{er} día osteoblastos y material osteoide, al 5^o día proliferación de tejido de granulación, al 7^o día hay formación del callo blando, al 14^o se presenta tejido fibroso en el callo, a los 21 días se encuentra hueso nuevo en la su-

* Jefe de Servicio Rehabilitación en Traumatología.

** Jefe de División de Rehabilitación.

*** Jefe de División de Investigación.

**** Laboratorio de Biomecánica.

***** Servicio de Anatomía-Patológica.

***** Laboratorio de Bioquímica.

Dirección para correspondencia:

Dra. María del Pilar Diez García. Calz. México-Xochimilco No. 289, Col. Arenal de Guadalupe, Tlalpan. México, D.F. 14389. Tel. 5999-1000 ext. 13111.

perficie cortical.¹⁴ Se valoran el hueso intacto y fracturado, la capacidad de deformación, carga y cedencia, rigidez y energía de absorción. El material de nuestro estudio sometido a cargas de flexión, se calcula que requiere baja energía para obtener fracturas transversas u oblicuas cortas.

Se integrará una forma de estudio del crecimiento del tejido, su relación con los cambios sanguíneos de minerales y la prueba mecánica del hueso fracturado para medir la resistencia que tiene el tejido en formación.¹⁹ Uno de los objetivos es saber las constantes normales de la rata como base de datos para futuras líneas de investigación sobre la consolidación ósea.^{4,13} Es importante saber si existe una relación entre el tejido en formación, los cambios de electrólitos sanguíneos y la rigidez, carga de cedencia y energía de absorción en el callo óseo de la tibia de rata.

Material y métodos

Se utilizaron en el periodo de noviembre de 1996 a noviembre de 98, 25 ratas macho de la cepa Wistar, de 300-450 g de peso corporal, para la cirugía de la tibia, con la aplicación de un alambre de Kirschner de 0.9 mm de diámetro y se disecaron 22 tibias íntegras, bajo anestesia con pentobarbital sódico intraperitoneal a dosis de 40 mg/kg corporal, con un cálculo de 80% de energía para hacer fracturas transversas y oblicuas cortas.

Estudio bioquímico. Se tomó muestra de sangre mediante punción cardíaca a todas las ratas, antes de la fractura y el día de su sacrificio para obtener los valores normales y saber si existían cambios en los mismos. La sangre se recolectó en tubos con gel, se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos para obtener el suero. Una vez obtenido, se empleó para determinar el calcio, fósforo, sodio, potasio y fosfatasa alcalina, utilizando equipos comerciales y mediante técnicas colorimétricas.

Estudio biomecánico. Se diseñó una máquina para producir fracturas controladas de la tibia de la rata, conformada por las siguientes partes, 1) base, 2) sistema ajustable de apoyo de la pata de rata, 3) dos columnas inferiores, 4) dos travesaños, 5) dos columnas superiores y 6) un sistema de guillotina. El dispositivo se construyó empleando perfiles de acero en el taller de prototipos del hospital. La máquina está controlada en una combinación de partes fijas, ajustables y móviles. La base, las dos columnas inferiores, los travesaños y las columnas superiores son fijas, mientras que el sistema de apoyo de la pata de la rata es ajustable. Las partes móviles de la máquina se encuentran en el llamado sistema de guillotina, el cual se compone de: carro, varilla, tope y guillotina. Durante la etapa de diseño se ajustaron dimensiones de los componentes del sistema de guillotina para que el peso fuera de 500 g. La caída del sistema de la guillotina desde el punto de reposo, hace que ésta adquiera una velocidad que se incrementa conforme transcurre el tiempo. Al incrementar su velocidad, se incrementa su energía cinética.¹ La energía se calcula mediante la siguiente expresión:

$$E_k = \frac{1}{2} mv^2$$

Donde: Ek es la energía cinética en joules, m es la masa en kg, v es la velocidad m/s. Para el caso de la caída libre, la velocidad al final de la caída se calcula por: $v = gh$ donde: v es la velocidad (m/s), g es la aceleración de la gravedad, 9.81 m/s h es la altura, en m:

Sustituyendo la ecuación:

$$E_k = mgh$$

De acuerdo con la ecuación anterior es claro que la energía es directamente proporcional a la altura, por ello, un incremento en la altura, significará un incremento en la energía cinética en la misma proporción.

Pruebas biomecánicas de las tibias intactas. Se realizaron 22 ensayos de flexión en sentido antero-posterior, en tres puntos, de las tibias de rata. Para ello se empleó la máquina universal de ensayos Instron modelo 4502 con capacidad máxima de 10 kN. El registro de los ensayos se llevó a cabo mediante una computadora personal, con un software Series IX; se empleó una celda de carga de 1 kN (101.9 kg).

Se diseñó y construyó un dispositivo para aplicar carga y para montar en flexión las tibias de rata para su aplicación durante las pruebas. La distancia entre los apoyos fue de 14 mm. La carga se aplica en un punto equidistante de los dos apoyos, sitio donde también coincide la porción media de la tibia. La velocidad de aplicación de la carga fue de 2.5 mm/min. El ensayo se detuvo cuando se presentó la fractura de la tibia.

Se registraron los siguientes datos del ensayo: desplazamiento en el punto de cedencia en mm, carga de cedencia en N; rigidez en N/mm y energía de cedencia en joules. La carga de la ruptura no se registró debido a que su valor fue en todos los casos inferior a la carga de cedencia, adicionalmente a los datos proporcionados por la máquina universal de ensayos, se registraron el peso de cada rata y la longitud de la tibia.

Se compararon 4 tibias fracturadas con su contralateral (*Fig. 1*).

Estudio histológico. Después de la realización de la fractura con el método estandarizado, se sacrificaron las ratas a los 3, 7, 13, 21 y 30 días, se extrajeron las tibias, se disecaron el tejido blando y óseo sometiéndose a fijación con formaldehído al 10%, posteriormente se descalcificaron en HCl al 10%; la sección del área de reparación se preparó 1 cm arriba y abajo del lecho de la fractura (zona normal), con inclusión en parafina, se practicaron cortes longitudinales del tejido óseo y de los tejidos blandos analizando la celularidad del callo óseo, en el periostio y en los tejidos adyacentes, se hizo tinción con hematoxilina-eosina, Masson y retículo.

Estadística. Se empleó la prueba "t" de Student y el ANOVA para comparar estadísticamente los resultados.

Resultados

De las 25 fracturas producidas fueron: 2 fracturas transversales (8%), 22 oblicuas cortas (88%) y 1 multi-

fragmentaria (4%). Se enviaron al laboratorio de biomecánica 22 tibias intactas y 4 tibias fracturadas de 30 días. Las tibias se repartieron en los laboratorios de biomecánica y patología, para ser estudiadas 3, 7, 13, 21 y 30 días después de la fractura.

Laboratorio de bioquímica. En las determinaciones bioquímicas se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en las concentraciones de calcio sérico (Ca+) a los 7, 13, 21 y 30 días, comparados con su control (0 días) del 22 al 38%. En relación con el fósforo (P), también existió un aumento significativo a los 7 y 12 días de 24 y 34% respectivamente. La fosfatasa alcalina aumentó significativamente ($p < 0.01$) en todas las edades comparadas con su control. El sodio (Na+), potasio (K+) en el cloro (Cl) no mostraron cambios con respecto al control (Figs. 2 y 3).

Laboratorio de biomecánica. Las 22 tibias intactas tenían un desplazamiento de cedencia en promedio de $0.3159 \text{ mm} \pm 0.0789 \text{ mm}$. La carga de cedencia en N, tiene como promedio de $103.83 \text{ N} \pm 28.91$. La carga de ruptura (N) en promedio fue de $83.67 \pm 37.97 \text{ N}$.

En cuanto a la rigidez (N/mm), tiene un valor promedio de $439.6 \pm 124.8 \text{ N/mm}$. La energía de cedencia (J) tiene un promedio de $0.0199 \pm 0.0110 \text{ joules}$. El peso de la rata osciló entre 300 y 450 g. La longitud de la tibia medida en (mm) tiene un valor promedio de $43.2 \pm 1.24 \text{ mm}$.

La precarga medida en N tiene un valor promedio de $3.4 \pm 0.37 \text{ N}$.

En las 4 ratas fracturadas de 30 días, comparadas con su contralateral obtuvimos: cedencia de $122.3 \pm 7.45 \text{ (mm)}$ en

la intacta y en la fracturada $107.5 \pm 29.9 \text{ mm}$. En rigidez, las intactas mostraron $503.1 \pm 69.7 \text{ N/mm}$, las tibias fracturadas 347.1 ± 122.7 .

Patología. A los 3 días se encontró celularidad, osteoide escaso y cartílago. Periostio con actividad y diferenciación osteoblástica. Tejido adyacente con inflamación reactiva.

A los 7 días, celularidad con diferenciación osteoblástica, cartilaginosa en el periostio, actividad del tejido adyacente, músculo con fibrosis e hipertrofia de las terminaciones nerviosas sensitivas.

A los 13 días, celularidad osteoide abundante, hueso joven, granulación, osteoclastos abundantes y osteoblastos, cartílago calcificado, periostio laxo adelgazado y vascularizado, tejido adyacente con fibrosis, diferenciación osteoblástica y consolidación en etapa avanzada.

A los 21 días, celularidad, cartílago con calcificación e hiperplasia de osteoblastos; periostio con fibrosis y diferenciación osteoblástica y consolidación en etapa avanzada.

A los 30 días hubo consolidación total.

Discusión

Las nuevas técnicas de biología molecular están disponibles para la investigación de los mecanismos de consolidación ósea, los grupos de estudio se han enfocado a la expresión génica de la colágena y de otras proteínas de la matriz y de factores de crecimiento que participan durante la reparación de las fracturas.

El proceso de consolidación tiene que ver con el transporte de calcio, resorción de tejido conectivo y del metabolismo celular. El hueso y el periostio están inervados por fibras sensoriales y simpáticas que pueden contribuir a la regulación del flujo sanguíneo perióstico y medular.

Las fibras nerviosas proliferan en el callo de la consolidación, cuando se secciona un nervio simultáneamente con la fractura de tibia, se efectúa la consolidación en el día 25. Las fibras nerviosas se encontraron en el periostio, en el

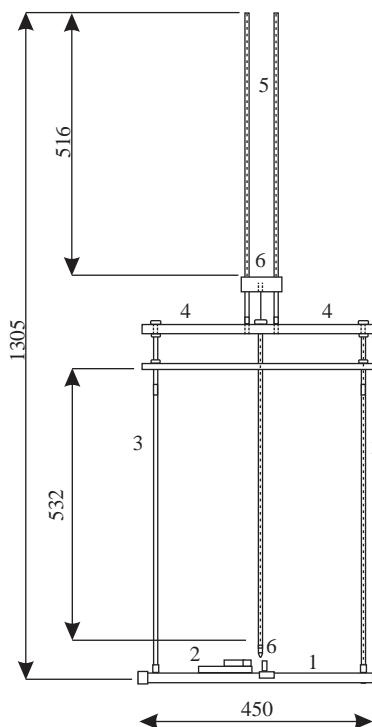


Figura 1. Esquema de fuerzas.

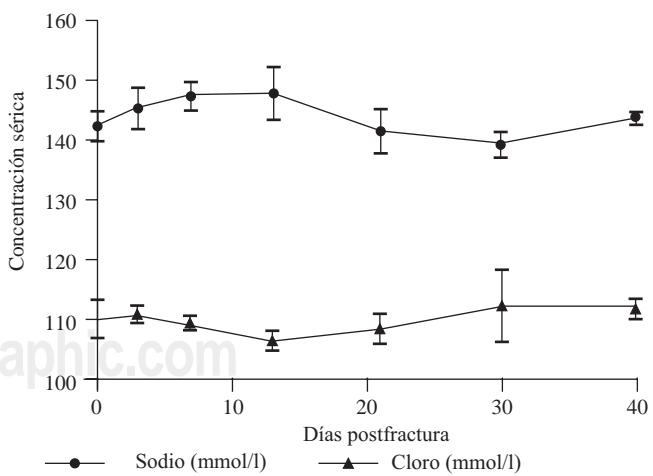


Figura 2. Concentración sérica de sodio y cloro en relación con la evaluación de la fractura.

callo y en el espacio de la médula ósea, la mayoría de las fibras se expresaron en asociación con el crecimiento del hueso. El daño de los tejidos profundos induce la producción de factores de crecimiento que atraen a los nervios y además actúan como factores estimulantes celulares que favorecen el crecimiento del callo.

En nuestro estudio, se evaluaron las tibias de rata que presentaron una lesión calculada al 80% de energía (fracturas oblicuas cortas).

En relación con la máquina, el funcionamiento de la absorción de la energía es directamente proporcional a la altura y significa un incremento en la energía cinética en la misma proporción. Es importante comentar que el diseño contempló el tipo de acero utilizado, el diseño del diámetro y número de los barrenos, el cálculo del peso y de la longitud, tanto de la guillotina como del tope; también se estudió el volumen y densidad de la varilla, carro, guillotina, huecos y el tope, dando así un total en peso (g) de 497.540 g, coincidiendo con la literatura universal en que utilizan un peso de 500 g, para una altura de 40 cm, así es como en los resultados se obtuvieron tibias de trazo de fractura oblicua corta. Es muy interesante que la rigidez del clavo es mayor que la del hueso ya que se presentan cambios de 103.8 N hueso y 63 N en el clavillo. También esta variación se presenta entre las diferentes tibias estudiadas, así, la rigidez osciló entre 233 y 746.4 N/mm con un promedio de 439 N/mm. Un punto de importancia es el desplazamiento de la cedencia que tiene un cálculo numérico en promedio de 0.3159 mm. Es de llamar la atención en el ensayo de las tibias fracturadas de 30 días, que se observó la disminución de la rigidez y cedencia en comparación con su contralateral.

Los cortes histológicos presentan los cambios relacionados con la inducción de formación de callo blando y duro, y el proceso de remodelación.

En el efecto de inflamación tenemos material ostoide y formación de cartílago; al séptimo día se observan osteoblastos e hipertrofia de las terminaciones nerviosas, mientras que en el día 14 existen osteoclastos y osteoblastos abundantes en el cartílago calcificado. El día 21 tiene for-

mas celulares de consolidación avanzada y el día 30 se observa consolidación total.

El aumento de calcio y del fósforo en las ratas durante las etapas de consolidación es interesante y nos hace pensar que a nivel del callo en formación también existe aumento de los mismos. Estos elementos están en equilibrio constante y al variar uno varía el otro. Por otro lado, los días que aumentaron, coincidieron con la descripción histológica de las etapas de consolidación. Es interesante notar que la actividad de la fosfatasa alcalina, permaneció elevada durante todas las etapas medidas, sugiriendo que el proceso de consolidación continúa aún después de formado el callo de la fractura.

Conclusión

Es posible tener un modelo experimental de producción de fracturas y consolidación ósea, que nos permita obtener los datos normales de las variables a estudiar, tomando como punto de referencia este trabajo para marcar otras líneas de investigación.

Bibliografía

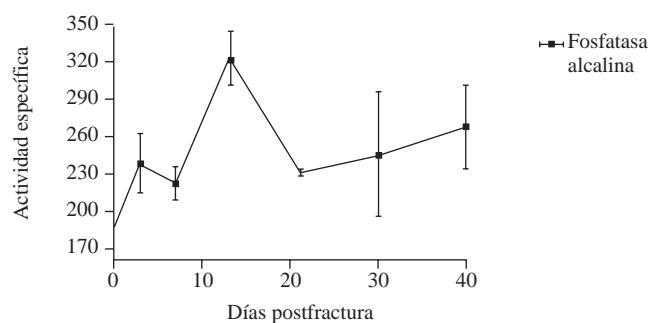


Figura 3. Actividad de la fosfatasa alcalina.

- Altman R. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drug on fractures healing a laboratory study in rats. *J Orthop Trauma* 1995; 9(5): 392-14.
- An Y, Friedman R. Production of standard closed fracture in the rat tibia. *J Orthop Trauma* 1994; 8(2): 111-5.
- Aro H. Healing of experimental fractures in the denervated limbs of the rat. *Clin Orthop Rel Res* 1981; 155: 211-7.
- Ekeland A. Influence of age on mechanical properties of healing fractures and intact bone in rats. *Acta Orthop Scand* 1982; 53: 527-34.
- Goktuk E. Oxigen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1995; 62(2): 163-65.
- Grudnés O. Mechanical effect on function on bone healing. *Acta Orthop Scand* 1991; 62(2): 163-165.
- Grudnés O. The importance of the hematoma for fracture healing. *Acta Orthop* 1994; 66(4): 340-342.
- Grudnés O. The importance of the hematoma for fracture healing. *Acta Orthop Scand* 1993; 66(4): 340-2.
- Grundnes O. Mechanical effect of function on bone healing. *Acta Orthop Scand* 1991; 62(2): 163-5.
- Hiltunen A. A standarized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 1993; 11(2): 305-12.
- Ilizarov. The tension, stress, effect on the genesis and growth of tissues. *Clin Orthop* 1989; 238: 249-281.
- Kirchen M. Effects of sciatic nerve section on neural in growth into the rat tibia fracture callus. *Clin Orthop* 1995; 318: 231-42.
- Kirkeby O. Mechanical and metabolic changes after femoral or tibia injury in rats. *J Orthop Trauma* 1993; 7: 343-7.
- Landry P. Bone injury response. *Clin Orthop Rel Res* 1996; 332: 260-73.
- Nilsson B. Post-fracture growth changes in rats. *Acta Orthop Scand* 1970; 41: 381-386.
- Nordlesten L. Muscle contraction increases in the strength of healing tibia fracture in the rat. *Acta Orthop Scand* 1994; 65(2): 191-194.
- Olmedo M. An experimental rat model allowing controlled delivery of substances to evaluate fractures healing. *J Orthop* 1994; 308: 220-228.
- Utvag S. Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand* 1994; 65(5): 559-563.
- White A. The four biomechanical stages of fracture repair. *J Bone Joint Surg* 1977; 59-A: 188-92.

RESUMEN. Un modelo experimental de fracturas y consolidación ósea, se inicia con el diseño y fabricación de máquina de producción de fracturas estándar. (Brighton y Landry, 1996). *Material y métodos.* Estudiamos 25 ratas Wistar machos de 300-450 g peso, 25 fracturas de tibia, clavo centromedular, evaluamos Na+ K+ Ca+ P fosfatasa alcalina. La resistencia a flexión, carga de cedencia, rigidez, energía absorbida en 22 tibias intactas y 5 fracturadas. Cortes histológicos. *Resultados.* Dos fracturas transversas, 22 oblicuas cortas, 1 multifragmentaria. La resistencia a la flexión: se obtuvo carga de cedencia en el hueso 103.8 ± 28.9 . Observamos incremento de (Ca+ Na+ P K+ fosfatasa alcalina) con un pico aproximado de 15 días. Ratas sacrificadas: 3 días, material osteoide en bordes, granulación mínima, células inflamatorias, 7 días hemorragia, hiperplasia de bordes, osteoblastos, cartílago inmaduro, 13 días tejido óseo, puentes de periostio y endostio, células cartilaginosas inmaduras, hueso nuevo, 21 días consolidación ósea, 30 días consolidación total. *Estadística.* Prueba t Student, ANOVA. *Discusión.* El modelo se ha repetido en 25 ratas, las fracturas al 80% de energía, (trazo transverso y oblicuo corto). La absorción de la energía es mayor en el hueso que en el clavo al momento de realizar la fractura. Los cortes histológicos tienen un proceso normal de crecimiento óseo en las etapas de inducción, formación de callo blando, dureza y remodelación, coincidiendo con el incremento sanguíneo (Na+ Ca+ P K+ fosfatasa alcalina). *Conclusión.* Es posible tener un modelo experimental de producción de fracturas y de consolidación ósea.

Palabras clave: modelo experimental, ratas, osteogénesis, regeneración, hueso.

