

INVESTIGACIÓN

Integración de los aloinjertos óseos impregnados con alendronato

Estudio experimental

LUIS S. RUCHELLI, CHRISTIAN A. ALLENDE, PABLO A. BRUNO, NATALIA GUTIÉRREZ,
JORGE O. FLORES E IGNACIO FERNÁNDEZ SAVOY

*Instituto Allende de Cirugía Reconstructiva de los Miembros,
Sanatorio Allende, Córdoba*

RESUMEN

Introducción: El propósito de este estudio experimental es investigar la variabilidad en la reabsorción ósea de aloinjertos impregnados con alendronato respecto a aloinjertos sin impregnación con alendronato.

Materiales y Métodos: Se utilizaron 18 conejos neozelandeses, divididos en dos grupos de 9 animales cada uno. Se trabajó sobre el fémur derecho, se realizó una ventana ósea y se colocó aloinjerto con alendronato local en el grupo I y aloinjerto sin alendronato en el grupo II. Todos fueron sacrificados a las 10 semanas del procedimiento inicial, y se valoró el fémur operado con anatomía patológica, radiografías de frente y de perfil, y tomografía axial computarizada. Se evaluaron la osteointegración, la vascularización y la calidad ósea.

Resultados: El estudio histológico demostró mayor osteointegración en el grupo I que en el grupo II ($p = 0,003$), y fenómenos bien definidos de "acoplamiento" entre el tejido óseo receptor e injertado, leve actividad osteoclástica. En el grupo II, se observó menor acoplamiento óseo (osteointegración). La evaluación de la reabsorción ósea con radiografía y tomografía computarizada no reveló una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. En el grupo I, se observó mayor osteointegración del aloinjerto ($p = 0,577$; no significativo).

Conclusión: Los resultados obtenidos en este trabajo experimental muestran que el alendronato local asociado a aloinjertos ayuda a mejorar la osteointegración de los aloinjertos, que es un método seguro, y que no se asocia

a riesgos locales o sistémicos en conejos, aun en dosis elevadas.

PALABRAS CLAVE: Alendronato. Aloinjertos. Osteointegración. Bisfosfonatos.

ALENDRONATE-IMPREGNATED BONE ALLOGRAFT INTEGRATION. EXPERIMENTAL STUDY

ABSTRACT

Background: The use of allografts in bone reconstruction may be associated with an increased absorption of the latter, which may cause loss of stability and failure of reconstructions. The purpose of this experimental study was to investigate the variability in bone resorption in alendronate-impregnated allografts versus non-impregnated allografts.

Methods: Eighteen New Zealand rabbits were divided into two groups of nine animals each. We worked on the right femur; a bone window was performed and allografts were placed (with alendronate in group I and without alendronate in group II). All rabbits were sacrificed at 10 weeks after the initial procedure. Femur was evaluated with pathology, frontal and lateral radiographs and computed tomography. Osteointegration, vascularization and bone quality were evaluated.

Results: No deaths or infections were reported, with 18 rabbits up to final analysis. Histology showed better osteointegration in group I than group II ($p = 0.003$), with well-defined attachment between receptor bone tissue and low osteoclastic activity. In group II, we observed less osteointegration. Assessment of bone resorption with radiographs and computed tomography showed no statistically significant difference between both groups. Group I showed more osteointegration of the allograft ($p = 0.577$; not significant).

Recibido el 2-4-2014. Aceptado luego de la evaluación el 2-7-2014.

Correspondencia:

Dr. LUIS S. RUCHELLI
luisruchelli@gmail.com

Conclusions: Results of this experimental study show that allografts impregnated with alendronate help to improve the osteointegration. Also, it is a safe way and it is not associated with local or systemic risks in rabbits, even with high doses of alendronate.

KEY WORDS: Alendronate. Allograft. Osteointegration. Bisphosphonates.

Introducción

El aloinjerto se utiliza, con frecuencia, en revisiones protésicas, artrodesis lumbares y reconstrucciones tumorales. Sus ventajas son: elevada disponibilidad, ausencia de morbilidad de la zona dadora, menor tiempo quirúrgico, menos sangrado y capacidad de reconstrucción de grandes defectos. Algunas de sus desventajas son tiempos de incorporación más prolongados, posibilidad de transmitir enfermedades, tasa de infección más alta y menor capacidad osteoconductiva y osteoinductiva comparada con el autoinjerto.¹⁻³ Un problema relacionado con el uso de aloinjertos óseos es la posibilidad de una reabsorción demasiado rápida, la cual puede causar pérdida de estabilidad y fracaso de la reconstrucción.⁴

Los bifosfonatos tienen una alta afinidad por Ca^{2+} , están dirigidos a áreas de alto recambio óseo, se adhieren, en forma selectiva, a los sitios activos de remodelación ósea, y se internalizan en el osteoclasto, dando lugar a su apoptosis.⁵ Aunque los bifosfonatos suprimen eficientemente la reabsorción ósea mediante la apoptosis de los osteoclastos, el tratamiento sistémico sólo llegará a áreas vascularizadas, y la concentración de los bifosfonatos en las regiones del esqueleto con escasa perfusión arterial sería muy baja.^{6,7} Son pocos los reportes publicados sobre el uso de la asociación de aloinjertos óseos y autoinjertos óseos combinados con bifosfonatos locales,^{5,7,8} el uso de esta combinación en la práctica quirúrgica no es habitual, y se necesita más investigación para determinar su verdadera eficacia, los riesgos y las indicaciones.⁷

La hipótesis de este trabajo experimental es que la asociación local de bifosfonatos al aloinjerto disminuiría su reabsorción y promovería una remineralización ósea más rápida y efectiva. El propósito de este estudio es investigar la variabilidad en la reabsorción ósea de aloinjertos impregnados con alendronato respecto a aloinjertos sin impregnación con alendronato.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 18 conejos neozelandeses adultos, de sexo indeterminado, con un peso promedio de 3 kg (rango de 2700 a 3200). Los conejos fueron divididos en dos grupos de nueve animales cada uno (Tabla 1). Siempre se trabajó sobre el fémur derecho. Se realizó una ventana ósea y se colocó aloinjerto con

Tabla 1. Grupos de conejos

Grupo	Tratamiento
I	Aloinjerto óseo más alendronato
II	Aloinjerto óseo sin alendronato

alendronato local en el grupo I y aloinjerto sin alendronato en el grupo II. El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo en el laboratorio de cirugía experimental de la Universidad Católica de Córdoba.

Los conejos fueron evaluados en el preoperatorio para descartar enfermedades o malformaciones, habitaron en jaulas individuales a una temperatura ambiente de 22-25°C y fueron alimentados con comida balanceada para conejos (150-200 g/día y con agua a demanda). La inducción anestésica se realizó con ketamina intramuscular (1 mg/kg de peso) y diazepam intramuscular (3-5 mg/kg de peso). La asepsia de la piel se realizó con yodopovidona. Antes de la cirugía, los animales estuvieron en ayuno de alimentos y de hidratación por 8 y 2 horas, respectivamente. Se utilizó aloinjerto óseo obtenido de la ablación de dos conejos de la misma raza, el cual fue almacenado en un banco de tejidos a -40°C durante 14 días, con todas las normas de asepsia y anti-sepsia correspondientes. En los dos grupos, se administró cefalomicina 1 mg/kg intramuscular, una dosis antes de la cirugía y otra posquirúrgica. En todos los conejos, se efectuó un abordaje lateral longitudinal al eje del fémur, para luego hacer una ventana ósea de aproximadamente 5 x 3 mm (Fig. 1). En el mismo acto quirúrgico, se colocó aloinjerto molido con el agregado de alendronato en el grupo I, y aloinjerto molido sin alendronato al grupo II. A los conejos se les permitió el movimiento dentro de las jaulas, sin restricciones de carga de peso en el miembro intervenido. Antes de colocarlo el aloinjerto fue molido en chips de 1 mm. La solución de alendronato se preparó disolviendo tres comprimidos de alendronato de 70 mg en 30 ml de solución salina estéril, luego, se realizó la mezcla con el aloinjerto dejando reposar la preparación por una hora; antes de colocarla, se coló el preparado para retirar la solución salina (Fig. 2).

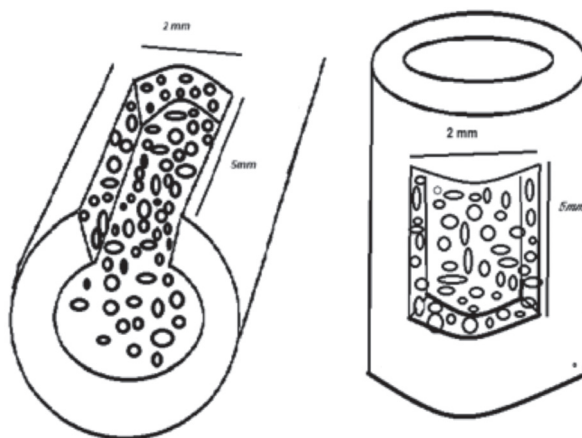


Figura 1. Ventana ósea en fémur.

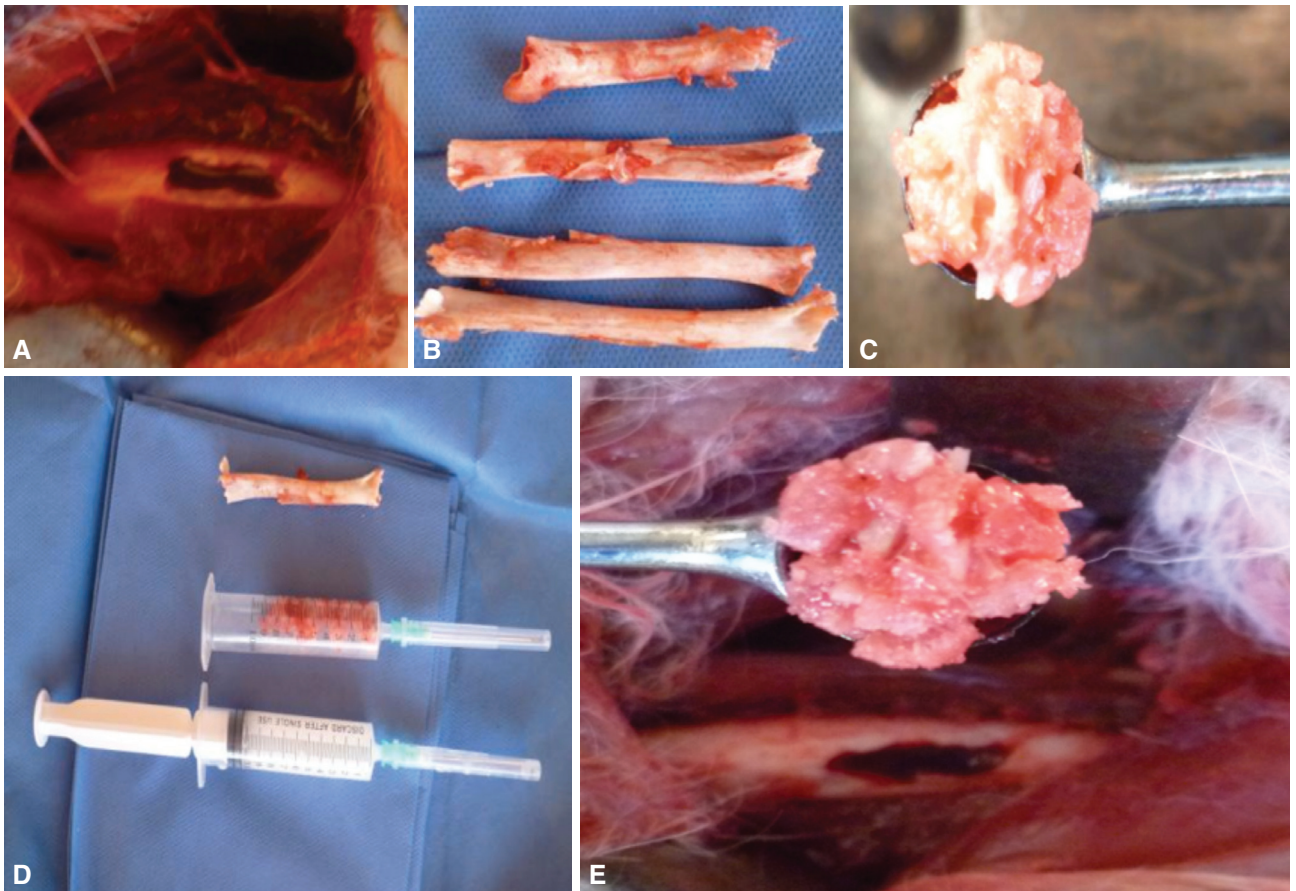


Figura 2. A. Ventana ósea en fémur de conejo. B. Huesos largos para aloinjerto óseo. C. Aloinjerto óseo. D. Preparación de injerto óseo más alendronato. E. Colocación del injerto en sitio receptor.

Todos los conejos fueron sacrificados a las 10 semanas del procedimiento inicial, no murió ningún ejemplar, y no se observaron infecciones; el análisis final incluyó 18 conejos. Se valoró el fémur operado mediante anatomía patológica, radiografías de frente y de perfil, y tomografía axial computarizada, en las que se evaluó la osteointegración, la vascularización y la calidad ósea. En la evaluación con tomografía axial computarizada, se consideró que hubo integración ósea cuando se detectó continuidad entre el tejido injertado y el tejido receptor. La reabsorción del tejido injertado fue expresada en cruces, según la cantidad de hueso remanente en las imágenes tomográficas; representamos con tres cruces a las muestras que no sufrieron disminución de la imagen y con cero cruces a los casos en que había reabsorción completa del aloinjerto; colocamos una y dos cruces cuando había mayor y menor reabsorción parcial del aloinjerto, respectivamente.

A los fines de la evaluación histológica, los cortes de los especímenes fueron obtenidos seccionando a través del punto medio del defecto y, luego, incluidos en parafina. Se realizaron múltiples cortes de 6 mm de espesor con micrótopo y se los tiñó con hematoxilina eosina para microscopía de luz convencional. Se evaluaron los siguientes cambios: A) osteointegración, B) formación de callo óseo, C) reabsorción de tejido óseo injertado, D) vascularización/angiogénesis, E) fibrosis con proliferación fibroblástica y F) presencia de exudado fibrinoleucocitario/infiltrado mononuclear con predominio plasmocelular.

Para el análisis estadístico, los datos fueron analizados con el programa MedCalc, versión demo. La comparación de los puntajes entre los grupos se realizó con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. La comparación de proporciones se efectuó con la prueba binomial. Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$.

Resultados

El estudio histológico, conformado por nueve muestras provenientes de tejido óseo de fémur con injerto óseo más alendronato local (grupo I) y nueve muestras sin alendronato (grupo II), mostró, en el primer grupo, a nivel del injerto óseo, fenómenos bien definidos de “acoplamiento” entre el tejido óseo receptor e injertado como manifestación de osteointegración en comparación con el grupo II ($p = 0,003$), leve actividad osteoclástica (reabsorción), una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,003$); moderada osificación endocondral (elemento formador de callo óseo) ($p = 0,003$), angiogénesis moderada, leve fibrosis con proliferación fibroblástica y exudado fibrinoleucocitario moderado ($p = 0,701$; no estadísticamente significativa); en el grupo II, hubo menor acoplamiento óseo (osteointegración), de moderada a intensa actividad

osteoclástica (reabsorción), leve formación del callo óseo, leve fibrosis, proliferación fibroblástica y exudado fibrinoleucocitario ausente o leve (Tablas 2-4).

La evaluación de la reabsorción ósea con radiografías y tomografía computarizada no evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p = 0,09$) (Tabla 5; Fig. 3). En el grupo I, se produjeron tres fracturas en el sitio donde se realizó la ventana ósea y el posterior implante del aloinjerto, ninguna de ellas mostró consolidación tomográfica a las 10 semanas; en el grupo II, se presentaron tres fracturas de iguales características, con consolidación en solo una de ellas. En las imágenes tomográficas y radiográficas del grupo I, se observó que ocho de nueve conejos tenían osteointegración del aloinjerto, mientras que, en el grupo II, seis ejemplares tenían osteointegración del aloinjerto ($p = 0,577$; no significativo) (Tablas 6 y 7; Fig. 4).

Tabla 2. Resultados estadísticos de anatomía patológica

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
A	3 (2-3)	1 (1-2)	<0,003
B	2 (2-3)	1 (1-2)	<0,003
C	1 (0-1)	3 (2-3)	<0,0001
D	3 (2-3)	2 (1-2)	<0,04
E	1 (1-1)	1 (1-2)	0,701
F	2 (2-3)	1 (0-1)	<0,001

A = osteointegración; B = formación de callo óseo; C = reabsorción del injerto óseo; D = vascularización/angiogénesis; E = fibrosis con proliferación fibroblástica; F = exudado fibroeuocitario/ infiltrado inflamatorio mononuclear a predominio plasmocelular.

Tabla 3. Resultados histológicos o morfológicos de anatomía patológica (grupo I)

Grupo I	A	B	C	D	E	F
C1	+++	++	+	+++	++	+
C2	+++	++	+	+++	++	+
C3	++	++	+	++	++	+
C4	+++	+++	0	+++	+++	0
C5	+++	++	+	+++	++	+
C6	+++	++	0	+++	++	0
C7	++	+++	0	++	+++	0
C8	++	++	+	++	++	+
C9	++	+++	+	++	+++	+

A = osteointegración; B = formación de callo óseo; C = reabsorción del injerto óseo; D = vascularización/angiogénesis; E = fibrosis con proliferación fibroblástica; F = exudado fibroeuocitario/ infiltrado inflamatorio mononuclear a predominio plasmocelular. Valores: 0 = ausente; + = leve; ++ = moderado; +++ = intenso.

Discusión

El empleo de aloinjertos óseos es un método eficaz para reemplazar defectos óseos en cirugías ortopédicas, como reconstrucciones tumorales y recambios protésicos. Uno de los problemas del uso de aloinjertos es el tiempo que lleva hasta que el lecho óseo receptor incorpore totalmente al aloinjerto, y normalmente un elevado porcentaje del hueso injertado es reabsorbido antes de ser incorporado por el receptor. Por ende, la reabsorción y la falla mecánica son una constante amenaza para los aloinjertos. Con el objetivo de mejorar la sustitución de los aloinjertos óseos por hueso receptor, se ha evaluado la adición de factores de crecimiento, como la proteína osteogénica 1 (OP-1),⁹ con resultados variables; se mostró que el factor de crecimiento estimula más la reabsorción ósea que su formación en etapas tempranas.¹⁰

En este trabajo experimental, planteamos la hipótesis de que la aplicación local de los bifosfonatos al aloinjerto disminuiría su reabsorción, y que esto ayudaría a incrementar la estabilidad de las construcciones en las que se usan aloinjertos, y permitiría una más rápida fijación de los implantes protésicos. Los resultados histológicos mostraron que el grupo de conejos en el que se rellenó el defecto óseo con aloinjerto impregnado con alendronato tuvo mayor osteointegración, expresada por el mayor acoplamiento entre el tejido óseo receptor y el injertado; a su vez, este grupo tuvo menor actividad osteoclástica.

En los resultados radiográficos, aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa, ocho de los nueve ejemplares con alendronato local tuvieron osteointegración del aloinjerto, mientras que esto ocurrió en seis casos del grupo II sin alendronato local.

Tabla 4. Resultados histológicos o morfológicos de anatomía patológica (grupo II)

Grupo 2	A	B	C	D	E	F
C1	++	++	+++	+	+	0
C2	+	+	++	++	+	0
C3	++	++	+++	++	+	+
C4	++	+	++	+	++	+
C5	+	+	++	+	++	0
C6	+	+	+++	++	+	+
C7	+	+	+++	++	+	+
C8	+	+	+++	++	+	+
C9	+	+	+++	+	+	+

A = osteointegración; B = formación de callo óseo; C = reabsorción del injerto óseo; D = vascularización/angiogénesis; E = fibrosis con proliferación fibroblástica; F = exudado fibroeuocitario/ infiltrado inflamatorio mononuclear a predominio plasmocelular. Valores: 0 = ausente; + = leve; ++ = moderado; +++ = intenso.

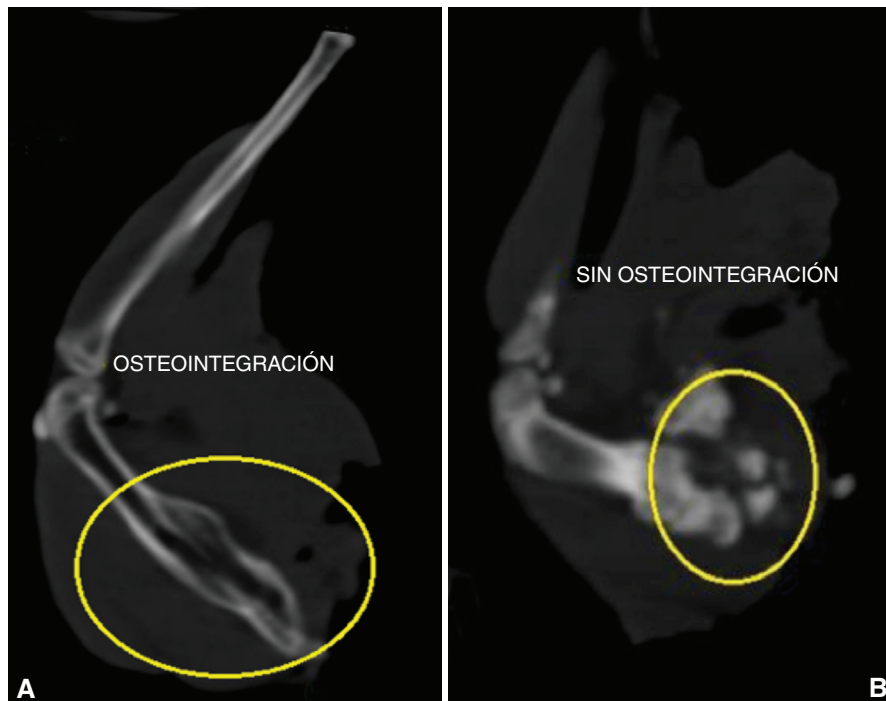


Figura 3. Tomografía computarizada. **A.** Osteointegración del injerto óseo. **B.** No se observa integración del injerto.

Tabla 5. Resultados estadísticos (radiografías y tomografías)

	Grupo I	Grupo II	p
Reabsorción ósea	2 (1-3)	1 (0-3)	0,09
Osteointegración (Sí)	8 (89%)	6 (67%)	0,577

Los bifosfonatos pueden bloquear efectivamente la reabsorción del hueso y reducir la reabsorción de los injertos óseos mediante la inhibición de los osteoclastos,¹¹ pero el tratamiento sistémico con bifosfonatos solo puede alcanzar las áreas revascularizadas de los injertos óseos; más aun, para bloquear la reabsorción ósea “patológica”, como ocurre con los aloinjertos, se necesitarían dosis locales más elevadas que para otras indicaciones,⁵ lo cual es difícil de obtener con tratamientos sistémicos; este problema podría solucionarse si el aloinjerto pudiera ser impregnado con alendronato antes de implantarlo, y así, al ser colocado en el lecho receptor, se inhiba su reabsorción por los osteoclastos. Además del impacto en los osteoclastos, el alendronato aumenta la proliferación y maduración de los osteoblastos e inhibe su apoptosis.¹² En nuestro trabajo, su uso en conejos no se asoció a riesgos locales ni sistémicos, y permitió obtener mejor integración del aloinjerto.

Aspenberg y Astrand⁵ demostraron que el tratamiento con bifosfonatos locales puede proteger el injerto de la

reabsorción ósea durante el período posoperatorio temprano. Nina y cols.¹³ comunicaron que, a mayor dosis de alendronato, obtuvieron una disminución significativa de la reabsorción ósea en el aloinjerto, con una dosis óptima de alendronato de 1 mg/ml. En nuestra muestra, se lograron resultados similares con dosis alta de alendronato local. Von Knoch y cols.¹² reportaron una declinación en la cantidad de tejido óseo nuevo con dosis altas de alendronato en comparación con los grupos de dosis inferiores, esto podría explicarse por la toxicidad de los bifosfonatos en dosis alta para los osteoblastos. Baas y cols.¹⁴ no fueron capaces de cambiar este equilibrio entre la formación ósea y la resorción ósea; el bifosfonato prácticamente bloqueó el metabolismo óseo en su estudio. Jakobsen y cols.¹⁵ detectaron una disminución de la fijación del implante cuando el aloinjerto se había asociado a bifosfonatos. En nuestro grupo con alendronato, no se observó ningún efecto tóxico, pese a las altas dosis y considerando que solo se retiró el suero de la mezcla en la que se embebió al aloinjerto, sin lavado para retirar excedentes de alendronato, como se comunica en otros estudios.

Conclusiones

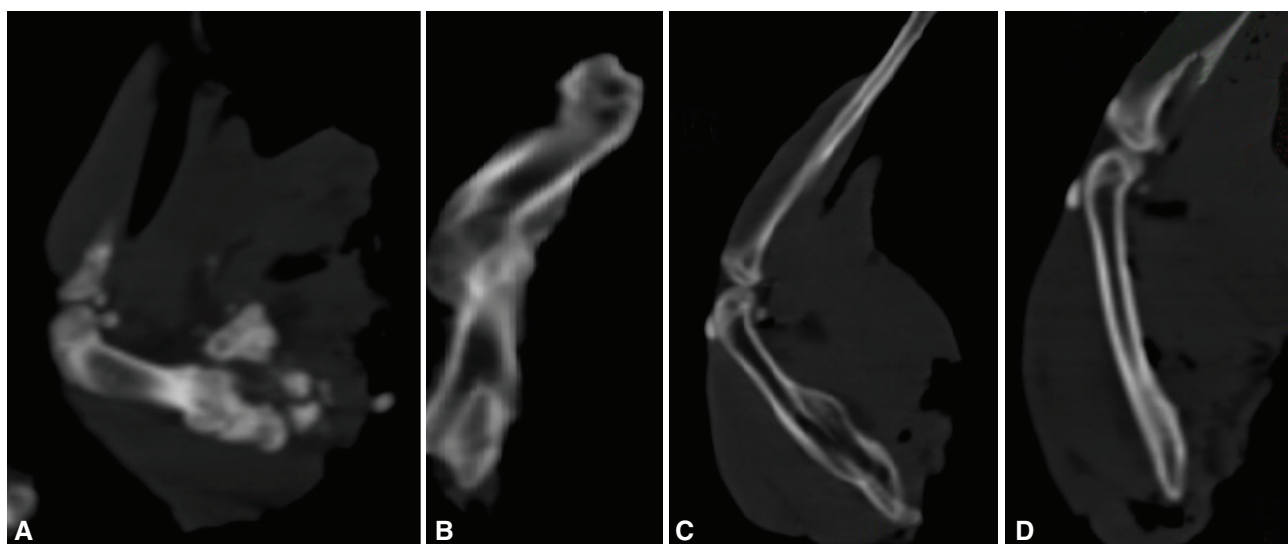
Los resultados de este trabajo experimental muestran que el alendronato local asociado a aloinjertos ayuda a mejorar la osteointegración de los aloinjertos, que es un método seguro, y que no se asocia a riesgos locales o sistémicos en conejos, aun en dosis elevadas.

Tabla 6. Resultados tomográficos y radiográficos (Grupo I)

Grupo I	Reabsorción ósea	Osteointegración
1	++	Sí
2	+	Sí
3	+++	No
4	+++	Sí
5	++	Sí
6	++	Sí
7	++	Sí
8	++	Sí
9	++	Sí

Tabla 7. Resultados tomográficos y radiográficos (Grupo II)

Grupo II	Reabsorción ósea	Osteointegración
1	++	Sí
2	++	Sí
3	-	No
4	+	Sí
5	+	Sí
6	+++	Sí
7	-	No
8	++	Sí
9	+	No

**Figura 4.** Tomografía computarizada. **A.** No hubo reabsorción; **B.** Reabsorción leve. **C.** Reabsorción moderada. **D.** Reabsorción intensa del injerto óseo.

Bibliografía

1. **Gazdag A, Lane J, Glaser D, Forster R.** Alternatives to autogenous bone graft. *J Am Acad Orthop Surg* 1995;3:1-8.
2. **Arbour SA.** The safe and effective use of allograft tissue—An update. *Am J Sports Med* 2003;31:791-7.
3. **Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW.** Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res* 1996;324:86-97.
4. **Ganz R, Perren SM, Ruter A.** Mechanical induction of bone resorption. *Fortschr Kiefer Gesichtschir* 1975;19:45-8.
5. **Aspenberg P, Astrand J.** Bone allografts pretreated with a bisphosphonate are not resorbed. *Acta Orthop Scand* 2002;73(1):20-3. doi: 10.1080/000164702317281350.
6. **Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC.** Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000;88(12 Suppl):2961-78.
7. **Kesteris U, Aspenberg P.** Rinsing morcellised bone grafts with bisphosphonate solution prevents their resorption. A prospective randomised double-blinded study. *J Bone Joint Surg Br* 2006;88(8):993-6.

8. **Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K.** Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Arch Oral Biol* 2012;57:1545-50.
9. **Tagil M, Jeppson C, Aspenberg P.** Bone graft incorporation: effects of osteogenicprotein-1 and impaction. *Clin Orthop* 2000;371:240-5.
10. **Laursen M, Hoy K, Hansen ES, Gelineck J, Christensen FB, Bünger CE.** Recombinant bone morphogenetic protein-7 as an intracorporeal bone growth stimulator in unstable thoracolumbar burst fractures in humans: preliminary results. *Eur Spine J* 1999;8:485-90.
11. **Stadelmann VA, Gauthier O, Terrier A, Bouler JM, Pioletti DP.** Implants delivering bisphosphonate locally increase periprosthetic bone density in an osteoporotic sheep model. A pilot study. *Eur Cell Mater* 2008;16:10-6.
12. **Von Knoch F, Jaquiery C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, et al.** Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005;26:6941-9.
13. **Mathijssen NM, Hannink G, Pilot P, Schreurs BW, Bloem RM, Buma P.** Impregnation of bone chips with alendronate and cefazolin, combined with demineralized bone matrix: a bone chamber study in goats. *BMC Musculoskelet Disord* 2012;13:44.
14. **Baas J, Elmengaard B, Jensen TB, Jakobsen T, Andersen NT, Soballe K.** The effect of pretreating morselized allograft bone with rhBMP-2 and/or pamidronate on the fixation of porous Ti and HA-coated implants. *Biomaterials* 2008;29(19):2915-22.
15. **Jakobsen T, Baas J, Bechtold JE, Elmengaard B, Soballe K.** Soaking morselized allograft in bisphosphonate can impair implant fixation. *Clin Orthop Relat Res* 2007;463:195-201.