

INVESTIGACIÓN

# Modelo experimental de pseudoartrosis en roedores

## Estudio biológico de su fisiopatología

ALDO ILLARRAMENDI, CECILIA PASCUAL GARRIDO, PABLO DE CARLI y MARÍA G. SANTINI ARAUJO

*Hospital Italiano, Buenos Aires*

### RESUMEN

**Introducción:** Durante la última década se han creado diferentes técnicas y modelos para estudiar la osteogénesis y la reparación ósea. Éstos se desarrollan a partir de grandes defectos óseos, lo cual no reproduce los mecanismos clínicos-biológicos in vivo. Considerando el efecto biológico del periostio en la consolidación, se ha desarrollado un nuevo modelo experimental de pseudoartrosis en roedores.

**Materiales y métodos:** Cuarenta ratas Wistar fueron intervenidas y agrupadas de manera aleatoria en dos grupos (con cauterización del periostio y sin ella). Se realizaron controles radiográficos e histológicos para constatar la aparición de pseudoartrosis. Para evaluar el efecto biológico del periostio se observó la expresión del VEGF (*vascular endothelial growth factor*) por inmunohistoquímica en ambos grupos.

**Resultados:** Se observó pseudoartrosis en el grupo en el que se había cauterizado el periostio y consolidación en el grupo que no había sido sometido a ese procedimiento. Asimismo, se constató la falta de expresión del VEGF en el grupo en que se había desarrollado la pseudoartrosis en contraposición con el grupo en que se generó una consolidación ósea.

**Conclusiones:** Consideramos que hemos desarrollado un nuevo modelo experimental de pseudoartrosis en roedores, así como demostrado a través de la expresión del VEGF el efecto biológico del periostio en la consolidación ósea.

**PALABRAS CLAVE: Pseudoartrosis. Periostio. VEGF.**

**RODENT MODEL OF PSEUDOARTHROSIS. BIOLOGICAL**

Recibido el 1-12-2004. Aceptado luego de la evaluación el 13-12-2004.

Correspondencia:

Dr. ALDO ILLARRAMENDI

Potosí 4215

(1181) Buenos Aires

Tel./Fax: 4981-9933

cecilia.pascualgarrido@hospitalitaliano.org.ar

Subvención recibida por Ferrosider S.A.

### STUDY OF ITS PATHOPHYSIOLOGY

#### ABSTRACT

**Background:** Clinical and experimental studies have highlighted the importance of preserving the periostium during fracture healing. Therefore we thought of a periostium disruption associated with a standard fracture to induce pseudoarthrosis that reproduces the biological condition in which this develops. This study aimed at developing a pseudoarthrosis model that better simulates the clinical situation using a standard osteotomy fracture with periostium disruption.

**Methods:** 40 Wistar rats were used, randomly divided in two groups (with and without periostium cauterization). Fracture healing was assessed with radiographs and histology. To assess the biological effect, VEGF expression was evaluated in both groups.

**Results:** Pseudoarthrosis developed in those receiving periostium electrocauterization; furthermore VEGF was low in this group. The study showed a difference between the experimental design of pseudoarthrosis with osteotomy alone, or with periostium cauterization.

**Conclusions:** We believe that cauterization has a negative effect on healing probably because of the effect on killing stem cells which are generally found in high concentrations in the periostium and secondly because of decreased bone vascularization at the fracture site. In conclusion, we believe this is an animal model easily and highly reproducible, to induce pseudoarthrosis.

**KEY WORDS: Pseudoarthrosis. Periostium. VEGF.**

---

La consolidación ósea es un proceso complejo activo en el cual es necesaria la coordinación de múltiples tipos celulares, factores de crecimiento y diferentes proteínas para lograr un ambiente que favorece el proceso de osificación.<sup>6</sup>

Sin embargo, hay diferentes situaciones clínicas y ex-

perimentales en que esta osificación está limitada, lo que lleva a retardos de consolidación, no uniones y pseudoartrosis.<sup>7</sup>

Durante la última década se han creado diversas técnicas y modelos para estudiar la osteogénesis y la reparación ósea que permitieron acercarse al entendimiento de la fisiopatología por la cual una fractura falla en el proceso de consolidación. No obstante, la posibilidad de desarrollar modelos experimentales que reproduzcan el mecanismo biológico que produce la pseudoartrosis sigue constituyendo un desafío. Se han publicado modelos experimentales de pseudoartrosis desarrollados a partir de la generación de grandes defectos óseos,<sup>2</sup> pero no reproducen de manera adecuada la situación clínica-biológica en la que se genera la afección.

La regulación de la generación del callo óseo durante la reparación fracturaria es coordinada por estímulos biológicos y mecánicos. Los factores de crecimiento actúan estimulando la proliferación y diferenciación celular. Existe una amplia variedad de factores publicados hasta la actualidad. El VEGF (*vascular endothelial growth factor*) es producido durante el proceso de consolidación ósea, responsable de la angiogénesis fundamental para todo proceso de consolidación.<sup>3</sup> Por lo tanto, consideramos que en el proceso de pseudoartrosis existe probablemente un déficit de este factor que determina una disminución en el proceso de angiogénesis.

Para poder estudiar el mecanismo fisiopatológico de la pseudoartrosis es necesario desarrollar un modelo experimental que reproduzca el proceso biológico de pseudoartrosis generada a partir de la alteración de la biología ósea.

El propósito de los siguientes experimentos fue lograr un modelo de pseudoartrosis en roedores adecuado, reproducible y fácil. También comprender la fisiopatología de esta enfermedad tratando de corroborar la hipótesis sobre la disminución de los factores de crecimiento angiogénicos (VEGF) en esta patología.

## Materiales y métodos

### 1. Ratas

Se utilizaron en total 40 ratas Wistar de 10 semanas (8-14 semanas) con un peso aproximado de 330 gramos, que fueron mantenidas en jaulas independientes. Todos los procedimientos se realizaron con anestesia general utilizando ketamina 80 g/kg y xilacina (8 mg/kg) administrada en forma intraperitoneal. Se inyectó tetraciclina (30 mg/kg) por vía intramuscular antes de la intervención.

### 2. Diseño experimental

Se dividió a las ratas de manera aleatoria en dos grupos de 16 ratas cada uno.

*Grupo 1: (cauterización del periostio)*

N: 16 ratas

Se realizó una incisión lateral a lo largo del fémur proximal. Se incidió longitudinalmente el músculo cuadriceps para abordar el fémur y se efectuó una osteotomía transversal en la zona medio-diafisaria del fémur derecho. Se cauterizó el periostio 2 mm proximal y 2 mm distal del trazo fracturario y se realizó la estabilización con una clavija de Kirschner de 1,25 mm, colocada de manera anterógrada a través del trocánter mayor en el canal femoral y se progresaba hasta observar su salida en la zona del extremo

**Tabla 1.**

Clasificación	
<b>Callo perióstico</b>	
X:	No visible
XX:	Visible
XXX:	Remodelado
<b>Cierre de osteotomía</b>	
X:	Osteotomía visible
XX:	Parcialmente visible
XXX:	No visible

Considerando la clasificación de Allen se evaluó en todos los grupos la presencia de callo perióstico y cierre de la osteotomía utilizando un sistema de cruces, en placa mamográfica en proyecciones de frente y perfil de fémur.

**Tabla 2.** Resultados radiológicos con cauterización del periostio.

Grupo 1	Callo perióstico	Cierre de osteotomía
1 (N:4)	N4: X	N4:X
2 (N:4)	N4: X	N4:X
3 (N:4)	N3: X N 1: XX	N4:X
4 (N:4)	N3: X N1: XXX	N4:X

En el grupo en que se había lesionado el periostio, no se obtuvo consolidación constatándose por la falta de cierre de osteotomía y la presencia de hendidura.

**Tabla 3.** Resultados radiológicos sin cauterización del periostio.

Grupo 2	Callo perióstico	Cierre de osteotomía
1 (N:4)	N4: X	N4: X
2 (N:4)	N4: XX	N3: X N1: XX
3 (N:4)	N3: XXX N 1: XX	N3: XX N1: X
4 (N:4)	N4: XXX	N4: XXX

Se constató la consolidación presentado callo perióstico y cierre de osteotomía.

distal del fémur sin llegar a la cavidad articular de la rodilla.

Se efectuaba el cierre por planos y el animal deambulaba libremente en la jaula.

El fémur izquierdo se utilizó como control.

*Grupo 2: (sin cauterización del periostio)*

N: 16 ratas

Para corroborar la función del periostio en la consolidación ósea se realizó el mismo procedimiento pero sin la cauterización del periostio.

### 3. Evaluación

Se agrupó a las ratas de manera aleatoria en cuatro subgrupos de acuerdo con la semana en que se realizaría el sacrificio. Se efectuó un control radiológico semanal durante un mes utilizando el puntaje de Allen para evaluar la presencia de callo perióstico y el cierre de la osteotomía<sup>4</sup> (Tabla 1) y mediante histología para determinar el tipo de tejido predominante (tejido tipo 1: hendidura; tipo 2: fibroso puro; tipo 3: fibroso con áreas cartilagosas y tipo 4: fibroso con áreas de calcificación). Se evaluó mediante inmunohistoquímica la expresión del VEGF (c-1 Santa Cruz).

## Resultados

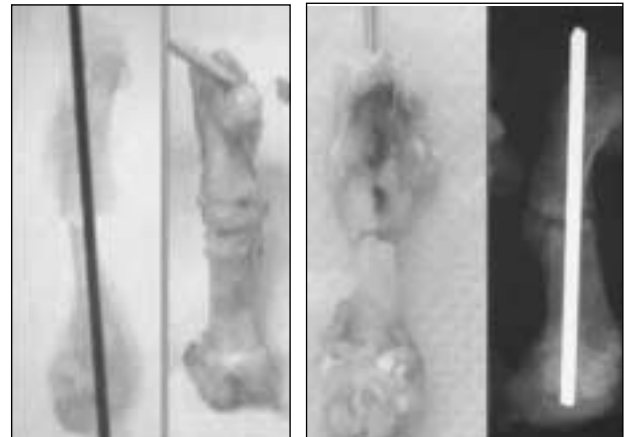
De las 40 ratas intervenidas, 8 presentaron complicaciones, por lo que fueron retiradas del experimento. Los resultados observados fueron diferentes según el grupo por estudiar. Los animales en los que se había realizado la cauterización del periostio presentaron pseudoartrosis al cabo de las 4 semanas. Esta se constató macroscópica, radiológica e histológicamente (según el sistema de clasificación utilizado). En los que no se había realizado la cauterización se observó la consolidación en 15 ratas, observándose el callo perióstico y el cierre de la osteotomía (Tablas 1, 2 y 3).

Se constató macroscópica y radiológicamente la falta de consolidación en el sitio donde se realizó la osteotomía. Presentaban una pseudoartrosis de características atróficas (Figs. 1 y 2).

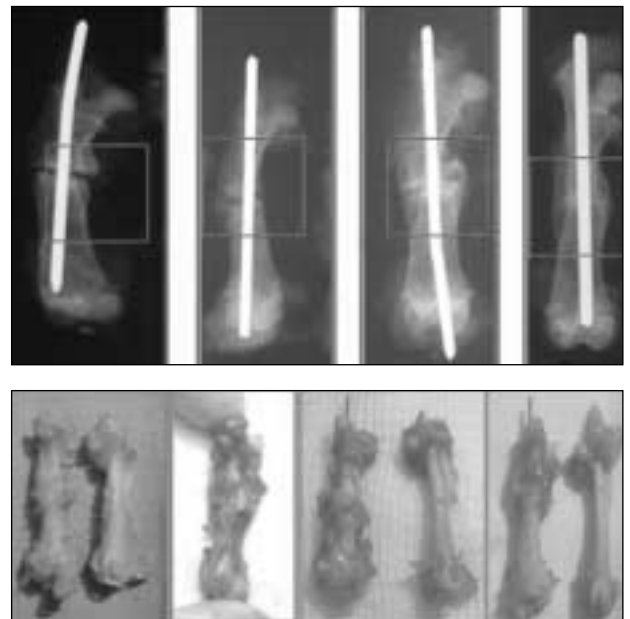
Histológicamente se constató el desarrollo de pseudoartrosis en el grupo en el que se realizó la cauterización del periostio con un tejido predominantemente fibrótico. En los animales en los que no se había realizado la cauterización del periostio se observó gran actividad osteogénica con zonas de osificación endocondral y intramembranosa (Tablas 4, 5 y 6 y Fig. 3).

### Expresión del VEGF

Las células al presentar una concentración de VEGF toman una tinción marrón secundaria a la reacción de peroxidasa. El grado de actividad osteoblástica estaba íntimamente relacionado con la cantidad de marcación que observamos.



**Figura 1.** Se constata al cabo de 4 semanas el desarrollo de pseudoartrosis, macroscópica y radiográficamente.



**Figura 2.** Se constata la evolución a la consolidación en el grupo en el que no se cauterizó el periostio.

**Tabla 4.** Clasificación para evaluar la presencia de pseudoartrosis mediante la tinción con hematoxilina y eosina

Tejido tipo 1: hendidura
Tejido tipo 2: tejido fibroso puro
Tejido tipo 3: tejido fibroso con áreas cartilagosas
Tejido tipo 4: tejido fibroso con áreas de osificación

**Tabla 5.** Resultados del grupo en que se había realizado la cauterización del periostio.

Grupo	Tipo de tejido
1 semana N:4	4 tejido tipo 1 (hendidura)
2 semanas N:4	3 tejido tipo 2 (fibroso) 1 tejido tipo 3 (zonas endocondrales)
3 semanas N:4	4 tejido tipo 2 (fibroso)
4 semanas N:4	4 tejido tipo 2 (fibroso)

Se constató falta de consolidación con zonas de hendidura y gap interfragmentario.

**Tabla 6.** Resultados de las piezas en que no se realizó cauterización.

Grupo	Tipo de tejido
1 semana N:4	4 tipo 1 (hendidura)
2 semanas N:4	2 tipo 3 (fibrosos con áreas cartilaginosa) 2 tipo 4 (fibroso con áreas de osificación)
3 semanas N:4	1 tipo 3 (fibrosos con áreas cartilaginosa) 3 tipo 4 (fibroso con áreas de osificación)
4 semanas N:4	1 tipo 3 (fibrosos con áreas cartilaginosa) 3 tipo 4 (fibroso con áreas de osificación)

Se constata la consolidación a las 4 semanas mediante osificación intramembranosa o endocondral.

### *Grupo con cauterización del periostio*

En este grupo no observamos la presencia de VEGF en los osteoblastos, condrocitos ni megacariocitos de la cavidad medular (Fig. 4).

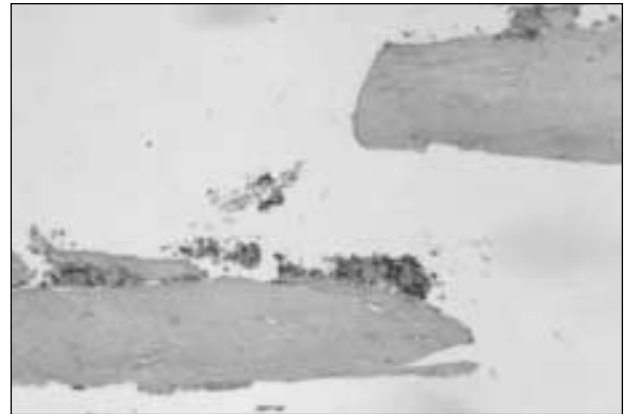
### *Grupo sin cauterización del periostio*

En este grupo observamos la expresión del VEGF en los bordes activos del frente de osificación. Su expresión pudimos observarla en osteoblastos activos, megacariocitos y condrocitos de los callos de consolidación (Fig. 5).

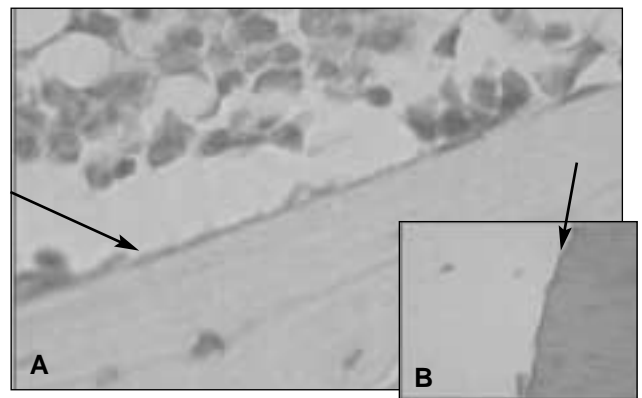
## Discusión

Mediante el siguiente trabajo de experimentación se desarrolló un nuevo modelo de pseudoartrosis en roedores altamente reproducible que permitirá utilizarlo para el estudio de la fisiopatología de esta enfermedad, así como para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos propuestos para tratarla.

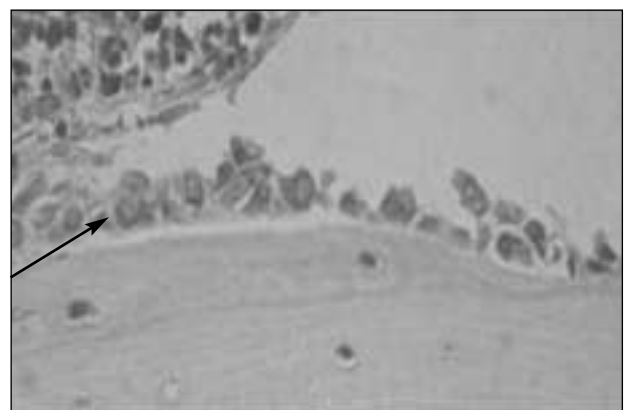
Los modelos descritos antes utilizaron la inestabilidad para generar pseudoartrosis, tomando como hipótesis un efecto mecánico con macromovimientos como causa de la enfermedad.<sup>4</sup>



**Figura 3.** Se constatan los bordes atróficos con la presencia de gap entre ambos fragmentos óseos.



**Figura 4. A.** Se constata la ausencia de expresión del VEGF en el citoplasma de las células del borde atrófico correspondiente al borde pseudoartrosico. **B.** Corresponde al mismo corte histológico pero sin tinción para VEGF. Se observa la falta de actividad celular en el borde de la pseudoartrosis.



**Figura 5.** Se constata la expresión del VEGF en el citoplasma de las células del borde de la osteotomía, lo que sugiere la actividad de éstas.

Teniendo en cuenta la experiencia clínica en la cual el estímulo del periostio (*stripping* perióstico) en los pacientes con pseudoartrosis genera un estímulo en la reactivación de la osteogénesis, planteamos la hipótesis de una probable causa biológica en el desarrollo de la afección.<sup>5</sup>

Estudios experimentales y clínicos han evidenciado la importancia del periostio en la consolidación de la fractura aportando una vascularización y concentración adecuadas de células mesenquimáticas pluripotenciales responsables de intervenir en la osificación endocondral e intramembranosa. Sin embargo, no se ha estudiado aún el efecto que tiene el periostio sobre los factores de crecimiento fundamentales para generar un microambiente osteogénico.

El VEGF es una molécula fundamental en el proceso de osteogénesis, ya que no sólo estimula la angiogénesis necesaria para una consolidación ósea adecuada sino también la osificación endocondral e intramembranosa del callo de fractura. Beam<sup>1</sup> demostró una menor concentración de este factor en ratas diabéticas que presentaban

pseudoartrosis.

Mediante el presente trabajo de investigación pudimos inferir que la disminución o falta de expresión del VEGF en las células (osteoblastos, condrocitos, megacariocitos) de los animales en los que se realizó la electrocauterización puede explicar el estímulo biológico del periostio en la consolidación ósea.<sup>5</sup>

Pudimos corroborar también la expresión del VEGF en megacariocitos de la cavidad medular de los animales en los que se había logrado la consolidación. Estas células son las precursoras de las plaquetas, lo cual corrobora la hipótesis de la capacidad osteogénica de la médula ósea secundaria a la presencia de concentraciones elevadas de factores de crecimiento.

Consideramos haber desarrollado un modelo en roedores de pseudoartrosis no descrito previamente, así como dar una explicación biológica al efecto que tiene el periostio en la consolidación ósea.

### Referencias bibliográficas

1. **Beam HA, Gandhi A, Niver G, et al.** *Reduced VEGF expression in the fracture callus of the diabetic BB Wistar rat.* 50<sup>th</sup> Annual Meeting in the Orthopedics Research Society, Marzo, 2004.
2. **Boyan BD, Caplan AI, Heckman JD, et al.** Osteochondral progenitor cells in acute and chronic canine nonunions. *J Orthop Res*;17(2):246-255;1999.
3. **Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, et al.** Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J Orthop Res*;22(3):526-534;2004.
4. **Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P.** An experimental model for non-union in rats. *Injury*;26(10):681-686;1995.
5. **Illarramendi A, Schulz C, De Carli P.** The surgical treatment of Kienbock's disease by radius and ulna metaphyseal core decompression. *J Hand Surg (Am)*;26(2):252-260;2001.
6. **Marsh D.** Concepts of fracture union, delayed union and nonunion. *Clin Orthop*;(355 Suppl):S22-30;1998.
7. **Milgram JW.** Nonunion and pseudoarthrosis of fracture healing. A histopathologic study of 95 human specimens. *Clin Orthop*;(268):203-213;1991.