

# CUANTIFICACION DEL CALCIO PRODUCIDO POR AUTOINJERTOS PERIOSTICOS LIBRES EN LA REPARACION DE DEFECTOS TRAQUEALES. ESTUDIO ESPERIMENTAL

R. Guijarro Jorge, A. Sánchez-Palencia Ramos, A. Cueto Ladrón de Guevara y F. Martí Huedó

Unidad de Cirugía Torácica. Hospital Regional Virgen de las Nieves. Granada.

De entre todas las procedencias hísticas de injertos usados en cirugía torácica para solventar pérdidas de sustancias traqueales tras la cirugía de tumores que la invadan o por traumatismo, es sin duda el periostio el más utilizado.

Se presenta un estudio experimental en 30 ratas Wistar, en las que se ha usado periostio proveniente de localizaciones de osificación endocondral (tibia) y membranosa (calota) que son utilizados con diversa orientación con respecto al lumen traqueal.

Por medio de un método fotocolorimétrico se cuantifica la cantidad de calcio producido por los mismos, concluyendo que los injertos procedentes de tibia producen de 5-6 veces más hueso que los de calota y que, por tanto, los primeros son más idóneos para ser utilizados en cirugía traqueal porque producen una estabilización más intensa y precoz de la zona injertada.

*Arch Bronconeumol 1988; 24: 206-208*

## Introducción

Anteriores trabajos nuestros<sup>1</sup> han demostrado experimentalmente la capacidad osteogénica de los autoinjertos periosticos libres al ser trasplantados para solventar defectos traqueales por pérdida de substancia parietal, circunstancia que se presenta en la cirugía de tumores que invaden la tráquea y en algunos casos de traumatismos de la vía aérea principal.

Estos estudios han señalado que la procedencia tisular y orientación del injerto son importantes en la calidad de hueso producida.

Sin embargo, existen pocos trabajos que demuestren cuantitativamente la cantidad de calcio producida por los autoinjertos. De hecho, sólo conocemos el trabajo de Uddstroner<sup>2</sup>, con la imposibilidad que supone para la evaluación histológica concomitante el que este autor, para cuantificar el calcio por espectrofotometría, quema las piezas en una mufla a 600° C, investigando este elemento en las cenizas.

Presentamos la aplicación de un método fotocolorimétrico para la cuantificación del calcio producido por estos injertos, analizando estadísticamente la producción de hueso por diferentes procedencias tisulares y siendo usados los injertos con diferente orientación.

Establecer cuantitativamente la procedencia y orientación idónea de los injertos periosticos libres, cuando se usan para solventar defectos por pérdida de substancia parietal en la

## Quantification of calcium produced by free periosteal autografts in repairing tracheal defects. Experimental study

With no doubt, periosteum is the tissue employed in most instances to repair loss of substance of the trachea due to invading tumors or traumatism.

We have carried out an experimental study in 30 Wistar rats, in which we have employed periosteum from endochondral ossification (tibia) and intramembranous (calvaria) ossification, that have been used with different orientation whith respect to the tracheal lumen.

We have quantified the amount of produced calcium by means of photocolorimetric method. We conclude that grafts from tibia produce an amount of bone 5-6 fold greater than grafts from calvarium, therefore, the former are more adequate to be employed in tracheal surgery, provided that they produce a more marked and early stabilization in the grafted zone.

tráquea, es fundamental en cirugía torácica, pues al estar sujeta esta estructura a los cambios presivos del ciclo respiratorio, hasta que los injertos no adquieren rigidez, se movilizan, de ahí la importancia de este estudio.

## Material y métodos

Se han utilizado 30 ratas Wistar procedentes del estabulario del Departamento de Anatomía Humana de la Universidad de Valencia con un peso de  $265 \pm 52$  g, 19 eran hembras y 11 machos.

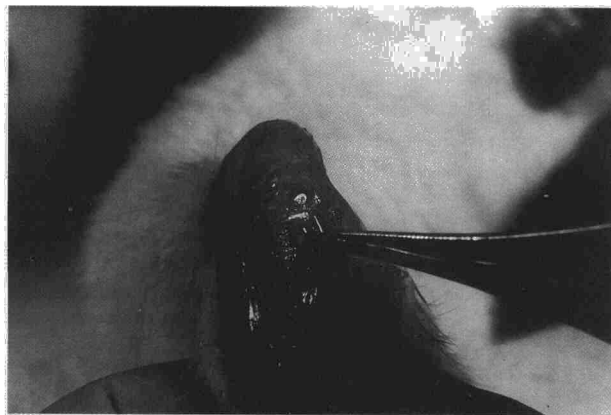


Figura 1.

Recibido el 11-4-1988 y aceptado el 31-5-1988.

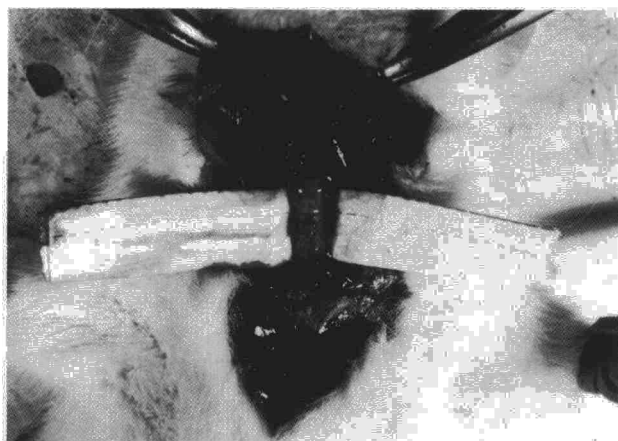


Figura 2.

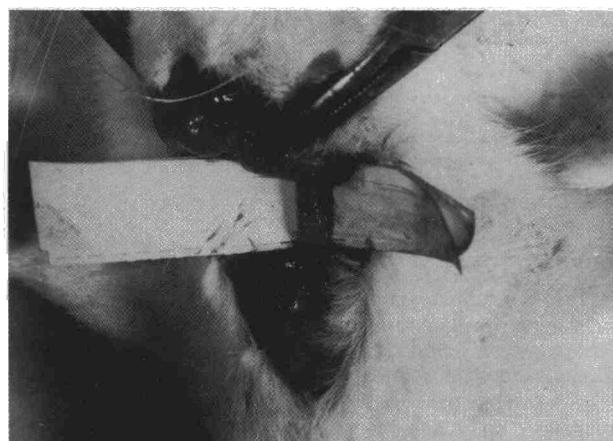


Figura 3.

En las experiencias preliminares se usaron 5 animales, en los que se ensayó la técnica quirúrgica a emplear y sirvieron así de entrenamiento al cirujano para conseguir la homogeneidad del acto quirúrgico. Otros 6 animales murieron con estridor respiratorio intenso antes del tiempo programado para su sacrificio. Todos estos casos no fueron incluidos en la serie.

En 10 animales se emplearon injertos periósticos tibiales con la carga osteogénica del injerto orientada hacia el defecto traqueal, en otros 10 animales se usaron injertos periósticos tibiales con la cara osteogénica orientada hacia fuera del defecto traqueal. Finalmente, en los 10 restantes se usaron injertos periósticos de calota con la cara osteogénica del mismo hacia dentro del defecto traqueal.

Los animales fueron sacrificados en número de 2 de cada grupo por semana de la cuarta a la octava de la intervención, por entender que durante este tiempo es cuando transcurren los cambios más interesantes relacionados con la producción de hueso por el injerto<sup>3</sup>.

#### Anestesia y preparación preoperatoria

Fue usado como anestésico éter etílico, siendo los animales introducidos en una campana con vapores de éste y se mantuvo la anestesia mediante inyección intraperitoneal de una solución de hidrato de cloral al 10 % y uretano al 3 % disueltos en 100 ml de suero fisiológico e inyectándose a dosis de 0,4 ml/100 g de peso del animal.

No se usó asepsia ni antisepsia de ningún tipo, salvo limpieza de las zonas a operar con povidona yodada al 10 % (Betadine<sup>®</sup>).

#### Experiencias preliminares

Se usaron 5 animales en las experiencias preliminares, que luego fueron desechados de la serie.

Un primer problema fue el manejo de las finas láminas de periostio que con frecuencia se doblaban y eran en muchas ocasiones difíciles de distinguir de fascias y aponeurosis.

Se intentó dar rigidez a los injertos con diversos cementos sintéticos, pero al igual que a Kufas<sup>3</sup>, ocurrió que estos eran reabsorbidos, probablemente por aislamiento de los mismos del lecho capilar; por lo que nos acostumbramos a utilizarlos tal y como fueron extraídos; a fin de distinguir entre fascias y aponeurosis del periostio, bajo microscopio quirúrgico y mediante una fina hoja de bisturí triangular, se procedió a retirar láminas de tejido hasta que una de ellas dejaba al descubierto el sistema haversiano oscular; esta última era el periostio.

Se tuvo especial cuidado en obtener sólo periostio y no hueso, lo que pudiera conducir a una falsa osificación precoz y llevar así a resultados erróneos.

#### Técnica quirúrgica

**Preparación de los injertos periósticos.** Se obtuvo periostio de la superficie craneal y/o tibia usando una fina hoja de bisturí triangular. Este injerto fue almacenado en solución salina fisiológica mientras la tráquea era disecada.

Se intentó trasplantar aproximadamente la misma superficie de periostio a cada animal con el fin de homogeneizar los resultados.

**Preparación de la tráquea: tipos de injertos.** La tráquea cervical fue disecada mediante un abordaje por cervicotomía media.

Una vez expuesta la tráquea, se creó un defecto traqueal total con electrobisturí tras coagulación de la fina red capilar superficial, siendo siempre el defecto de forma circular y aproximadamente de la misma extensión (3 mm<sup>2</sup>).

Los injertos periósticos fueron implantados con la línea osteogénica hacia fuera o hacia dentro, según la serie considerada, suturándolos con ácido poligaláctico (polyglactin 910 Vicryl) 6/0 y con un número de puntos tal que aseguraban una perfecta acrostasia.

**Complicaciones postoperatorias.** A pesar de no usar asepsia ni antisepsia, ni cobertura antibiótica postoperatoria, el índice de infecciones fue muy bajo (sólo 2 animales, 6,6 %) y ninguno de ellos murió por complicaciones infecciosas. Un animal presentó enfisema subcutáneo intenso postoperatorio que cedió espontáneamente. Seis animales (20 %) presentaron estridor respiratorio intenso. Aproximadamente un 30 % del total tuvieron en algún momento de la evolución estridor que cedió espontáneamente.

**Método fotocolorimétrico de medición del calcio en el líquido descalcificador (ácido nítrico al 10 %).** Las piezas obtenidas tras necropsias de los animales fueron fijadas con formalina tamponada al 10 %, lavadas con agua desionizada y descalcificadora durante 4 horas en pocillos que contenían ácido nítrico diluido al 10 % en agua desionizada.

En el líquido ácido resultante de la descalcificación, se realizó la medición del calcio por la técnica colorimétrica de Gener Seguí, Vila Radigales y Concastell Bas (Laboratorios Knickerbocker, SAE, 1971). Esta determinación se basa en la formación de un complejo azulado en medio alcalino entre el Ca<sup>++</sup> contenido en la muestra problema, la 8-hidroxiquinolina y el azul de metil-timol.

Para realizar la técnica, se utiliza material bien lavado en agua desionizada y se mezclan en una probeta volúmenes iguales de solución 15 mM de 8-hidroxi-quinolina, 0,09 mM de azul de metil-timol en ácido clorhídrico 15 mM con tampón de dietilamina CNK 350 mM/5 mM a pH 12, formándose así el monorreactivo de trabajo.

TABLA I  
Método fotocolorimétrico de medición del calcio en líquido descalcificador (ácido nítrico al 10 %)

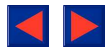
	Blanco	Líquido problema	Control
Monorreactivo	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
Líquido problema	—	0,005 ml	—
Control (mg/100 ml)	—	—	0,05 ml

Según Gener Seguí J, Vila Radigales J, Concastell Bar E. Laboratorio Kuickerbocker, SAE 1971.

TABLA II  
Cuantificación del calcio producido por los injertos periósticos libres en mg/100 ml ( $\bar{x}$  de hallazgos)

Semanas postoperatorias	Grupo de estudio (N = 30)		
	TD	TF	CD
4	5,5	5,3	0,5
5	6,7	6,6	0,9
6	6,9	6,7	1,2
7	7,2	7	1,4
8	7,3	7	1,5
$\bar{X} \pm DE$ por grupos:	6,72 ± 0,72		1,1 ± 0,41
	← 6,52 ± 0,70 →		

TD: Periostio de tibia con cara osteogénica hacia dentro del defecto traqueal; TF: periostio de tibia con cara osteogénica hacia fuera del defecto traqueal; CD: periostio de calota con cara osteogénica hacia dentro del defecto craneal.



Las soluciones referidas en la tabla I se pipetearon y se colocaron en sendos tubos de ensayo.

El líquido control es un combinado de calciomagnesio (10 mg Ca<sup>++</sup> y 2 mg Mg<sup>++</sup>/100 ml).

Las soluciones obtenidas se mezclan y las absorbancias de las mismas se miden en un espectrofómeto Beckman ajustado a 610 ± 1 nm frente al blanco de la prueba. El color se mantiene estable unos 60 minutos. Las absorbancias medidas son convertidas en mg/100 ml por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{E. \text{ del problema}}{E. \text{ del control}} \times 10 = \text{mg} / 100 \text{ ml}$$

## Resultados

Histológicamente, la membrana perióstica no es uniforme, pues tiene una lámina fibrosa externa compuesta de fibras de colágeno diseminadas con abundantes fibroblastos y una lámina osteogénica interna compuesta por una mezcla de células osteogénicas y osteoblastos y responsable de la formación de una nueva matriz ósea.

Diversos estudios han demostrado que el máximo de proliferación celular responsable de la nueva formación del hueso se debe a la lámina osteogénica interna<sup>4</sup>. Esta lámina parece estar compuesta de *stem cells* que, a través de diversos caminos de diferenciación, se transforman en osteoblastos y condroblastos.

Como se observa en la tabla II, de entre las dos procedencias genéricas de periostio: tibial (osificación haversiana o endocondral) y calota (osificación membranosa), es sin duda el periostio tibial el que produjo de 5-6 veces más hueso que el precedente de calota y de entre los primeros, produjo más y mejor hueso el periostio tibial con la cara osteogénica hacia la luz traqueal.

## Discusión

Diversas experiencias han demostrado que los injertos periósticos son capaces de formar nuevo hueso<sup>6</sup>. El potencial osteogénico del periostio en individuos jóvenes es usado en la restauración ósea en diversas circunstancias clínicas, tales como defectos maxilares tipo labio leporino<sup>6,7</sup>, en la fusión espinal en la escoliosis<sup>8</sup>, corrección de pseudoartrosis en huesos largos<sup>9</sup> y también en el tema que nos ocupa, la reconstrucción traqueal<sup>3</sup>.

Hemos escogido el periostio como material idóneo para injerto en la tráquea por ser tejido blando, fácilmente moldeable y ser bioincorporado mediante rápida revascularización, produciendo hueso y dando así una rigidez adecuada, esencial en esta área para que no bambolee con los cambios de presión intratorácica. Por otra parte, es lo suficientemente sólido, como para impedir la fuga aérea; en efecto, el periostio es fuerte y su tejido fibroso elástico es capaz de asegurar una buena aerostasia.

El periostio, al igual que el pericondrio y la fascia, es un tejido mesenquimatoso y por ello no se descama. Carece de glándulas secretoras y folículos pilosos a diferencia de la piel. Finalmente, su uso presenta como ventaja el que como todo autoinjerto es fácil de obtener.

Primeramente se usaron injertos periósticos en su forma pediculizada para reconstrucción traqueal<sup>10-14</sup>. Los primeros en usar injertos periósticos libres en la reconstrucción de la tráquea fueron Kufas y Pasila, en 1974<sup>3</sup>. La tensión de oxígeno depende en gran medida de la vascularización del entorno. La vía condrogénica se favorece con una mala vascularización, mientras que la diferenciación hacia la vía osteogénica siempre acontece con una oxigenación adecuada. Lo anteriormente expuesto se confirma en el uso de injertos periósticos libres, en donde la pobre vascularización resultante de condiciones hipóxicas puede estimular la vía condrogénica conduciendo a la primaria de cartilago<sup>9-14</sup>. Ritsila y Alhopuro<sup>15</sup> demostraron que el periostio del *calvarium* produce hueso membranoso, mientras que el tibial se

trasplanta a efectos traqueales experimentales, produce hueso membranoso. Ello sugiere que el hueso que el periostio forma pudiera estar también determinado por el medio ambiente más que por el mensaje genético de las células osteogénicas trasplantadas.

En los estudios cuantitativos realizados por nosotros (tabla II) se observa como los injertos tibiales producen 5-6 veces más hueso que los procedentes de calota y como de entre los primeros, el injerto orientado hacia la luz traqueal es más eficaz en producir hueso que si se orienta al revés. La mayor producción de hueso por parte de los injertos tibiales con respecto a los procedentes de calota (tabla II), creemos se debe a que los primeros producen osificación haversiana o endocondral, mientras que los segundos dan lugar a osificación membranosa. Sin embargo, en estudios histológicos efectuados por nosotros<sup>1</sup>, hemos observado que el periostio procedente de tibia da lugar a osificación membranosa cuando se trasplanta de forma libre para solventar pérdidas de substancias parietales en tráquea. Creemos, junto con Cohen y Lacroix<sup>16</sup> y Ritsila et al<sup>9</sup>, que ello pudiera deberse a que más que el mensaje genético que los propios osteoblastos portasen, el tipo de osificación originado dependa de la tensión de oxígeno de la zona trasplantada.

En cuanto a la orientación del injerto, el de tipo tibial, dirigido hacia la luz traqueal, produjo más hueso que si estuviese orientado hacia los tejidos circundantes, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Guijarro Jorge R, Cueto Ladrón de Guevara A, Sánchez-Palencia A, Martí Huedo F, Zilbermann Morales S, París Romeu F. Estudio experimental de la utilización de autoinjertos periósticos libres en la solución de pérdida de sustancias parietales en la tráquea. Arch Bronconeumol 1988 (en prensa).
2. Uddstroner L, Ritsila V. Osteogenic capacity of periosteal grafts. A qualitative and quantitative study of membranous and tubular bone periosteum in young rabbits. Scand J Plast Reconstr Surg 1978; 12:207-214.
3. Kufas T, Pasila M. Free periosteal transplants in tracheal reconstruction. Report of three cases. Z Kiderchir 1974; 15:371-387.
4. Rohde C. Does bone form from osteoblasts or from metaplasia of the surrounding tissue? Surg Gynecol Obstet 1925; 41:740-748.
5. Burman MS, Umansky M. An experimental study on free periosteal transplants weapped around tendon. J Bone Jt Surg 1930; 12:579-605.
6. Skoog T. The use of periosteal flaps in the repair of the primary palate. Clefte Palate J 1965; 2:332-337.
7. Ritsila V. The use of free periosteum for bone formation in congenital clefts of the maxilla. Scand J Plast Reconstr Surg 1972; 6:57-65.
8. Snellman O, Ritsila V. Spinal fusion of idiopathic scoliosis with free periosteal grafts: a preliminary report. Acta Orthop Scand 1977; 48:339-345.
9. Ritsila V, Alhopuro S, Rintala A. Bone formation with free periosteum. An experimental study. Scand J Plast Reconstr Surg 1972; 6:51-56.
10. Poticha SM, Lewis RJ. Tracheal replacements with autogenous grafts. Surg Forum 1962; 13:91-93.
11. Sato R, Hasegawa J, Nakagawa J. Experimental study of tracheal reconstruction. J Thorac Cardiovasc Surg 1957; 34:526-530.
12. Blair E. Study of the viable intercostal pedicle graft in tracheobronchial surgery. J Thorac Surg 1958; 36:869-878.
13. Narodick B, Worman L, Pemberton A. Relaxation technique for tracheal reconstruction. Ann Thorac Surg 1965; 1:190-196.
14. Worman L, Starr C, Narodick B. Reconstruction after extensive tracheal resection. Marquette Med Rev 1966; 32:2-3.
15. Ritsila V, Alhopuro S. Reconstruction of experimental tracheal cartilage defects with free periosteum. A preliminary report. Scand J Plast Reconstr Surg 1973; 7:116-119.
16. Cohen J, Lacroix P. Bone and cartilage formation by periosteum. J Bone Joint Surg 1955; 37:717-730.