

ESTUDIO DE LOS IONES SÉRICOS (Ca, P, Mg) EN SANGRE DE MÉDULA ÓSEA EN PERROS CON FRACTURA DE HUESOS LARGOS

A study of serum ions (Ca, P, Mg) in blood from bone marrow of dogs with fractures of long bones

Bonafonte, J. I.*; Sánchez-Valverde, M. A.**; Vilorio, A. J.*; Agut, A.**;
Peiró, J. M.***; Ezquerro, L. J.****

* Cátedra de Cirugía y Reproducción. Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

** Cátedra de Patología Quirúrgica y Cirugía. Facultad de Veterinaria de Murcia.

*** Laboratorio de Sanidad y Producción Animal. Zaragoza.

**** Cátedra de Patología Quirúrgica y Cirugía. Facultad de Veterinaria de Cáceres.

Recibido: 28 septiembre
Aceptado: 21 octubre

RESUMEN

Hemos estudiado la evolución de los iones calcio, fósforo y magnesio a nivel sérico en animales sometidos a fracturas experimentales, al mismo tiempo que se comparan los niveles en sangre circulante con los obtenidos en sangre de médula ósea. Se aprecia en sangre venosa circulante una disminución de los niveles de Ca, P y Mg, tras la realización de la fractura experimental, disminución que permanece a lo largo de la experiencia en el caso del calcio y del magnesio, mientras que se observa un ligero aumento final en los valores de fósforo. En sangre de médula ósea los valores siempre aparecen disminuidos con respecto a los valores iniciales obtenidos en sangre venosa circulante.

Palabras clave: Sangre de médula ósea. Fractura. Niveles de Ca, Mg y P. Perro.

SUMMARY

The changes of the serum concentration of phosphorus, calcium and magnesium after the experimental fractures in dogs were studied, and their levels were compared between flowing blood and that of bone marrow. After a experimental fracture decreased levels of calcium, phosphorus and magnesium in flowing blood and bone marrow were observed. The levels of calcium and magnesium of flowing blood were decreased during the whole trial whereas that of phosphorus rise at the end of the trial.

Key-words: Bone marrow blood. Fracture. Ionic levels of Ca, Mg and P. Dog.

INTRODUCCIÓN

El proceso de restauración de las fracturas óseas ha dado lugar a una amplia gama de estudios dentro del campo de la traumatología, tratando de elucidar, por una parte, las sucesivas etapas de transformación del foco de fractura hasta converger en una restauración total de la estructura ósea (ALEXANDER, 1985) y por

otra, las variaciones orgánicas que acompañan a dicho proceso y que pueden tener efectos estimulantes con vistas a acortar terapéuticamente la duración del período de recuperación (LAL et al., 1976).

Por lo que respecta a la primera de las incógnitas planteadas los trabajos de investigación han logrado un considerable éxito presentando varios modelos biológicos que coinciden en las

líneas generales que explican el proceso de reparación ósea (HAM, 1969; McKIBBIN, 1978; ANDERSON, 1980).

En lo tocante a las variaciones orgánicas que acompañan a la reparación, se sabe que las células responden a los estímulos hormonales y otros cambios del entorno (BACHRA, 1970) regulando la concentración de iones en la matriz extracelular (IRVING, 1973 y BOSKEY, 1981).

Los mecanismos responsables de esta regulación son aún poco conocidos (McKIBBIN, 1978), ya que de momento sólo se han caracterizado algunas de las sustancias involucradas e hipotetizado sobre su modo de acción. Así se ha prestado atención a la fosfatasa alcalina y vitamina C (BOURNE, 1948 y HOSKING, 1978), calcitonina y paratohormona (SHANKIN-KERSTEMBAUM et al., 1977), vitamina D (MELLER, 1984) así como los niveles de fósforo y calcio (NILSSON, WESTLIN, 1972 y LAL et al. 1976) que son los iones más importantes en el proceso de regeneración, acompañados del magnesio (KOLB, 1971 y CRETON, 1976).

La importancia del aporte vascular fue puesta

de manifiesto por CAWLEY (1962) viéndose impulsado este enfoque por la aproximación experimental de KELLY et al. (1971) que elaboran un modelo que permite determinar exactamente el flujo sanguíneo. Dicho modelo ha sido posteriormente utilizado en numerosos experimentos (PARADIS, KELLY, 1975; KELLY, BASSINGTHWAIGHTE, 1977; HUGUES et al., 1979).

La mayoría de los estudios que se ocupan de este tema realizan la recogida de datos a nivel de sangre circulante, sin embargo, nosotros pretendemos, al mismo tiempo, comparar estos niveles de sangre circulante con los niveles obtenidos en sangre de médula ósea. A este respecto basamos nuestra investigación en el modelo experimental ya publicado con anterioridad por BONAFONTE et al. (1987).

En este modelo experimental se recogió sangre de médula ósea en perros normales, demostrando que los niveles de calcio, fósforo y magnesio eran totalmente equiparables con los obtenidos en sangre circulante recogida en la vena cefálica.

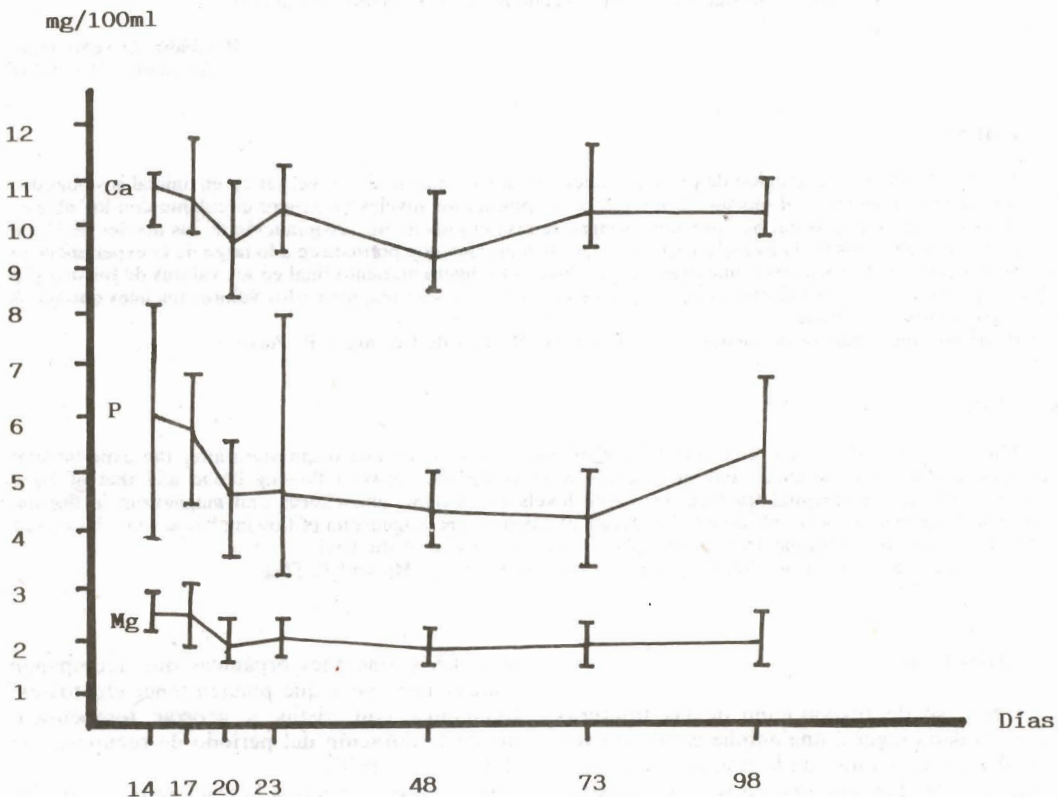


FIGURA 1. Valores de calcio, fósforo y magnesio determinados en sangre venosa periférica a lo largo de la experiencia.

CUADRO 1

VALORES DE CALCIO, FÓSFORO Y MAGNESIO (mg/100 ml) OBTENIDOS EN SANGRE CIRCULANTE Y MEDULAR EN SUCESIVAS EXTRACCIONES. LA CIFRA CENTRAL REPRESENTA LA MEDIA DE LOS CINCO ANIMALES Y LAS CIFRAS LATERALES EL MÍNIMO Y EL MÁXIMO

DÍA TOMA DE MUESTRA	CIRCULANTE				MEDULAR			
	Ca (mg/100 ml)	Mg (mg/100 ml)	P (mg/100 ml)	P (mg/100 ml)	Ca (mg/100 ml)	Mg (mg/100 ml)	P (mg/100 ml)	P (mg/100 ml)
14	10'8 (10'0)	2'4 (2'2)	6'0 (3'9)	8'2 (8'2)	—	—	—	—
17	10'6 (11'9)	2'4 (1'9)	5'7 (4'3)	6'7 (6'7)	—	—	—	—
20	9'9 (11'0)	2'0 (1'8)	4'3 (3'4)	5'3 (5'3)	—	—	—	—
23	10'5 (11'3)	2'2 (1'9)	4'8 (3'0)	8'0 (8'0)	8'3 (8'6)	2'0 (1'8)	2'2 (2'2)	3'8 (4'4)
48	9'8 (10'7)	2'1 (1'9)	4'6 (4'0)	5'0 (5'0)	9'5 (9'0)	2'2 (2'0)	2'2 (2'4)	4'4 (5'0)
73	10'6 (11'8)	2'1 (1'9)	4'6 (3'8)	5'0 (5'0)	10'3 (9'9)	2'2 (2'0)	2'2 (2'6)	4'7 (4'9)
98	10'5 (10'7)	2'2 (1'9)	4'3 (4'3)	6'9 (6'9)	10'1 (8'9)	2'3 (1'9)	2'3 (2'6)	4'2 (5'6)

CUADRO 2

COMPARACIÓN DE MEDIAS Y VARIANZAS DE LOS VALORES IÓNICOS SÉRICOS DETERMINADOS EN SANGRE CIRCULANTE Y MEDULAR

PARÁMETRO ESTUDIADO	MEDIAS			VARIANZAS		
	CIRCULANTE	MEDULAR	t	CIRCULANTE	MEDULAR	F
Ca	10'39	9'56	2'14	0'144	0'595	4'72
Mg	2'18	2'2	0'14	0'0225	0'0068	2'87
P	5'0	4'27	2'04	0'35	0'10	3'05

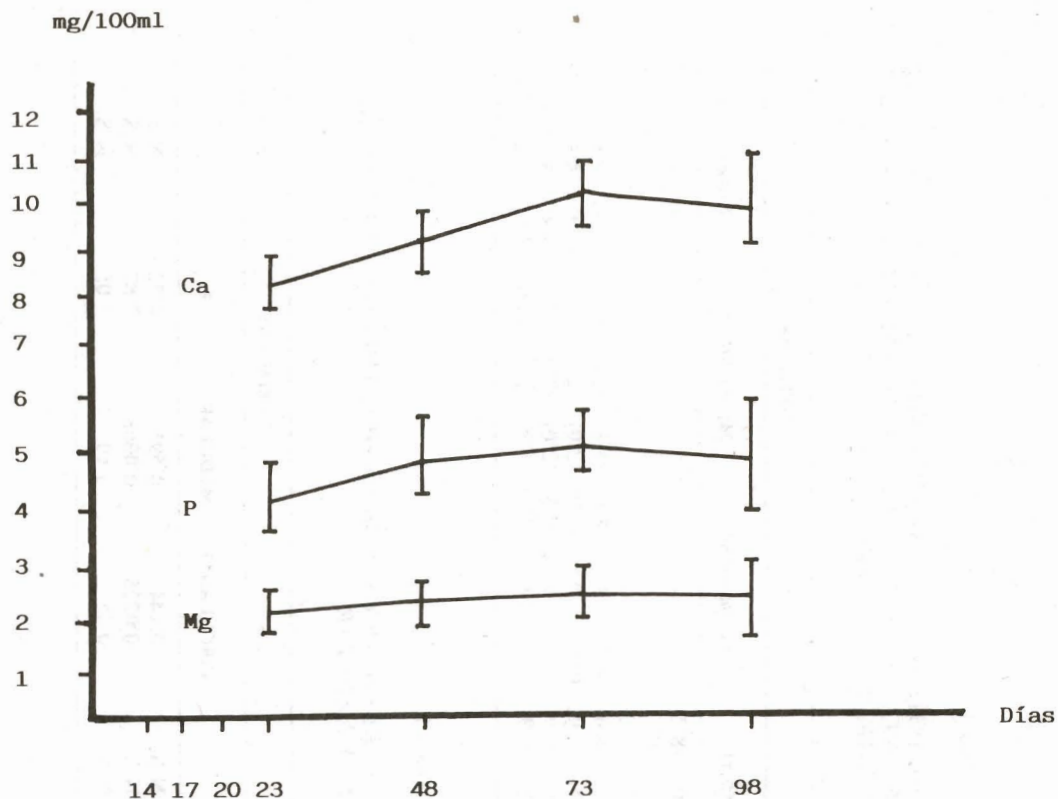


FIGURA 2. Valores de calcio, fósforo y magnesio determinados en sangre de médula ósea a lo largo de la experiencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha utilizado en nuestro estudio experimental un total de cinco perros, de raza mestiza, con edades comprendidas entre los 2 y 7 años y con unos pesos que oscilaban entre los 14 y 25 kilos.

El material quirúrgico empleado para este trabajo es el estándar en cirugía general, añadiendo al mismo un equipo completo de osteosíntesis y tornillos de cortical para obturar la perforación que se utiliza en la obtención de las muestras de sangre de médula ósea. Se utiliza además una sierra de Gigli para provocar las fracturas experimentales.

Cuando los animales habían sido separados e identificados permanecieron 14 días en cuarentena, período de tiempo que se aprovechó para la desparasitación interna y externa y para la adaptación a la nueva alimentación a base de pienso compuesto y embutido para perros.

A partir del día 14, por venoclisis de la vena

cefálica se comenzaron a tomar muestras de sangre circulante, repitiéndose las extracciones cada tres días hasta completar un total de tres tomas.

El día 23 se procede a la intervención quirúrgica, abriendo en la porción distal del fémur una vía de acceso a la cavidad medular, que se utiliza para la extracción repetida de muestras, además de provocar en la porción proximal a dicha vía de acceso la fractura completa transversal de la diáfisis femoral.

La obtención de muestras se realizó en los días 23, 48, 73 y 98 desde el comienzo de la experiencia, es decir, cada 25 días a partir de la intervención quirúrgica, completando una estancia postquirúrgica de 75 días.

Las extracciones se realizaron siempre bajo anestesia general y tras un período de ayuno de 24 horas. En cada extracción se obtenía sangre circulante a través de la venoclisis en la vena cefálica y sangre de médula ósea a través de la perforación cortical del fémur.

CUADRO 3

COMPARACIÓN ENTRE NUESTROS RESULTADOS Y LOS OBTENIDOS POR BONAFONTE *et al* (1987) EN SANGRE VENOUSA CIRCULANTE Y EN SANGRE MEDULAR

PARÁMETRO ESTUDIADO	MEDIAS			t	SIGNIFICACIÓN	VARIANZAS		
	CIRCULANTE BONAFONTE (1987)	CIRCULANTE ACTUAL	CIRCULANTE (1987)			CIRCULANTE ACTUAL	F	
Ca	12'67	10'39	5'31	**	0'99	0'14	6'77	N.S.
Mg	2'40	2'18	2'19	*	0'0385	0'0295	1'67	N.S.
P	5'91	5'0	2'84	*	0'31	0'35	1'14	N.S.
	MEDULAR				MEDULAR			
	BONAFONTE (1987)	ACTUAL	BONAFONTE (1987)		ACTUAL	F		
Ca	12'62	9'56	2'95	*	2'85	0'59	4'49	N.S.
Mg	2'86	2'2	2'87	*	0'16	0'0068	22'16	*
P	8'83	4'27	4'08	**	3'81	0'11	35'02	**

Técnica quirúrgica

La técnica quirúrgica realizada se basa en el modelo quirúrgico experimental descrito por BONAFONTE et al. (1978) para la obtención de sangre de médula ósea.

La anestesia se realizó mediante la forma descrita por BONAFONTE et al. (1987).

La cara lateral del muslo izquierdo se preparaba mediante el rasurado del pelo, limpieza y desinfección de la piel con una solución alcohólica de timerosal. Los animales eran posteriormente transportados a la mesa quirúrgica y colocados en decúbito lateral derecho aislando la zona quirúrgica con paños estériles.

Abordamos la diáfisis femoral por separación de los músculos cuádriceps femoral y biceps femoral, tras la sección de la fascia lata y previa incisión cutánea paralela al eje óseo. En la porción diafisaria distal procedemos a realizar una perforación mediante broca de 3'5 mm de diámetro, atravesando la cortical hasta llegar a médula ósea. Dicho orificio se efectúa con una inclinación inferior a 45° con respecto a la cortical ósea y en dirección proximal. Con el pasamachos de 4'5 mm tallamos la rosca en la cortical y avellanamos la superficie ósea, a fin de asegurar un correcto asentamiento de la cabeza del tornillo. El tornillo sirve de cierre a la perforación, permitiendo la obtención de muestras repetidas con la simple operación de retirarlo.

Una vez realizado este proceso seccionábamos la diáfisis femoral en su porción proximal mediante sierra de Gigli, provocando la fractura diafisaria transversal completa.

La incisión se cierra de la forma habitual, catgut 2/0 para fascia lata y tejido celular subcutáneo y seda 0 en los puntos de sutura cutánea.

Postoperatorio

Todos los animales se mantuvieron en jaula de tamaño reducido los cinco primeros días tras la intervención quirúrgica, controlando dos veces al día el pulso, respiración y temperatura. Durante este periodo de tiempo se les inyectó diariamente un compuesto de penicilina-estreptomina a dosis adecuada, así como antiinflamatorios. Tras estos días pasaban a jaulas de mayor amplitud (jaulas de paseo) donde permanecieron hasta el final de la experiencia.

En ninguno de los casos se observaron alteraciones del estado general que indujeran a instaurar otro tratamiento.

Las heridas quirúrgicas se curaron diariamente durante diez días procediendo posteriormente a retirar los puntos cutáneos.

Técnicas analíticas

El suero se obtiene por procedimientos rutinarios (centrifugación a 3000 r.p.m.).

Determinación de fósforo inorgánico. Se hace mediante espectrofotometría visual (espectrofotómetro VIS-UV monohaz Jouan, modelo junior). Como reactivos se emplean, solución de metasulfito-bora, solución de sulfito-carbonato, solución de ascorbato sódico-hidroquinona, solución de molibdato amónico, solución estándar de fósforo (5 mg/100 ml). El procedimiento consiste en añadir a 1 ml de solución de metasulfito-borax 0'1 ml de suero, seguido de 0'25 ml de solución de ascorbato-hidroquinona, dejando reposar 15 min a temperatura ambiente. Se añaden después 2'5 ml de solución de sulfito-carbonato y tras reposo de 10 min se lee la absorbancia de la solución resultante a 578 n.m. Para cada tanda de sueros se incluye un blanco y un estándar (RICHTERICH, 1965).

Determinación de calcio y magnesio. Se realiza mediante espectrofotometría de absorción atómica (espectrofotómetro de absorción atómica EEL-140). Los reactivos que se emplean son, solución stock de calcio (100 mg/l), solución stock de magnesio (100 mg/l), solución stock de magnesio (10 mg/l), solución stock de EDTA (sal disódica) al 3'75%, solución stock de EDTA (sal disódica) al 0'78%. El procedimiento seguido fue, con las soluciones stock anteriormente citadas se preparan disoluciones sucesivas de calcio y magnesio en concentraciones conocidas. La lectura de estas soluciones sirven para establecer las respectivas curvas de concentración para estos iones.

Se pipetea 0'4 ml de suero y 9'6 ml de solución stock de EDTA al 0'78%, obteniendo una dilución del suero 1/25. Se realiza la lectura y determinación de la concentración por comparación con las curvas obtenidas (WILLIS, 1960a y 1960b).

RESULTADOS

Los valores de calcio, fósforo y magnesio obtenidos tanto en sangre circulante como médula en las diferentes extracciones se reflejan en el cuadro 1. En las tres primeras extracciones sólo aparecen datos de sangre circulante, como se explica en el apartado de material y métodos.

La evolución de los diferentes valores de estos iones a lo largo del tiempo de la experiencia se aprecia claramente en las figuras 1 y 2 donde se representan los valores medios y extremos de cada uno de los iones, tanto en sangre circulante (fig. 1) como en sangre medular (fig. 2).

Hallando la media de todas las extracciones tanto en sangre medular como en sangre circulante, para cada uno de los iones, se aplica tests de comparación de medias y de varianzas. Los resultados figuran en el cuadro 2. Se aprecia que en todos los casos las diferencias de medias no son significativas. Esto indica que las diferencias observadas en las medias obtenidas en los tres iones estudiados son debidas al azar. La varianza de estas series tampoco difieren significativamente, por lo que se infiere que las series biológicas son estadísticamente asociables, tanto en lo referente a los valores medios como a la distribución de los valores individuales.

DISCUSIÓN

Los valores obtenidos para los tres iones estudiados en sangre circulante a lo largo de toda la experiencia y en todos los animales pueden considerarse como normales, comparados con las medias específicas que ofrecen los diversos autores (KOLB, 1971 y KIRK, 1980).

En cuanto a los obtenidos en sangre medular el único punto de referencia son nuestras experiencias anteriores (BONAFONTE et al., 1987) y las medias halladas tras la realización de las fracturas son sensiblemente inferiores. Dado que la metodología fue semejante, a excepción de la provocación de las fracturas, decidimos efectuar la comparación estadística entre las medias y varianzas de ambas experiencias. En el ion calcio y en el ion magnesio las diferencias se manifiestan como estadísticamente significativas, mientras que en el fósforo las diferencias son altamente significativas (cuadro 3).

Sin embargo, esta comparación realizada independientemente no tiene valor para extraer conclusiones si previamente no comparamos también los resultados actuales a nivel de sangre venosa circulante con los obtenidos por BONAFONTE et al. (1987). Esta nueva prueba estadística refleja diferencias significativas para el magnesio y el fósforo y altamente significativas para el calcio (cuadro 3). Por lo tanto, las diferencias encontradas a nivel de sangre medular en la contrastación de ambas experiencias no puede ser tomada como referencia válida, pues los valores en todo su conjunto, expuestos por BONAFONTE et al. (1987) son sensiblemente superiores.

A pesar de lo expuesto anteriormente hay que destacar algunos puntos de coincidencia. Los valores de los tres iones estudiados en sangre circulante han sufrido un ligero descenso aunque no presentasen significación estadística a partir de la realización de la fractura experi-

mental apreciándose al final de la experiencia una ligera elevación del fósforo. BONAFONTE et al. (1987) también encuentran esta ligera disminución de los valores iónicos a partir de la colocación del sistema de extracción de sangre de médula ósea, y aprecian también la elevación terminal del ion fósforo.

Los valores que hemos encontrado para los tres iones en sangre de médula ósea son siempre inferiores a los iniciales en sangre venosa circulante, lo que ocurre también en las experiencias anteriores (BONAFONTE et al., 1987).

NILSSON y WESTLIN (1972) y MELLER et al. (1984) demostraron que el fósforo plasmático aumenta inmediatamente después de las fracturas para adquirir a los pocos días los valores normales. No hemos observado dicho aumento lo que puede ser debido a la separación con que se realizaban las extracciones en nuestra experiencia, donde perseguimos más las alteraciones a largo plazo en el período de calcificación, que las variaciones inmediatas a las fracturas y por lo que respecta al ion calcio coincidimos con NILSSON y WESTLIN (1972), quienes aprecian un descenso de los valores normales que permanece durante al menos dos meses, ya que este descenso se mantiene a lo largo de toda nuestra experiencia.

Igualmente coincidimos con MELLER et al. (1984) en sus apreciaciones relativas al ion magnesio, quienes observan un descenso del mismo por debajo de sus valores normales tras las fracturas.

BIBLIOGRAFÍA

- ALEXANDER, J. W. 1985: Orthopedic surgery of the dog and the cat. Saunders. Philadelphia.
- ANDERSON, H. C. 1980: Calcification processes. *Path. Ann.* 15: 45.
- BACHRA, B. N. 1970: Calcification of connective tissue. *Int. Rev. Conn. Tiss. Res.* 5: 165.
- BONAFONTE, J. I.; SÁNCHEZ-VALVERDE, M. A.; SAN ROMÁN, F.; PEIRO, J. M.; MARTÍNEZ, S. 1987: Modelo experimental para el estudio de los iones séricos (Ca, P, Mg) en sangre de médula ósea. *Rev. Quir. Esp.* 14: 214-218.
- BOSKEY, A. L. 1981: Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 157: 225-257.
- BOURNE, J. M. 1948: Alkaline phosphatase and vitamin C deficiency in regeneration of skull bones. *J. Anat.* 82: 81-87.
- CAWLEY, A. J. 1962: The osseous blood supply of the pelvic limb of the dog. Ph. D. Thesis, Toronto.
- CRETON, B. B. 1976: Contribution a l'étude du métabolisme phospho-calcique du chien. Thèse Doctoral, Crêteil.
- HAM, A. W. 1969: Tratado de histología. Interamericana, México, D. F.
- HOSKING, D. J. 1978: Changes in serum alkaline

- phosphatase after femoral fracture. *J. Bone. Joint. Surg.* 60: 61-65.
- HUGHES, S. P. F.; LEMON, G. J.; DAVIES, D. R.; BASSINGTHWAIGHTE, J. B.; KELLY, P. J. 1979: Extraction of minerals after experimental fractures of the tibia in dogs. *J. Bone. Joint. Surg.* 61: 857-866.
- IRVING, J. T. 1973: Theories of mineralization of bones. *Clin. Orthop.* 97: 225-227.
- KELLY, P. S.; YIPINTSOL, T.; BASSINGTHWAIGHTE, J. B. 1971: Blood flow in canine tibial diaphysis estimated by iodoantipyrine 1125 washout. *J. Appl. Physiol.* 31: 38-47.
- KELLY, P. J.; BASSINGTHWAIGHTE, J. B. 1977: Studies on bone ion exchanges using multiple-tracer indicator dilution techniques. *Fed. Proc.* 36: 2.634-2.639.
- KIRK, R. N.; BISTNER, S. T. 1980: Urgencias en Veterinaria. Salvat, Barcelona.
- KOLB, E. 1971: Fisiologia veterinaria. Acribia, Zaragoza.
- LAL, S. K.; JACOB, K. C.; NAGI, O. N.; ANNAMALAI, A. L.; NAIR, C. R. 1976: Variations of some plasma components after closed fractures. *J. Trauma.* 16: 206-211.
- MCKIBBIN, B. 1978: The biology of fracture healing in long bones. *J. Bone Joint Sur.* 60: 150-162.
- MELLER, Y.; KERSTENBAUM, R. S.; MOZES, G.; YAGIL, R.; SHANY, S. 1984: Mineral and endocrine metabolism during fracture healing in dogs. *Clin. Orthop.* 187: 289-295.
- NILSSON, B. E.; WESTLIN, N. E. 1972: The plasma concentration of alkaline phosphatase, phosphorus and calcium following femoral neck fracture. *Act. Orthop. Scandinav.* 43: 504-510.
- PARADIS, G. R.; KELLY, P. J. 1975: Blood flow and mineral deposition in canine tibial fracture. *J. Bone. Joint. Surg.* 57: 220-226.
- RICHTERICH, RR. 1965: Klinische chemie. Kroger, Basel.
- SHANKIN-KERSTENBAUM, R.; FUNKENSTEIN, B.; CONFORTI, A.; SHANY, S.; BERLYNE, G. M. 1977: Serum calcitonin and blood mineral interrelationships in normal children aged six to twelve years. *Paediat. Res.* 11: 112-116.
- WILLIS, J. B. 1960a: Calcium and magnesium determination (I). *Spectrochem. Act.* 16: 259-272.
- 1960b: Calcium and magnesium determination (II). *Spectrochem. Act.* 16: 273-278.