

ENSAYO DE TOXICIDAD DE UN POLÍMERO NATURAL PARA SU POSIBLE APLICACIÓN COMO IMPLANTE EN ANIMALES

MM Luna¹, MC Brusa¹, A Stornelli², A Massone³

¹Servicio Central de Cirugía, ²Servicio Laboratorio,

³Instituto de Patología «B. Epstein». Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: El policarbonato (PC) es una extrusión de resina, polímero termoplástico duro, transparente en su forma natural, resistente al impacto, posee las propiedades de un biomaterial. Las aplicaciones más comunes del PC incluyen elementos de óptica, catéteres, dispositivos para biopsias e injertos óseos y envases de medicamentos y alimentos. El objetivo es establecer y comprobar la habilidad del PC para desarrollar una respuesta tisular apropiada como posible implante orgánico en un período de 180 días. Se trabajó con conejos de raza New Zeland para determinar si el implante induce toxicidad aguda o crónica. Para ello se implantó el material de estudio en tejido subcutáneo, abdomen y se fijo en el fémur utilizando tornillos convencionales de osteosíntesis. Los estudios hematológicos, los procedimientos quirúrgicos y exámenes histopatológicos se llevaron a cabo en los Servicios de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. El resultado de dichos estudios permite descartar la presencia de efectos tóxicos agudos o crónicos en los animales de experiencia. El aumento transitorio en los valores de las enzimas, pueden ser atribuidos al stress quirúrgico pues los mismos son similares a los hallados en el animal testigo. Se necesita repetir los estudios para determinar su posible utilización en otras especies animales.

Palabras clave: policarbonato, implante, biomaterial, toxicidad, canino

THE TOXICITY OF A NATURAL POLYCARBONATE AS A POTENTIAL TISSUE IMPLANT IN ANIMALS. AN INVESTIGATION.

ABSTRACT: Polycarbonate (PC) is an extrusion of a resin, a hard thermoplastic polymer, transparent in its natural form and impact resistant. It possesses the properties of a biomaterial. It is frequently used in optics, production of catheters, biopsies instruments, bone implants and containers for medicines and food. This study was designed to investigate the capabilities of PC to elicit an acceptable tissular reaction when used as an organic implants. PC plates were implanted in the subcutaneous tissue, abdomen and femur of pure bred New Zeland rabbits, regardless of age and sex, to determine acute and chronic toxicity. The plates were left in place up to 180 d. The results of this study indicate the absence of both acute or chronic toxicity, although a transient increase of certain serum enzymes, possibly due to the surgical stress, was observed. Further studies are needed in order to determine the potential use of PC in other species.

Key word: polycarbonate, implant, biomaterial, toxicity, dog

Fecha de recepción: 07/03/01

Fecha de aprobación: 28/11/02

Dirección para correspondencia: M.Brusa, Servicio Central de Cirugía. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata CC 296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: mbrusa@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de materiales alternativos para la fabricación de implantes de cirugía, surge de la necesidad de encontrar aquel que reúna las mejores características para una utilidad específica, sea su resistencia, fuerza, flexibilidad o valor económico. Además de los metales, acero inoxidable, titanio, aleaciones de cromo-cobalto, se utilizan polímeros, polietileno, polipropileno, nylon, cianoacrilatos, teflón, poliuretano, caucho, siliconas y también materiales cerámicos y carbón.

El policarbonato (PC) es una extrusión de resina, polímero termoplástico duro, transparente en su forma natural, resistente al impacto, posee las propiedades de un biomaterial (13). Los productores* de PC lograron estabilizar las uniones de los grupos hidocarbonos, otorgándole propiedades de compatibilidad sanguínea, resistencia a la abrasión, coeficiente de fricción, resistencia y degradación en implantes (11).

El Instituto Nacional de Salud en 1987 define al término *biomaterial* como: "cualquier sustancia o droga, o combinación de sustancias sintéticas o naturales que pueden ser usadas en un período de tiempo como un todo o en una parte de un sistema para reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo" (12). Se denomina *biocompatibilidad* a la habilidad del material de no producir alteraciones en los tejidos circundantes ni originar respuesta inmunológica en su aplicación específica (12).

Las aplicaciones más comunes del PC incluyen elementos de óptica, catéteres, dispositivos para biopsias e injertos óseos y envases de medicamentos y alimentos.

El objetivo es establecer y comprobar la habilidad del PC para desarrollar una respuesta tisular apropiada como posible implante orgánico en un período de 180 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con cuatro conejos de raza New Zeland provistos por el bioterio de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata. Se destinaron: conejo N° 1 testigo; conejo N° 2 para determinar toxicidad aguda; conejos N° 3 y 4 para determinar toxicidad crónica. El examen clínico de los animales confirmó su buen estado general y sanitario. Previa iniciación de las experiencias se les realizó la correspondiente evaluación hematológica y serológica. Los estudios sanguíneos se llevaron a cabo en el Servicio Central

de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Las muestras de sangre se extrajeron de la vena marginal de la oreja con etilen diamino tetracético (EDTA) y sin anticoagulante para la obtención de suero. Se realizó recuento de glóbulos rojos (GR), de glóbulos blancos (GB), hematocrito (Hto), dosaje de concentración de hemoglobina (Hb) por método colorimétrico \bar{A} y frotis teñido con May Grunwald Giemsa (MGG) para la observación de morfología celular y fórmula leucocitaria relativa. Las enzimas aspartato amino transferasa (AST), alanino amino transferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FA) se dosaron por test cuantitativo colorimétrico \wedge .

Los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo en las instalaciones del Servicio Central de Cirugía de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata., ajustándose a los principios de la cirugía aséptica.

Experiencia: Pruebas pre-clínicas de toxicidad aguda y crónica.

Los conejos se prepararon para cirugía con un ayuno de sólidos de seis horas. Los animales se anestesiaron con una combinación de clorhidrato de ketamina (35 mg/kg), xilazina (5 mg/kg) y maleato de acepromacina (0,75 mg/kg) administrados por vía intramuscular.

Conejo N°1.

Se realizó una laparotomía por línea media, de seis centímetros de longitud. Para la síntesis de la pared abdominal se utilizó poligalactina 910 3/0 y para la sutura de la piel nylon monofilamento 3/0. Se administró oxitetraciclina 200 mg, por vía subcutánea como dosis única y total

Conejo N° 2.

Se realizó una laparotomía por línea media de seis centímetros de longitud. Se implantó una placa rectangular de policarbonato compacto de 4 x 20 x 50 mm, con dos orificios de 2 mm de diámetro. La placa se esterilizó en autoclave. La misma se colocó en la cavidad peritoneal y se fijó a la pared abdominal mediante un punto de sutura con poligalactina 910 3/0 pasado a través de los dos orificios. Para la síntesis de los tejidos se procedió de manera similar al conejo N° 1.

En el mismo procedimiento operatorio se implantó otra placa de policarbonato de las mismas características que la anterior en el tejido subcutáneo de la región de la espalda, accediendo por una incisión cutánea de seis centímetros de longitud. Se fijó al tejido subcutáneo con el

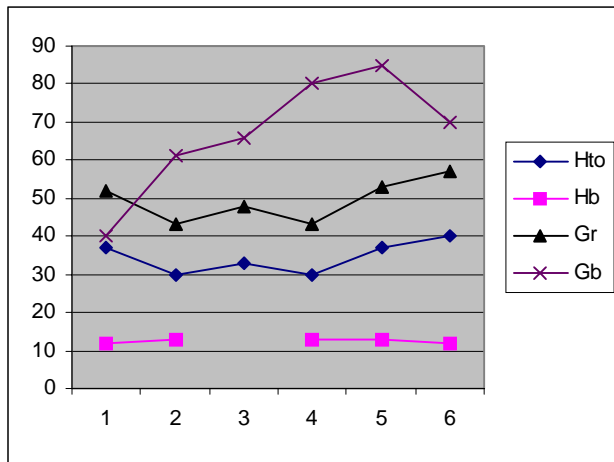


Figura 1. Registro de las principales variables hematológicas en el conejo n° 1

Fig.1 Main changes in hematologic parameters i rabbit n° 1

mismo material de sutura.

En el postoperatorio se aplicó 200 mg de oxitetraciclina por vía subcutánea. El conejo se mantuvo en las mismas condiciones que el testigo

Conejo N° 3:

Se abordó el cuerpo del fémur a través de una incisión lateral. Se implantó en la cara craneal de la diáfisis femoral una placa de policarbonato compacto de 3 x 10 x 40 mm, con dos orificios de 4 mm de diámetro. Se fijó al hueso utilizando la técnica convencional para la colocación de placas de osteosíntesis, con dos tornillos corticales de acero de 3,5 x 15 mm. En el momento de realizar los agujeros para la colocación de los tornillos se produjo una fractura laminar longitudi-

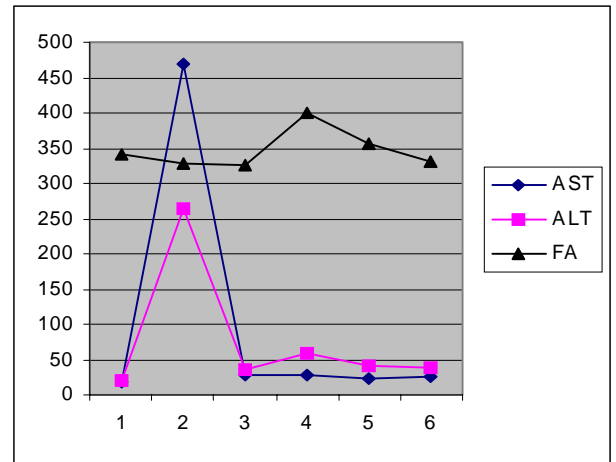


Figura 1. Registro de las principales variables enzimáticas en el conejo n° 1

Fig.1 Main changes in enzymes parameters i rabbit n° 1

nal del hueso, la cual se redujo e inmovilizó con la misma placa. El material de síntesis utilizado fue poligalactina 910 3/0 para la fascia y nylon monofilamento 3/0 para la piel. En el post operatorio se administró 200 mg de oxitetraciclina y 2 mg de clorhidrato de nalbufina por vía subcutánea. El conejo se mantuvo en las mismas condiciones de manejo que el resto de los animales.

Conejo N° 4:

Se realizaron los mismos procedimientos quirúrgicos detallados en el conejo N° 3. En este caso el hueso no se fracturó. En el postoperatorio se administró 200 mg de oxitetraciclina y 2 mg de clorhidrato de nalbufina por vía subcutánea. El conejo se mantuvo en las misma condiciones de manejo que el resto de los animales.

Tabla 1. Variación en los valores del hemograma y enzimas plasmáticas previos (azul) y posteriores (negro) a la cirugía del conejo n° 1.

Table 1. Changes in hematologic and chemical parameters before (blue) and after (black) surgery in rabbit n° 1.

Fecha	Hto.	Hb.	GR	GB	Fórmula leucocitaria						Ind. Hemat.			Bioquímica		
					NS	NB	E	B	L	M	hcm	vcm	chcm	AST	ALT	FA
18/8	37	12.6	5291x10 ³	4000	36	0	4	0	55	5	24.2	71	34	18	21	341
23/8	30	13.2	4290x10 ³	6100	64	0	2	0	34	0	31.4	71.4	44	470	265	329
27/8	33	---	4779x10 ³	6600	26	0	1	0	72	2		70		29	35	325
31/8	30	12.8	4290x10 ³	8050	26	0	0	0	73	1	30.4	71.4	42.6	28	60	400
2/9	37	13.4	5291x10 ³	8550	47	0	0	0	48	5	25.7	71.1	36.2	23	41	356
6/9	40	12	5720x10 ³	7050	42	0	0	0	55	3	21	70.1	30	25	39	330

Tabla 2 Modificación de los valores del hemograma y enzimas pre (azul(y post (negro) cirugía del conejo nº 2.

table 2.Changes in hematological and chemical parameters before (blue) and after (black) surgery in rabbit nº2.

Fecha	Hto.	Hb.	GR	GB	Fórmula leucocitaria						Ind. Hemat.			Bioquímica		
					NS	NB	E	B	L	M	hc m	vcm	chc m	AST	ALT	FA
18/8	43	15.3	6149x10 ³	4800	20	1	1	0	72	6	25	70.4	35.5	20	21	338
23/8	31	13.7	4433x10 ³	7000	76	0	1	0	22	0	31	70.4	44.1	740	265	319
27/8	31	-----	4433x10 ³	8300	21	0	2	0	77	0		70.4		23	35	298
31/8	32	11	4576x10 ³	10000	49	1	6	0	44	0	24.4	71.1	34.3	30	24	408
2/9	38	13.6	5434x10 ³	6250	36	0	3	1	60	0	25.1	70.3	35.7	8	19	129
14/9	30	10.8	4290x10 ³	8150	28	2	0	0	65	5	25.7	71.4	36	13	26	228
30/9 (zz)	28	11.6	4004x10 ³	7750	33	1	1	0	51	4	29	70	41.1	35	38	180

(zz) eutanasia

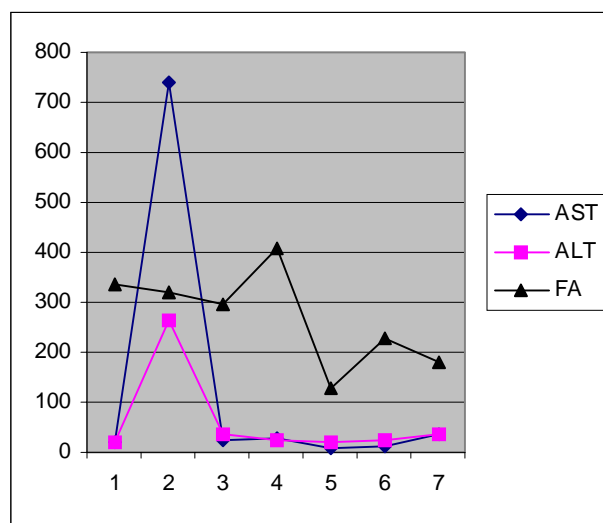
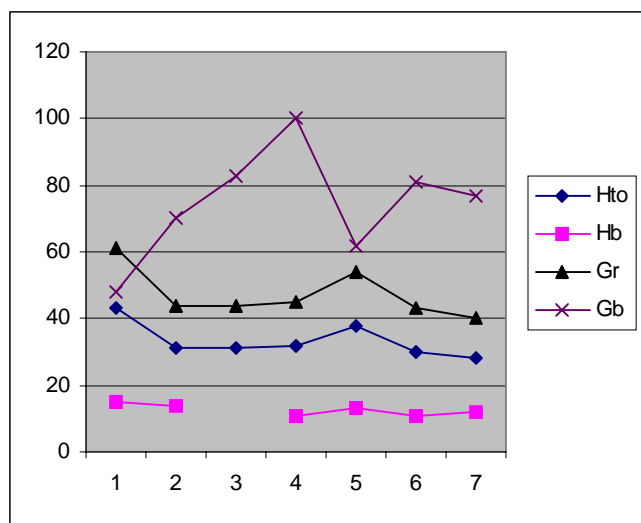


Figura 1. Registro de las principales variables hematólogicas en el conejo nº 2

Fig.1 Main changes in hematologic parameters i rabbit nº 2

Figura 1. Registro de las principales variables enzimáticas en el conejo nº 2

Fig.1 Main changes in enzymes parameters i rabbit nº 2

RESULTADOS

Se efectuaron estudios hematológicos y serológicos seriados de cada conejo en los días siguientes a la intervención (Tablas 1, 2, 3 y 4).

Conejo nº 1 (testigo): En el postoperatorio se lo mantuvo en jaula y no se registraran alteraciones en su estado general. La cicatrización de la herida no presentó complicaciones.

Conejo nº 2: Se efectuó la eutanasia y necropsia a los cuarenta días del posoperatorio con el fin de realizar los estudios anatómicos e histopatológicos de las vísceras y del tejido circundante al material implantado. Los estudios se realizaron en el Instituto de Patología Bernardo Epstein de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

El informe de los resultados es:

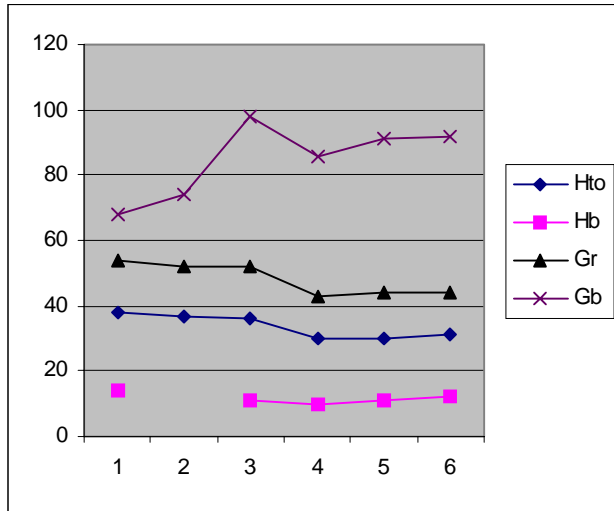


Figura 1. Registro de las principales variables hematológicas en el conejo n° 3
Fig.1 Main changes in hematologic parameters i rabbit n° 3

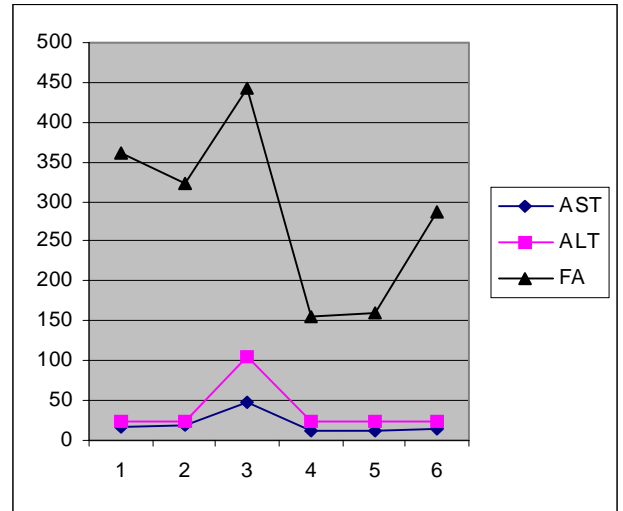


Figura 1. Registro de las principales variables enzimáticas en el conejo n° 3
Fig.1 Main changes in enzymes parameters i rabbit n° 3

Anatomopatológico: sin lesiones de carácter diagnóstico. Se hallan dos placas de policarbonato compacto en subcutáneo y cavidad peritoneal (foto n° 1).

Histopatológico de hígado, bazo, reacción en peritoneo y subcutáneo: Escasa reacción inflamatoria con escasa cantidad de macrófagos. No se observan polimorfonucleares.

Conejo n° 3: A los veinte días de operado se realizó el control radiográfico para determinar la presencia de cambios radiológicos en el hueso. Se

observaron imágenes compatibles con el proceso de consolidación normal de la fractura. La cicatrización de la herida no presentó complicaciones ni se registraron alteraciones en su estado general. Se efectuó la eutanasia y necropsia a los treinta días con la finalidad de realizar los estudios anatómo e histopatológicos de las vísceras, hueso y tejido circundante al material implantado. El informe de los resultados es:

Anatomopatológico: Se observa en el fémur izquierdo una línea de fractura con perfecta apo-

Tabla 3. Modificación de los valores del hemograma y enzimas pre (azul) y pos (negro) cirugía del conejo n° 3.
Table 3. Changes in hematological and chemical parameters before (blue) and after (black) surgery in rabbit n° 3.

Fecha	Hto.	Hb.	GR	GB	Fórmula leucocitaria						Ind. Hemat.			Bioquímica		
					NS	NB	E	B	L	M	hcm	vcm	chcm	AST	ALT	FA
18/8	38	13.6	5434x10 ³	6850	15	0	2	0	78	5	25.1	70.3	35.7	17	25	362
27/8	37	-----	5291x10 ³	7400	32	0	4	0	64	0		71.1		20	24	323
31/8	36	11	5200x10 ³	9850	65	0	0	0	35	0	21.1	69.2	30.5	48	106	443
2/9	30	10.6	4290x10 ³	8600	33	0	0	0	57	10	25.2	71.4	35.3	11	24	156
14/9	30	11	4404x10 ³	9100	33	0	0	0	56	1	25	68	36,6	13	24	160
30/9 ZZ	31	11,5	4433x10 ³	9250	32	1	3	0	62	2	26,1	70,4	37	15	25	288

(zz) eutanasia

Tabla 4. Modificación de los valores del hemograma y enzimas plasmáticas pre (azul) y pos (azul) cirugía del conejo n° 4.

Table 3. Changes in hematological and chemical parameters before (blue) and after (black) surgery in rabbit n° 4.

Fecha	Hto.	Hb.	GR	GB	Fórmula leucocitaria						Ind. Hemat.			Bioquímica		
					NS	NB	E	B	L	M	hcm	vcm	Chcm	AS T	ALT	FA
18/8	47	16.1	6421x10 ³	4750	26	0	0	0	70	4	24	70	34.2	14	21	332
27/8	39	-----	5557x10 ³	8200	41	0	1	0	58	0		70.9		41	18	119
31/8	36	10.7	5148x10 ³	11250	52	1	0	2	45	0	20.9	70.5	29.7	85	74	504
2/9	30	11.3	4250x10 ³	17150	61	0	0	0	23	16	26.9	71.4	37.6	10	14	113
14/9	32	12.2	4576x10 ³	12050	41	0	1	0	53	5	27	71.1	38	22	23	241
29/10	32	12	4576x10 ³	9650	49	1	0	0	50	0	26.6	70	37.5	7	79	243
14/11	33	12	4850x10 ³	9860	51	0	0	0	49	0	25	68	36,3	9	67	250
30/11	32	12,3	4750x10 ³	9500	47	0	0	1	47	5	26,1	55,3	38,4	11	65	270
15/12	30	11,9	4850x10 ³	9670	50	1	0	0	47	2	24,8	62,5	39,6	16	52	256
30/12	32	12	4575x10 ³	9850	52	0	0	1	46	1	26,6	71	37,5	22	38	165
10/03	35	13	5000x10 ⁰	10700	50	0	2	0	47	1	26	70	37	14	24	74
zz																

(zz) eutanasia

sición de los cabos óseos. El callo sobre ella formado presenta superficie lisa, sin adherencia a tejidos vecinos. La placa de PC colocada sobre la fractura se encuentra perfectamente inmovilizada sobre el hueso, sin adherencias a músculos y sin presencia de exudados sobre su superficie. El resto de los órganos no presentan lesiones diagnósticas.

Histopatológico : callo de fractura, con condrocitos, osteocitos, vasos de noviformación e inicio de calcificación de la matriz ósea. (Foto n° 2. H&E 10x) No se observan exudados ni células inflamatorias. El resto de los órganos estudiados (músculo, riñón, bazo, hígado, pulmón y corazón) no presentan lesiones diagnósticas.

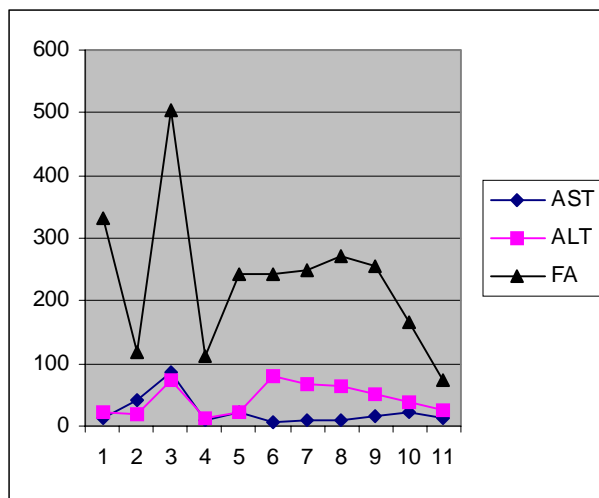
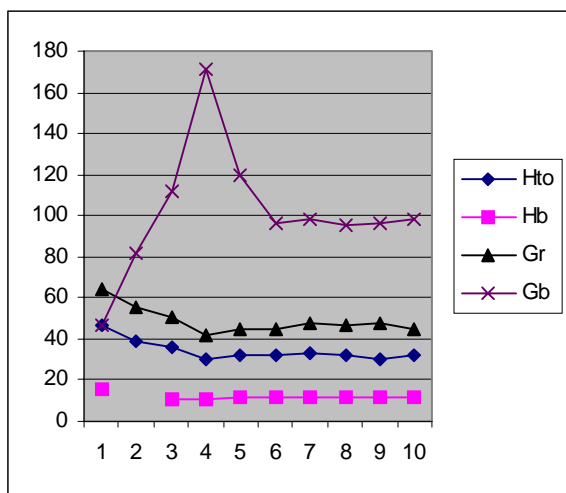


Figura 1. Registro de las principales variables hematólogicas en el conejo n° 4

Fig.1 Main changes in hematologic parameters i rabbit n° 4

Figura 1. Registro de las principales variables enzimáticas en el conejo n° 4

Fig.1 Main changes in enzymes parameters i rabbit n° 4



Foto n 1. Placa de policarbonato en cavidad peritoneal.

Photo n 1. PC plate in abdominal cavity.

Conejo n° 4: Al cuarto día de operado se detectó la formación de un absceso en la zona de la herida quirúrgica. Se realizó el drenaje del mismo y se continuó con la antibióticoterapia hasta su resolución. Se realizó el control radiográfico a los veinte días para determinar la presencia de cambios radiológicos en el hueso, observándose imágenes normales. Se efectuó la eutanasia y necropsia a los ciento ochenta días con la finalidad de realizar los estudios anátomo e histopatológicos de las vísceras, hueso y tejido circundante al material implantado. El informe de los resultados es:

Anatomopatológico: sobre el fémur izquierdo se observa una placa de PC fijada con tornillos al hueso, sin adherencia a tejidos vecinos y sin reacción periostial evidente (foto n° 3).

Histopatológico: el hueso y el periostio sobre los que se hallaba la placa de PC no presenta lesiones ni presencia de exudado y células inflamatorias. El resto de los órganos estudiados no presentan lesiones diagnósticas.

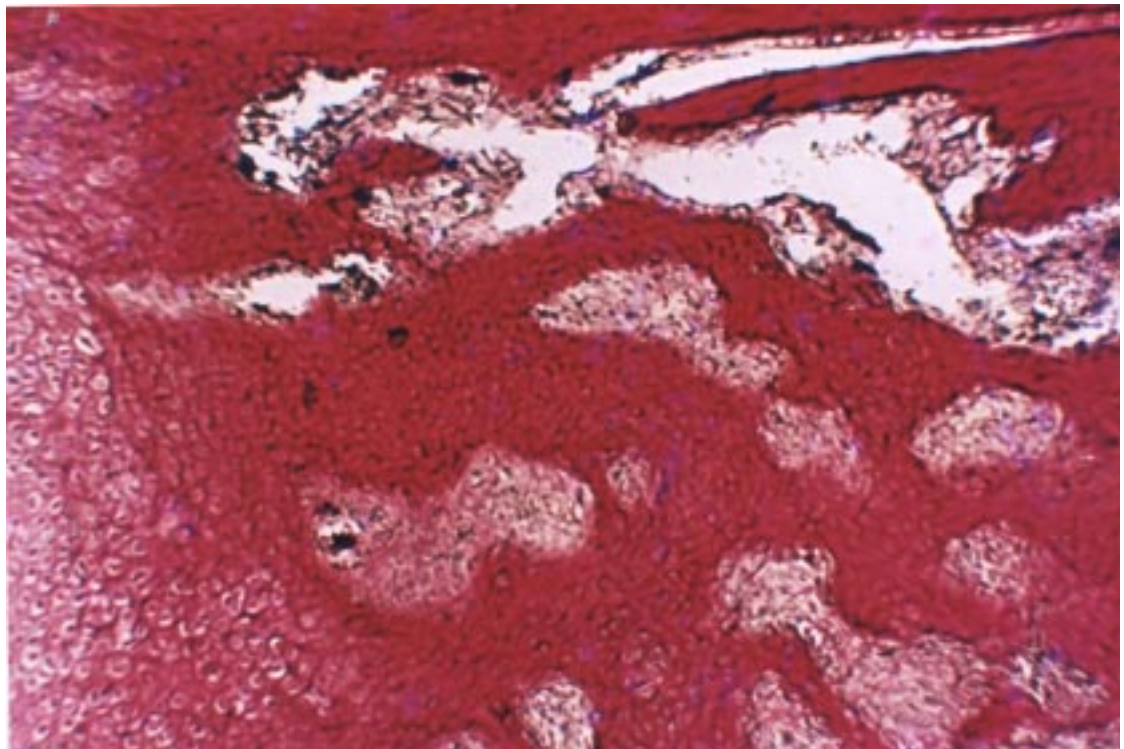


Foto n 2. Histopatología del callo de fractura.

Photo n 2. Histological view of callus.



Foto n° 3. Placa en fémur.
Photo n° 3. PC plate in femur.

DISCUSIÓN

Las alteraciones en los resultados de los estudios serológicos, representados por el aumento transitorio en los valores de las enzimas, pueden ser atribuidos al stress quirúrgico pues los mismos son similares a los hallados en el animal testigo. El posterior descenso y mantenimiento de los valores basales a mediano y largo plazo (180 días) ponen de manifiesto la ausencia de efectos tóxicos del material implantado (3, 10).

La leucocitosis neutrofilica registrada en el conejo N° 4, se asocia a la formación del absceso descrito.

Los resultados de la observación histopatológica de los diferentes órganos blanco, en contacto directo o no con el implante, tampoco mostraron signos de anormalidad.(¿)

El proceso de cicatrización ósea, evaluado por seguimiento radiológico y por estudio anatómico e histopatológico no mostró signos de anormalidad y se produjo en el tiempo esperado.

El material implantado no genera efectos tóxicos agudos o crónicos en el conejo durante el lapso de tiempo establecido en 180 días.

El material implantado no interfiere con el proceso biológico de cicatrización de los tejidos blandos y duros.

Los resultados permiten pensar en la posible utilización del PC en otras especies animales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Slatter D. Manual de cirugía en pequeñas especies. Ed McGraw-Hill Interamericana. Mexico 1997
2. Rosenberg A. Skeletal System and Soft Tissue Tumors. In Pathologic Basis of Disease. Contran R, Kumar V, Robbins S. 5th Edition, California, 1994. p. 1213-1272
3. Flecknell PA. Laboratory Animal Anaesthesia, An Introduction for research workers and technicians. Academic Press. New York 1987
4. Manning PG, Ringer DH, Newcomer CE. The biology of the laboratory rabbit. Academic Press. New York 1994
5. Flecknell PA. Post-operative analgesia in rabbits and rodents. Laboratory Animal; 1991, 20 (9): 34:37.
6. Jenkins WL. Pharmacologic aspects of analgesic drugs in animals: an overview. Jour Am Vet Med Assoc 1987, 191 (10): 123-140.
7. Schalm OW, Jain NC, Carroll EJ. Hematología Veterinaria. Hemisferio Sur Buenos Aires 1981.
8. Meyer & Harvey: El Laboratorio en Medicina Veterinaria. Interpretación y diagnóstico. Intermédica 1999
9. Haw Key CM, Dennet TB. Atlas de Hematología Veterinaria Comparada. Ed Grass 1989
10. Duncan RJ, Prasse KW. Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology. The Iowa State University Press. 1977
11. Medical Device & Diagnostic Industry. 1997
12. <http://bmewww.eng.uab.edu/BME/MORE/research-activities/labs/Corrosion/biomat.htm>
13. <http://208.135.225.38/orgs/bayer/unpro/ku/makrolon/2458.htm>

* Polymer Technology Group
^ reactivo de Drabkin
^ Reflotrom tipo IV Boehringer Mannheim