UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"LA LIOFILIZACION COMO MEDIO DE CONSERVACION DE HUESO, EN LA FORMACION DE NUEVOS BANCOS DE HUESO LIOFILIZADO"

TESIS

RAMIRO FAILLACE DE LEON

MEXICO, D. F.

1 9 5 4

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TODO A MIS PADRES:

Aquiles Faillace Mainieri.

y

Concepción de León de Faillace.

TESIS

La liofilización como medio de conservación de hueso, en la formación de nuevos bancos de hueso liofilizado.

DESARROLLO

Capítulo I. Preámbulo.
Capítulo II. Introducción.
Capítulo III. Historia.
Capítulo IV. Material, sustancias y método.
- a) Equipo desecador y su funcionamiento.
- b) Mezcla crío-química.
- c) Técnicas previas a la liofilización.
  - 1) Toma de la muestra de hueso.
  - 2) Técnicas seguidas en la preliofilización.
  - 3) Congelación del hueso preliofilizado.
  - 4) Alto vacío.
- d) Diferentes estudios del hueso liofilizado.
  - 1) De conservación.
  - e) Estudios de comparación del hueso normal con el hueso liofilizado.
    - 1) Macroscópico: { forma, tamaño, color, consistencia, poder higroscópico }
    - 2) Bacteriológico.
- f) Modificaciones sufridas por el hueso liofilizado.
  - 1) De orden Químico.
  - 2) De orden Físico.
  - 3) De orden inmunológicas.
- g) Finalidad del hueso liofilizado.

Capítulo V. Consideraciones finales.
Capítulo VI. Conclusiones.
Capítulo VII. Bibliografía.

Ramiro Faillace de León.

PREAMBULO.

Este trabajo se realizó en los laboratorios del Dr. Zapata (Atzcapotzalco), donde gentilmente me facilitaron la liofizadora de tipo experimental; en los laboratorios de Química Biológica y Bromatología; de Histología e Histopatología; y de Clínicas de la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootécnica, dependiente de la Universidad Autónoma de México.

Fué posible la realización de este trabajo, gracias a las importantes indicaciones de mis maestros que con sus bastas experiencias me encausaron en este trabajo; Señores Doctores Médicos Veterinarios Jesús Madrigal Yañez; Oscar Valdez Ornelas; Salomon Moleres; Manuel H. Sarvide; Fernando Díaz Muños; del Ing. Químico: José I. Bolivar; así como del Dr. Médico cirujano: Agustín Chardí Córdoba.

A todos ellos mi más profundo y sincero agradecimiento.

INTRODUCCION.

LIOFILIZACION.—Método de Flosdorf y Mudd, de congelar rápidamente una sustancia a una temperatura muy baja, luego deshidratación rápida al vacio de la masa congelada (1).

La desecación por liofilización es hoy la forma más moderna que existe, basándose en la deshidratación por congelamiento y alto vacio.

El término de "LIOFILIZACION DE HUESO", no esta correctamente aplicado, porque la palabra liofilización que viene del griego fácilmente soluble, es aplicable a sustancia solubles en agua, siendo el hueso una sustancia no hidrosoluble. Se seguirá en este trabajo empleando el término de liofilización de hueso para no cambiar conceptos e ideas arraigadamente familiarizadas con el proceso seguido semejante en todas las demás sustancias solubles. El término correcto sería: "Desecación de hueso por alto congelamiento y alto vacio", que este mismo procedimiento aplicado a sustancias solubles se llama con propiedad: "Liofilizacón"; seguiremos llamando ya con conocimiento de no propiedad: "Liofilización de hueso".

La experimentación en el problema de la preparación y conservación de sustancias biológicas, iniciada en lo que respecta al plasma y sueros desecados por el congelamiento y alto vacio, ha permitido sin lugar a dudas alcanzar una solución defintiva y tiene hoy en día en la práctica de la clínica y cirugía, una basta aplicación.

Tomando en cuenta los éxitos sumamente importantes y favorables obtenidos en el empleo del plasma, suero, antígenos, vacunas, antibióticos, sustancias químicas, etc., liofilizadas; hemos experimentado este mismo procedimento en huesos, es decir, que las últimas adquisiciones de importancia en lo que se refiere a la obtención de sustancias biológicas liofilizadas, hemos podido aplicarlas al hueso después de una serie de experiencias y ensayos.

La finalidad de este trabajo es contribuir a poner en conocimiento los procedimientos perfeccionados que nos han permitido obtener hueso totalmente deshidratado, y que después de reintegrarles los líquidos que han sido eliminados, conserven nuevamente todas sus propiedades o efectos biológicos sin llegar a sufrir modificaciones de importancia. Las explicaciones e indicaciones a considerar sobre las ex-

periencias efectuadas en hueso de conejo y hueso humano, he de decir, que no pretendo que hallan alcanzado a ser completas sino con esto queda habierto un basto campo de experimentación en la liofilización de hueso, para su conservación y la formación de los nuevos bancos de hueso liofilizado. Pero ya se puede emitir un juicio definitivo; "Si se puede liofilizar hueso", lo mismo que la finalidad terapéutica de los injertos homólogos y heterólogos de hueso liofilizado.

Este trabajo se complementa en su parte biológica aplicada práctica con la tesis del compañero Crisólogo Garza Chapa, con quien injertamos en conejos los huesos por series de horas de liofilización con resultados positivos favorables.

HISTORIA.

La evaporación del agua en temperaturas bajas y en el vacio produciendo congelación seguido por sublimación del hielo es tan viejo que Willian Hude Wolleston (3) fué apologético presentándolo en la sociedad real de Londres en 1813, no obstante la demostración de Wollestron tiene más interés histórico por su simplicidad y claridad demostrando la relación del vapor de agua a la temperatura baja y el efecto refrescante de la evaporación.

El profesor Joan Leslie (6) en 1850 usó un ingenioso recipiente de superficie extensa con ácido sulfúrico con el propósito de absorverle el vapor producido a la sustancia desecada, también usó como sustancia desecante el sulfato de cal anhidro.

Ehrlich (3) pudo comprobar que los sueros y algunos tipos de vacuna desecados en ambiente con ácido sulfúrico, conservan estables sus propiedades biológicas.

Martín (8) 1896 del Instituto Pasteur de París, ideó un aparato especial para poder desecar sueros y otros productos biológicos en una atmósfera caliente entre 37 grados C., a 40 grados C.

En 1911 Harris y Schakell (7) demuestran que los sueros y otras sustancias biológicas pueden ser conservados perfectamente al estado congelado y ensayan procedimientos especiales.

Más tarde 1918 F. Bordas y en 1919 Burrows y Cohn, (3) preconizan métodos para desecar productos biológicos. Años más tarde A. Rodet, Sartory, Schreffler y Kertner, (3) aplican procedimientos nuevos para desecar suero normal, aplicando el Pentóxido de fósforo como materia desecante.

Por más de 50 años se utilizó y aún se sigue usando en muchos laboratorios la desecación clásica de sustancias biológicas bajo la campana neumática o en el aparato de Scheyler, y en presencia de ácido sulfúrico, ácido metafosfórico, cloruro de calcio o de cualquier otra sustancia química deshidratante.

En 1935 se adquirieron nuevos métodos de desecación: Flosdorff y Mudd (2) estudian las propiedades del plasma humano liofilizado y más recientemente en 1944 el norteamericano Strumia y colaboradores

Mc. Claw, Reichel, Wagner, Managhan y Folson, (3) introducen novicimas técnicas para desecar por el congelamiento y el alto vacio, el plasma y suero humano, cuya aplicación y uso se ha ido ampliando hasta crear verdaderos bancos de plasma y suero liofilizado. La desecación de sueros ha tenido una importancia práctica muy grande, no sólo desde el punto de vista terapéutico, sino como método de conservación de todas clases de suero anti, en particular en su aplicación dentro de la medicina dada la gran difusión del empleo de dichos sueros en la terapéutica moderna.

Respecto al hueso, hasta hoy en América no se ha hecho ningún trabajo de liofilización, tengo comunicaciones de centros de investigación de diferentes partes de la América donde hacen notar que hasta ahora no han hechos ningún trabajo relacionado a liofilización de hueso.

Tomando como base los procedimientos indicados por los diferentes autores mencionados, combinando e introduciendo modificaciones para poder adaptarlas al hueso, hemos (13) podido obtener hueso liofilizado, es decir, en un estado físico tal que los hace completamente inalterables, siendo su conservación teórica: indefinida, a juzgar por los resultados obtenidos hasta ahora y su conservación con garantía 100% para fines terapéuticos, de años.

MATERIAL SUSTANCIAS Y METODO.

Este estudio se practicó en conejos, por ser esta especie animal la que más se presta para trabajos experimentales, por su número, costo por unidad, facilidad de manejo, alimentación, condiciones de vida y desarrollo.

La desecación de los huesos al estado liofilizado requiere sin lugar a dudas la instalación de un equipo o de una planta liofilizadora completa, reltivamente compleja y cuyo funcionamiento exige conocimientos y técnicas especiales.

EQUIPO DESECADOR Y SU FUNCIONAMIENTO.

La liofilizadora que describiré pertenece a los Laboratorios del Dr. Zapata, fué armada por ellos con fines experimentales consta de: 1).—Una bomba productora de alto vacio, es decir, capaz de suministrar sin interrupción alguna, una presión de 0.1 a 0.5 micrón de Mercurio, La bomba deberá estar en continua marcha hasta que se deseque totalmente el hueso; cuando por cualquier desperfecto se detenga la marcha de la bomba, la descongelación del hueso sometido a la desecación se hará de inmediato por falta de alto vacio, debiéndose de nuevo comenzar la operación. Para controlar el vacio producido pr la bomba se hace uso de un manómetro. Para evitar serios inconvenientes es necesario emplear bombas de construcción y garantías reconocidas. Esta bomba por medio de tubos de 12 mm., de luz interna, de hule resistente o de vidrio, se comunica con la tubuladura lateral de las trampas o frascos de Kitasato.

2).—Tanques termos o cualquier otro recipiente construido en madera o en chapa de zinc y que actúe como termo o aislador del frío, donde se colocaran las trampas o frascos de Kitasato o condensadores y que están totalmente rodeados de una mezcla crioquímica para la congelación de los vapores absorvidos por la bomba de alto vacio, para que estos vapores absorvidos no lleguen a la bomba y obstruyen su funcionamiento, la mezcla crioquímica deberá llegar a una altura de 2 cm., por debajo de la parte inferior del tubo de conexión con la bomba de vacio. Los tanques termos deberán ser construídos de doble pared, y entre estas debe existir un material que actúe como aislador como sustancias especiales, la mezcla de aserrin y corcho o lana de vidrio. Si son de madera conviene impermeabilizarlos con una capa de alquitran, pues la finalidad del termo es conservar la mezcla crioquímica por espacios de varias horas. Con respecto al tamaño, al que se

usó, tiene espacio para solo una trampa o frasco de Kitasato.

3).—Trampas, o condensadores del agua absorvida, son frascos de vidrio neutro resistente, redondas o alargadas aproximadamente de 2 litros de capacidad, con dos comunicaciones abiertas en su parte superior, una superior vertical, para conectarse con los tubos de vidrio que van a las trompas adicionales de tapones de hule bien adaptados, y otro supero-lateral que conecta con la bomba de alto vacio. Los tubos de conexión de hule, goma o de vidrio deberán ser amplios en su diámetro interno, para que la fuerza del vacio no tenga que vencer codos y obstáculos, porque determinarían una mayor resistencia a los vapores y obligarían a la bomba a trabajar más con mayor dificultad y con rendimiento menor.

4).—Trompas, que comunican con tubos de hule, goma o vidrio con la trampa, llevan apéndices en número variable, 6 a 12 por donde se comunican con los frascos que contienen el hueso a liofilizar por tubos de goma de tamaño pequeño de 5 cm.

5).—Recipientes o frascos de vidrio neutro o ampollas de vidrio neutro resistentes a las bajas presiones, donde se congela y se someten a la desecación los huesos, estos frascos pueden ser de distinto tamaño y capacidad según el largo y tamaño del hueso a liofilizar. Para este trabajo se usaron frascos de vidrio neutro, cuya finalidad era contener antibióticos, de 25 cc., de capacidad. Todos los frascos antes de ser utilizados, deberan ser probados al alto vacio, lavados y esterilizados.

También es necesario: una charola de acero inoxidable, de capacidad variable donde se hace el congelamiento de los huesos que están dentro de los frascos; pipetas; soportes metálicos; matraz de 250 cc., con 200 de agua destilada estéril libre de pirógenos, que además contenga 200.000 unidades de Penicilina sódica o potásica exclusivamente cristalina, y un cuarto de gramos de dihidro-estreptomicina: (en sustitución del agua destilada estéril se puede usar para posteriores investigaciones, suero homólogo, figrinógeno etc. (13).

MEZCLA CRIO-QU'IMICA.

La mejor mezcla crioquímica empleada para producir temperaturas bajas para congelar brusca y rápidamente los huesos que se van ha desecar, es la que se prepara con etanol y anhidrido-carbónico sólido, también llamado hielo seco; por tener la propiedad de no mojar los

cuerpos, de no dejar residuo alguno, alcanzar las temperaturas bajas y conservar la temperatura baja por más tiempo, hacer la congelación más rápida, produciendo desensos de —60 a —80 grados C. El anhidrido carbónico sólido o hielo seco, tiene mucha aplicación hoy en día y se le puede adquirir fácilmente en el comercio. La mezcla con el alcohol de alta graduación produce desensos de temperatura comprendidas entre —80 a —85 grados C. En este líquido volatil, el hielo seco lentamente se va fundiendo con producción de abundantes burbujas gaseosas, siendo la mezcla sumamente fría y las manos del operador no pueden soportar semejante desenso, debiendo usar guantes especiales.

Existen otros diferentes medios de congelación no usados en este trabajo por no llenar los requisitos necesarios como son: bajar la temperatura brusca y rápidamente, alcanzar temperaturas muy bajas, sostener esa temperatura por más tiempo, no dejar residuo, no mojar los cuerpos, no ser peligroso para el operador. Entre estos medio tenemos el uso de hielo seco sólo, hielo húmedo solo, y congeladoras eléctricas. (3).

Se puede obtener también una buena mezcla crioquímica con una acción más enérgica, mezclando hielo seco con cualquier líquido volátil como es el eter sulfúrico y el alcohol etílico; (3) con este último cuerpo llega a alcanzar temperaturas muy bajas de —85 a —95 grados C., a la presión atmosférica ordinaria y hasta —125 grados C., en el vacio. Con el eter sulfúrico alcanza temperaturas de -95 a -100 grados C., mezcla que se conoce con el nombre de "Mezcla crioquímica de Thilorier. (3)

TECNICAS PREVIAS A LA LIOFILIZACION.

TOMA DE LA MUESTRA DE HUESO.—De conejo de un completo buen estado de salud, se hizo la toma con técnicas quirúrgicas generales conocidas, con rigurosa asepsia y colocados en frascos con tapón de hule reversible. A cada conejo donador se le llevó hoja de control, describo una:

Conejo No. 1.
Especie: Lepórido.
Raza: Chinchilla.
Sexo: Macho.
Edad: 18 meses.
Color: Propio de la raza.

Constantes Fisiológicas: T. 38.5 R. 60 P. 120
Peso: 2 kilos.
Alimentación: Alfalfa y salvado de trigo.
Antecedentes no patológicos: Ninguno.
Antecedentes Patológicos: Ninguno.
Examen clínico antes de la operación: Aparentemente normal.
Examen clínico durante la operación: Aparentemente Normal.
Examen clínico de los huesos donados (tibia y fémur): Aparentemente Normal.
Examen Necróptico de las viseras y demás tejidos: Aparentemente Normal.
Diáfisis del fémur derecho: se tomaron 4 fragmentos en media caña.
Diáfisis del fémur izquierdo: Se tomaron 4 fragmentos.
Diáfisis de la tibia izquierda: Se tomaron 2 fragmentos.
Diáfisis de la tibia derecha: Se tomaron 2 fragmentos.
Cada frasco contiene un fragmento de hueso numerado en orden sucesivo.

Tiempo de la operación empleado en la toma del hueso del donador: 1 hora.

Tiempo transcurrido entre la operación y el comienzo de la liofilización: 3 horas (mientras menos tiempo transcurra en este lapso será mucho mejor, porque estará el hueso menos tiempo en comunicación con el medio exterior y la temperatura ambiente traduciéndose eso en mejor garantía de su conservación y aplicación terapéutica).

Cantidad de agua destilada estéril libre de pirógenos con antibióticos adicionada a cada frasco: 1 CC.

Tiempo de congelación mínimo preliofilización: 12 minutos.

Tiempo que duró la liofilización: se hicieron series de hueso a cada 12 horas hasta obtener hueso de 72 horas de liofilización.

Tiempo empleado en tapar, hacer el vacio y troquelar cada serie: 3 minutos.

Tiempo en que comienzan las observaciones subsiguientes ∴ X...

Todas las operaciones se hacen bajo la lámpara de rayos ultravioletas.

TECNICA SEGUIDA EN LA LIOFILIZACION.

Una vez tomada la muestra de hueso y colocada en su frasco con tapon de hule reversible, se le inyectan o pipetean una cantidad de agua estéril destilada con antibióticos a cada frasco, de manera que

al acostarlo, el hueso quede completamente bañado y dentro del agua, en este caso fué de 1 a 2 cc. La adición de agua al hueso, se hace con el objeto de servir como medio para una mayor, más rápida y más uniforme congelación del hueso.

CONGELACION DEL HUESO PRELIOFILIZACION.

En una charola de metal (acero inoxidable) se colocan los frascos conteniendo los huesos, de manera que el gran eje del hueso quede en línea horizontal para que la cantidad de agua dentro del frasco, bañe todo el hueso en su longitud y en su grosor y para que la mezcla crioquímica tenga superficie mayor de acción congeladora sobre el hueso. Se vierte etanol en la cantidad suficiente como para cubrir más de la mitad del frasco que contiene el hueso, agregándose pequeños trozos de hielo seco, inmediatamente se produce un intenso burbujeo y desprendimientos de abundantes vapores fríos gaseosos, y al mismo tiempo la mezcla crioquímica va alcanzando temperaturas cada vez menores hasta llegar a los 10 minutos a una temperatura de ---80 a ---85ºC. Las sustancias líquidas se congelan a los 8 a 10 minutos, el tiempo mínimo para los huesos fué de 12 minutos. Cuando se encuentra totalmente congelado, es decir, que ha alcanzado el índice o punto crítico de congelación total, fenómeno que ocurre cuando llega a una temperatura de -50 a -60 grados C., se oye un crujido característico como si estallara o rajara el vidrio, que en realidad es producido nada más por la dilatación y la expansión brusca de la masa congelada: se conoce también por la formación en el interior del frasco de una capa blanca de nieve.

Una vez que la mezcla crioquímica ha sido empleada se espera que el alcohol vuelva a adquirir la temperatura normal, cosa que ocurre a las dos o tres horas, se filtra a traves de pasta de amianto o tierra de infusorios, se guarda en un frasco bien tapado cuidando de ajustar bien el tapón porque el desprendimiento gaseoso de anhidrido carbónico es siempre abundante y capaz no solamente de levantar el tapón, sino hacer estallar el recipiente. El alcohol filtrado puede usarse varias veces, agregándole trocitos de hielo se vuelve a obtener la mezcla congelante (3).

El tiempo que tardan en congelarse las distintas substancias biológicas para congelarse y alcanzar su punto crioscópico y de congelación total en el mecanismo de preliofilización, dependen de una serie de factores y de consideraciones físico-químicas: existe una relación muy es-

trieta entre la concentración molecular y el descenso del punto de congelación o crioscó-pico de una substancia determinada; este fenómeno tiene mucha importancia cuando se va a congelar substancias para transformarlas en liofilizadas. Los líquidos orgánicos o las emulsiones de tejido que se desecan mediante el congelamiento y el alto vacío, poseen una presión osmótica y un índice crioscópico bajo, cuando mayor es la proporción de electrolitos y de partículas disociadas que tienen en suspensión. El descenso del punto criscópico de las substancias biológicas es siempre proporcional a la concentración de estas mismas substancias y de los cuerpos electrolitos que contengan, se comprenderá que el punto de congelación del suero de los plasmas en general, de las emulsiones bacterianas y de los tejidos virulentos, dependen del contenido de electrolitos; el índice crioscópico es entonces más bajo de lo que debiera ser normalmente, ya que por la disociación electrolítica, el número de elementos crioscópico está también aumentados, en razón de que crioscópicamente cada molécula disociada da dos iones equivalentes a dos moléculas. El grado de temperatura en que comienza la congelación de una substancia orgánica se denomina "Indice o punto crioscópico" y el grado de temperatura a que termina la congelación se denomina "Indice o punto de congelación total". Este último índice se conoce por el crujido característico que produce la masa congelada dilatada y expandida. La concentración molecular según se dijo esta en proporción directa con la temperatura de congelamiento y con el tiempo. Las soluciones fisiológicas que con relativa frecuencia se agregan a las vacunas microbianas, virus, plasma o a los sueros, para hacerlos más líquidos e isotónicos, aumentan por lo que se acaba de manifestar el tiempo de congelamiento. En efecto, el hueso con agua destilada o mejor aún bidestilada, se congela mucho más rápido que el mismo hueso en solución fisiológica; de ahí la importancia que juega el vehículo que se emplee para suspender las substancias biológicas que han de congelarse para después ser desecadas.

Cada substancia tiene su grado crioscópico y de congelación total y si bien es cierto que el soluto retarda el fenómeno de la congelación no lo anula. También el grado de concentración de las proteinas y lípidos modifican notablemente el tiempo y la temperatura de congelamiento. Lo mismo que la congelación es capaz de modificar las relaciones Glubulina/albumina, en las diferentes partes de las substancias sometidas a la congelación.

Las substancias biológicas en general llegan a congelarse a —0.60 a —0.65 grados C. sin alcanzar nunca a 1 grado C. bajo cero. La temperatura del líquido a congelar deciende prontamente hasta alcanzar su índice crioscópico y cuando está totalmente congelado, la temperatura de congelación queda fija , es decir que se mantiene en su punto crítico.

Factores que juegan un papel importante en el tiempo de congelación: El Contenido en agua, sales minerales, substancias fijas.

El espesor de la capa de las substancias a congelar, cuanto más delgada es, tanto más rápido se obtiene.

El espesor de las paredes del recipiente de vidrio donde se congela el hueso, cuanto más delgada es, más pronto llega el frío a la capa de la substancia a congelar.

Mientras menos se mueva la substancia a congelar, es mejor, a fin de permitir un contacto prolongado de la substancia a las paredes frías del recipiente.

Una vez que el hueso a liofilizar está totalmente congelado y recido junto con el agua a una masa compacta, es decir, que ha alcanzado su grado de congelación total, se conecta a la fuerza eléctrica la bomba de vacío, checándose su funcionamiento; en estas condiciones y con la bomba en marcha se retiran los frascos que contienen el hueso de la mezcla congelante, se lava por fuera con alcohol, se secan a fin de que el alcohol evaporado, forme una capa aisladora alrededor del frasco y no pueda condesarse el vapor atmosférico, e inmediatamente se ponen en comunicación con los apéndices de hule de las trompas, la bomba sigue en marcha; estas maniobras se harán lo más rápidamente posibles para evitar que el hueso se descongele y tenga que comenzarse de nuevo la operación.

En cuanto se produce el alto vacío necesario para mantener congelada toda la masa del hueso a desecar, las paredes externas del frasco se van cubriendo progresivamente de nieve, es decir de vapor de agua atmosférico condensado. Es entonces cuando comienza la verdadera deshidratación del hueso y a medida que va perdiendo agua de constitución, el vapor de agua atmosférico condensado sobre las paredes del frasco se va licuando. Asi haciéndose el vacío, permanecieron los huesos: 12, 24, etc., hasta llegar a tener de 72 horas de continua liofilización por 6 series de 6 frascos cada serie. Cuando ha llegado el término de la deshidratación total, fenómeno que ocurre como mínimo entre 10 y 12 horas, el frasco conteniendo el hueso ha perdido por completo

su capa de nieve, se presenta seco y con una temperautra igual a la del ambiente.

Un buen procedimiento para conocer si todavía pasa vapor de agua del frasco que contiene el hueso a la trampa o frasco de Kitasato, consiste: en aplicar durante un rato (1 minuto) sobre las paredes de este último un trozo de hielo seco, si pasa vapor de agua, por contacto con las paredes frías del tubo de conección, se condensa; si este fenómeno no llega a producirse, se da por terminada la desecación.

Se detiene la marcha de la bomba, se desconectan los frascos que contienen el hueso liofilizado de los apéndices de hule de la trompa y rápidamente se tapan con tapones reversibles de hule y lo más pronto posible se les hace el vacío con una máquina aparte, introduciéndoles una aguja gruesa estéril, este vacío también ha de ser perfecto, todas estas maniobras se harán bajo la lámpara de rayos ultravioleta; se troquelan y se etiquetan anotando: No. del conejo donador, clase de hueso, fecha de la toma, horas de liofilización, fecha de liofilización, hora y fecha en que comienzan las siguientes observaciones.

El tiempo que es necesario emplear para desecar completamente las substancias biológicas, para poder obtenerlas al estado liofilizado dependen de una serie de factores:

1.—Contenido en agua: cuanto menos agua de constitución o de suspensión tengan, menos tiempo se emplea.

2.—Espesor del hueso, cuanto menos espesor tenga el hueso congelado, tanto más rápido se liofilzará.

3.—Tamaño, (largo y grueso) del hueso. Mientras más grande es el hueso más tiempo tardará en liofilizarse.

4.—Mientras más sublime es la substancia líquida adicionada al hueso, tanto más rápida será la liofilización.

5.—Poder de aspiración y alto vacío que produce la bomba. Cuanto mayor poder de aspiración y más alto vacío produzca la bomba, tanto más rápido se producirá la deshidratación.

ALTO VACIO

El alto vacío para poder liofilizar completamente es uno de los factores de más importancia. Solo es proporcionado mediante el funcionamiento continuo de ciertos aparatos especiales, es decir bombas aspirantes que permitan alcanzar presiones finales comprendidas entre el milésimo y el diezmillonésimo de milímetro de Hg (10^{-3} y 10^{-7}). Al

comenzar su marcha debe producir un vacío que se denominará "Preliminar" y una disminución de la presión a fin de poder aspirar los gases encerrados en el frasco.

Los vacíos finales que se obtienen con las distintas bombas son los siguientes:

Trompa de agua, vacío hasta 10 mm (10^{-1}).

Bomba rotativa al aceite de un cuerpo, vacío hasta 0.002 ($2X10^{-3}$).

Bomba rotativa al aceite de dos cuerpos vacío hasta 0.00001 (10^{-5}).

Bomba de difusión de vavor de mercurio, vacío hasta 0.000001 (10^{-6}).

Bomba de difusión al aceite, vacío hasta 0.0000001 (10^{-7}).

Lagmuir ha definido el alto vacío como: una presión igual o menor a un vacío próximo a 10^{-7} mm de mercurio.

En los EE. UU. para poder medir el vacío emplean como unidad C.G.S. A la barye, que es la presión de un dina sobre un cm. cuadrado pero con más frecuencia se usa el milímetro de mercurio.

La relación que exicte entre la barye y el mm de mercurio es la siguiente: 0.001 mm de mercurio es igual a 1.342 barye.

1 mm de mercurio es igual a 1.342 barye y 0.000745 mm de mercurio es igual a 1 barye.

Características de una buena bomba de vacío:

1.—Capacidad para producir una presión inicial o vacío preliminar a partir del mismo momento en que entra a funcionar.

2.—Velocidad de capacidad para poder efectuar el vacío y presión límite capaz de llegar cuando esta funcionando a su máximo total de vacío.

3.—Gran volumen de aspiración.

4.—Funcionamiento continuo por largo tiempo.

DIFERENTES ESTUDIOS DEL HUESO LIOFILIZADO

De Conservación.

Los huesos liofilizados conservados al vacío de cada serie de horas de liofilización, se mantuvieron por espacio de 4 a 6 meses al medio ambiente en lugar fresco, en un promedio de temperatura de 16 grados C. Resultados: todos se conservaron perfectamente bien sin alteraciones visibles tanto en invasión de gérmenes, formación de colonias, de descomposición, de hidratación, injertándose en conejos vivos con resultados positivos de fijación y tolerancia total del animal.

Otros huesos liofilizados de cada serie se conservaron por el mismo

tiempo en el medio ambiente en lugar caluroso, temperatura media de 22 grados C.; y acción por horas de los rayos solares. Resultados: todos resultaron iguales al anterior, perfectamente bien.

Otros huesos liofilizados de cada serie conservados por el mismo tiempo en refrigerador eléctrico con temperatura media de 2 a 7 grados C. Resultados: iguales que los anteriores.

ESTUDIOS EN COMPARACION CON EL HUESO NORMAL FRESCO DE HUESO LIOFILIZADO DE CADA SERIE DE HORAS DE LIOFILIZACION

Macroscópico.

a). Forma: todos los huesos de diferentes horas de liofilización conservaron íntegramente su forma primitiva, se tomaron los huesos de tibia y femur, las partes diafisiarias, convi rtiéndose en medias cañas de la forma del hueso; esas mismas características se conservaron después de la liofilización en todas las series de huesos.

b).—Tamaño.—De un largo de 2 a 3 cm., de un ancho de 1 a 1½ cm., de grosor natural, fue conservado íntegramente después de la liofilización en todas las series.

c).—Color.—El color del hueso fresco es blanco, ligeramente amarillento de un matiz fijo y de color propio, después de la liofilización todas las series conservaron estas mismas características, tal vez pueda decirse que por la extracción de los lípidos hacia el exterior de los huesos, estos manifestaron el mismo blanco, pero ligeramente aumentando el amarillo.

d).—Consistencia.—El hueso fresco tiene una consistencia dura resistente a la presión moderada y a un tiramiento, no facilmente rompible. El hueso liofilizado de todas las horas es también duro pero quebradizo a la presión y al tiramiento, es un cuerpo seco poroso que al tiramiento se rompe en varios pedazos irregulares, al barreno presentó mayor resistencia que el normal.

e).—Poder Higroscópico.—Como en la liofilización se extrajo toda el agua de imbibición y de constitución, a manera de dejar una materia seca, el hueso asi en estas condiciones tiene una gran avidez por los líquidos, hidratándose inmediatamente al estar en contacto con la atmósfera del medio ambiente, y sobre todo en los tejidos vivos se hidrata rápidamente con el plasma, sangre, linfa del lugar del injerto, volviendo a las características de un hueso fresco normal.

ESTUDIO BACTERIOLOGICO

Flora del hueso liofilizado.—Es de gran importancia el control de asepsia del hueso liofilizado, pues su finalidad es injertarlo en roganismos vivos y debe de ir libre de cualquier clase de gérmenes.

Se tomó, un frasco con hueso de cada serie de horas de liofilización conservados al vacío, en medio ambiente lugar caluroso temperatura media de 22 grados C. durante 4 a 6 meses; a cada frasco, en condiciones de estricta asepsia se le inyectó 5 cc. de caldo maltosa, agitándose de 2 a 3 minutos, se siembra ese caldo maltosa, poniendo 1 cc. a cada tubo de ensaye conteniendo los siguientes medios, aerobios: 1).—gelosa sangre, 2).—caldo maltosa, 3).—gelosa triptosa, y medios anaerobios; 4).—tioglicolota de sodio, 5).—caldo hígado corazón, 6.—y el propio hueso en su frasco. Se llevan a la estufa a 37 grados C. observándose cada 12 horas. Resultados: a las primeras 12 horas no mostró ningún medio nada de desarrollo de cultivos de gérmenes, a las 24 horas, 36, 48, 60, 72, 84 horas que se dió por finalizado el exámen, en ningún medio de ningún hueso de todas las series presentaban desarrollo de gérmenes, corroborándose que todas las manipulaciones del hueso desde la toma hasta su conservación, fueron asépticas, se lleva una seguridad absoluta de asepsia para los injertos en vivo.

MODIFICACIONES SUFRIDAS POR EL HUESO EN EL PROCESO DE LIOFILIZACION

Los cambios que se verifican en el hueso durante la liofilización se agrupan en: 1).—modificaciones de orden Físico, 2).—modificaciones de orden Químico, 3).—modificaciones de orden inmunológico, finalmente pueden ser considerados como pérdidas de la actividad biológica.

MODIFICACIONES DE ORDEN FISICO

Se ha manifestado en líneas anteriores que la substancia liofilizada se caracteriza por presentarse al exámen microscópico perfectamente seca, porosa. Cuando esta completamente deshidratado, es decir que el agua de constitución ha sido totalmente eliminada por el congelamiento y el alto vacío, conservan completamente bien su forma y no como los productos biológicos que se reducen a polvo fino o escamas de regular tamaño, la trama ósea es bastante resistente conservando su dureza des-

pués de liofilizado. Ni aún agitando perfectamente el frasco que contiene el hueso liofilizado no es posible hacerlo cambiar de forma o estructura.

Respecto al color de la substancia ósea liofilizada se dirá que debido a la eliminación del agua el color se acentúa un poco dando un matiz fijo amarillo blanquisco.

Observando el hueso liofilizado con mayor aumento, se presenta como una masa morfa, surcada por innumerables trayectos o poros, dejados por el agua evaporada, otras veces y otras clases de huesos toman el aspecto de esponjoso.

En lo que respecta al pH, con la deshidratación se hace más alcalino que el normal, en la mayoría de los huesos, liofilizados nos dió un pH promedio de 7.8 a 8. con la reincorporación de agua destilada o mejor aún bidestilada, plasma, o sangre directa en el momento del injerto, el pH vuelve a la normalidad es decir al punto inicial.

La carga eléctrica como la conductibilidad desaparece totalmente del hueso liofilizado y con el agregado de agua dibestilada, la carga eléctrica y el punto isoeléctrico de las proteinas no vuelve hacer el mismo se ha constatado siempre una disminución de los mismos.

MODIFICACION DE ORDEN QUIMICO

En general la constitución química es estable, una vez que han sido privados en absoluto del agua de constitución. La deshidratación) del hueso mediante el congelaminto y el alto vacío hace concentrar notablemente a todos los elementos orgánicos y minerales al punto que, se presentan entonces como una masa seca porosa. La mayoría de las substancias químicas que se encuentran constituyendo el hueso estan como se sabe al estado coloidal y son hidrófilos, tienen la propiedad de fijar el agua, lo que equivale a decir que son facilmente hidratables y pueden adquirir nuevamente sus propiedades coloidales una vez que se han incorporado los líquidos necesarios y compatibles con los fenómenos físico-químicos vitales.

El agua de imbibición coloidal tan necesaria por cierto para el cumplimiento de todos los procesos vitales, puede eliminarse por completo de la substancia orgánica y minerales y pueden nuevamente incorporarse a todas las substancias liofilizadas.

El equilibrio osmótico, la absorción, la reversibilidad, la imbibición, la tensión superficial, la carga eléctrica, el proceso de la precipitación y de la floculación y otros fenómenos más de orden físico-químico, se

vuelven a poner de manifiesto en los huesos que habiendo sido lifilizados se les reintegran sus líquidos normales.

En lo que se refiere a las proteinas contenidas en los huesos liofilizados no sufren modificaciones químicas. Su concentración, claro está, aumentada en el hueso liofilizado, pero al agregarse los líquidos en volumen igual a la eliminada en la deshidratación, el tenor vuelve a la normalidad.

Los ácidos aminados, los polipéptidos, el nitrógeno total y no protéico, no se modifican tampoco. Si se hace un dosaje de todos estos compuestos químicos antes de la liofilización y otro después se verá que son iguales e idénticos.

La glucosa y otros hidratos de carbono, disminuyen en los huesos liofilizados. El congelamiento y la desecación parece ser que actúan como agentes glicolíticos y a la disminución de la glucosa, sigue un aumento del ácido láctico.

La adición de glucosa a las substancias biológicas que se van a liofilizar se ha comprobado que aumenta el tiempo de conservación será bueno que para las próximas investigaciones se haga esto con el hueso.

Los lípidos se mantienen perfectamente estables sin sufrir ningún cambio. El colesterol, la lecitina, las grasas totales neutras, los fosfolípodos, los cerebrócidos, etc., en los dosajes que se han efectuado antes y después de la liofilización han resultado sensiblemente iguales.

En lo que respecta al sodio y al potasio si sufren cambios químicos evidentes, la deshidratación modifica no solamente su concentración sino también su estado químico.

El calcio y el magnesio no sufren modificaciones con la desecación su tenor se mantiene igual, tanto cuantitativa como cualitativamente, lo mismo, puede decirse del fósforo.

Desde el punto de vista químico y de una manera general se puede decir que los huesos liofilizados no alteran sus propiedades químicas ni sufren cambios de importancia. Los componentes químicos tienen practicamente formas idénticas a los huesos frescos y diré que la liofilización no desnaturaliza las proteinas los hidratos de carbono, y los lípidos.

MODIFICACIONES DE ORDEN INMUNOLOGICAS

Las propiedades inmunológicas principalmente las antigénicas protectoras y virulentas del hueso y demás propiedades que como entidad biológica pudiera llevar, no sufre modificaciones algunas.

LA FINALIDAD DEL HUESO LIOFILIZADO ES DE SERVIR COMO INJERTO OSEO TANTO HOMOLOGO COMO HETEROLOGO, EN SUSTITUCION DEL INJERTO OSEO FRESCO.

El injerto de hueso liofilizado se puede emplear en:(5)

1).—Constituir un medio de fijación de una fractura.
2).—Provocar la osteogénesis en una unión blanda diafisiaria.
3).—Determinar una artrodesis.
4).—Constituir una artrorrisis.
5).—Desrtuir el equilibrio patológico algiagénico, en un lugar del sistema conjuntivo rígido.
6).—Llenar espacios óseos determinados por un vaciamiento quirúrgicos en los casos de distomas no malignos.
7).—Reformar el hueso.
8).—Modificar una desviación ósea.
9).—Detener el crecimiento diafisiario que se hace a expensas de una parálisis fértil.
10).—Aliviar por su implantación vecinal una artropatía.
11).—Estabilizar dos huesos distantes.
12).—Detener una ostoelistosis.
13).—Para hacer roma una presión dolorosa.
14).—Para fines de cirugía plástica (mentón o la nariz)
15).—Para promover una función articular.
16).—Para substituir tejido óseo perdido.

CONSIDERACIONES FINALES

Los procedimientos de desecación indicados por Geneste y Herscher (3) en presencia de ácido sulfúrico, fosfórico o de cualquier otra substancia deshidratante; la desecacóin a una temperatura determinada y en presencia de una corriente de gas estéril, adoptada por Sartory y Scheffler(3); la desecación por medio de la pulverización en cámara caliente a 40 grados C. o por una corriente de aire en capas finas, indicadas por Neuster y Spray(3), son procedimientos, unos lentos y de escaso rendimiento; y otros, no pueden ser aplicados al hueso como, substancia biológica al que alteran propiedades que son precisamente las que interesa conservar.

La liofilización consiste en una técnica especial basada en la congelación brusca y rápida en sus frascos definitivos y a temperaturas extremadamente bajas, lográndose con ello, no solamente fijar todos los elementos orgánicos en su estado coloidal original, convirtiéndolos en estado seco, poroso y con una mínima alteración celular.

Los huesos guardados o conservados en los actuales bancos de hueso fresco, tienen como se sabe un límite de actividad, ya que el hueso conservado por las técnicas actuales generales aceptadas, parecen sufrir algunos cambios químicos no deseados para el almacenamiento prolongado. Speed y Smith (14) han observado grandes cambios de coloración, pérdida de elasticidad y aspecto de sequedad en un hueso almacenado tan poco tiempo como 3 meses.

Es conveniente que todo el material sea sometido a la esterilización rigurosa antes de ser empleados en el trabajo.

En la toma del hueso de conejo en vivo, se seguirán técnicas de escrupulosa asepsia.

La adición de antibióticos al hueso en la preliofilización, está indicada para destruir gérmenes posibles existentes.

No es conveniente la adición de cualquier antiséptico volátil como el éter sulfúrico, formol, cloroformo, etc., que aunque desaparecen totalmente y son eliminados en el proceso de la liofilización, si pueden influir en la célula ósea en su potencialidad de vida que se pretende conservar como tal liofilización (11).

El hueso que se va a liofilizar no deberá estar suspendido en glicerina, pues dificulta enormemente el congelamiento; podrá usarse otras substancias que han sido liofilizadas y como vehículo de suspensión(9).

Quedan en el presente trabajo sentadas las bases para investigacio-

nes ulteriores, así como reflejados todos los resultantes que hemos (13) obtenido hasta ahora en lo que se refiere a la liofilización de hueso.

Espero que en la práctica diaria en nuestra profesión, la aplicación del hueso liofilizado con fines terapéuticos dé resultados ampliamente satisfactorios, y venga asi a constituir una exigencia más en Medicina Veterinaria que avanza diariamente en busca de novísimas directivas y de conquistas en el vasto campo de la experimentación.

CONCLUSIONES

1).—"SI SE PUEDE LIOFILIZAR HUESO".—Se liofilizó hueso de conejo, tibia y femur, comprendidos entre 6 a 18 meses de edad, de 5 cm. de largo por 2 a 3 de ancho y de grueso natural, en media caña; asi como hueso humano de un individou de 24 años de edad, tibias, sexo femenino, de 20 cm. de largo, por 5 de ancho y grueso natural, todos con un tiempo mínimo de liofilización de 12 horas. Tiempo de congelación preliofilización fue de 12 minutos mínimos.

2).—La deshidratación completa del hueso mediante el congelamiento y el alto vacío, constituye sin lugar a dudas, el procedimiento de más valor práctico, no solamente para la conservación, sino para la aplicación terapéutica en Medicina Operatoria.

3).—La desecación por el congelamiento y el alto vacío, conduce solamente a suprimir por completo el agua (líquido, elemento donde se vehículizan als substancias orgánicas y minerales).

4).—La falta de agua no condiciona necesariamente la modificación de las substancias químicas; ya que el estado Liófilo es un estado físico, cuyo mecanismo no altera ni modifica la estructura molecular de las proteinas, glúcidos y lípidos.

5).—La mayoría de los cirujanos prefieren no usar hueso almacenado por más de 6 meses a 1 año, en las condiciones de los bancos de hueso fresco actuales(14); mientras que los huesos liofilizados tienen una duración de actividad biológica ilimitada.

6).—Los huesos liofilizados vuelven a la normalidad en constitución y propiedades al momento de agregarles los liquídos perdidos, ya sea por medio de agua destilada, bidestilada, suero homólogo, fibrinógeno o sangre de la misma herida en el momento de hacer el injerto.

7).—Los huesos liofilizados pueden conservarse en cualquier lugar por caluroso o frío que sea sin perder sus propiedades.

8).—Prestan mayor facilidad para el manejo y el transporte, simplificando en mucho la tarea del médica en cualquire medio.

9).—Facilitan su almacenamiento por mayor tiempo, que con los procedimientos actuales de los bancos de hueso fresco, prolongándose teóricamente hasta hacerse indefinido.

10).—Pocos cambios químicos y ninguno de importancia sufre el hueso que pueda dañar sus propiedades biológicas tanto durante el procedimiento de la liofilización como durante la conservación.

BILIOGRAFIA

1).—L. Cardenal: Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas, cuarta edición. 1952. Pág. 749. Editorial Salvat, S. A.

2).—Earl W. Flosdorf: Freeze-Drying. (Drying By Sublimation) Reinhold-Publishing Corporation. 1949. 330 West. Forty Second st, New York. 18 U.S.A.

3).—Dr. Carlos Alberto Stura: Técnica para desecar y liofilizar por el congelamiento y el alto vacío. Apartado del boletín Técnico No. 11 de la dirección General de Ganadería. Dirección general de Patología Animal. Ministerio de Agricultura de la Nación. Rep. Argentina. 1944.

4).—Revista de Medicina Veterinaria (Sociedad de Medicina Veterinaria) Buenos Aires Argentina, Volumen 34- No. 1. Pág: 45 y Sig. 1952.

5).—Revista Médica del Hospital General (Sociedad Médica del hospital General) volumen XVI, Mayo 1953. No. 5. Pág: 287 y sig.

6).—Enrique de Anda Fernández: Estudio sobre la preparación de la sero-globulina específica Anti-pertusis Liofilizada, tesis de la Esculea Nac. de Ciencias Químicas de la U.N.A. de México. 1949.

7).—Raquel Cervera López: Liofilización de la Alexina previamente estabilizada. Tesis de la Esc. Nac. de Ciencias Químicas de la U.N.A. de México. 1946.

8).—La vacuna Liofilizada contra la Brucelosis, preparada con la Brucella Abortus, cepa 19-W, tesis por Elsa Juárez Badillo de la Facultad de Química Berzelius de la U.N.A. de México. 1952.

9).—G. W Hyatt, LCDR, M C, USN;
T. C. Turner, LTJG, MC, USN.
C. A. L. Bassett, LTJG, MC. USN;
J. W. Pate. LTJC. MC. USN;
Pn. Sawyer. LTJG. MC. USN.
New, Methods, For Preserwing Bone, Skin, and Blood Vesseds. (Fron the Tissue Bank, Naval, Medical School, Naval medical Research. institute, and Naval Hospital, Bethesda Maryland). Reprinted frond the September 1952. Vol. 12. No. 3. issue of Post graduate Medicine.

10).—Dr. César Seisdedos Ramos: Liofilización, su importancia y ventajas. (Instituto de investigaciones veterinarias de la Rep. de Chile). Apartado de la revista de Agricultura. 1947. Pág: 192 y Sig.

11).—Kolmer y Boener. 1943. Métodos de laboratorio clínico. Pág. 620, 623, 655. Ed. the U. S. I. N. Y. EE. UU.

12).—Strumia. M. M., Mac. Craw, J. J. Riechel. J. 1941. Preparatión and preservation of human plasma, collection of Blood and separation of plasma, Amer. Jour. Clin. Path. 11. 175.

13).—Comunicaciones personales de los Drs. Oscar Valdéz Ornelas, Agustín Chardí Córdoba, Ing. Químico: Bolivar.

14).—The Use of Preserved Tissues in Suegery.
By: T. C. Turner Lieutemant, MC, USNR,
C. A. L. Bassett LTJG, MC. USNR.
J. W. Pate LTJG. MC. USNR.
P. N. Sawyer Lieutenant, MC, USN.
Lecture and Research Institute National Naval Medical. Center Bethesda, Maryland.
17 de April de 1952.

15).—Fundamentals in the Use and Preservation of Homogenous Bone. By: George W. Haytt, Lieutemant, MC, USN. Orthopedic Service, U. S. Naval Hospital, National Naval Medical Center, Bethesda, Md.

16).—The preservation and Clinical Use of Freeze-Dried Bone. By: Captain F. P. Kreuz, Lieutemant G. W. Haytt, Lietenant, j. g. Thimas C. Turner, and Lietenant, j. g. Andrew L. Bassett, Medical Corps. United Stats Navy.
(Reprinted from the Journal of Bone Joint Surgery. Vol. 33-A, No. 4. pp. 863-873, October, 1951.

RAMIRO FAILLACE DE LEON