



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma  
de Barcelona

Tesis Doctoral

**REFINAMIENTO ANESTÉSICO EN UN MODELO DE  
DEFECTO ÓSEO SEGMENTARIO DIAFISIARIO EN OVEJA**

**Marielle Esteves Coelho**

**2015**







**Tesis Doctoral**

**REFINAMIENTO ANESTÉSICO EN UN MODELO DE  
DEFECTO ÓSEO SEGMENTARIO DIAFISIARIO EN OVEJA**

Tesis doctoral presentada por **Marielle Esteves Coelho**

Licenciada en Veterinaria para optar al grado académico de doctora en Veterinaria

Trabajo experimental realizado en la Plataforma de Grandes Animales  
del Servicio de Experimentación Animal del Vall d'Hebron Institut de Recerca

Tesis adscrita al Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària  
de la **Universitat Autònoma de Barcelona**

**Marielle Esteves Coelho**

**Dr. Marius Aguirre Canyadell**

**Dr. David Prandi Chevalier**

**DIRECTOR**

**TUTOR**

Bellaterra, Diciembre del 2015



**Marius Aguirre Canyadell**, Profesor Asociado de Universidad del Departamento de Cirugía de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona,

HAGO CONSTAR

Que la Tesis titulada ***“Refinamiento anestésico en un modelo de defecto óseo segmentario diafisario en oveja”*** presentada por la Sra. **Marielle Esteves Coelho** para optar al grado de Doctor en Veterinaria se ha realizado bajo mi dirección, y considerando está acabada, autorizo su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), el 4 de Diciembre de 2015.

Marius Aguirre Canyadell



**David Prandi Chevalier**, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Medicina y Cirugía Animales de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

HAGO CONSTAR

Que la Tesis titulada ***“Refinamiento anestésico en un modelo de defecto óseo segmentario diafisario en oveja”*** presentada por la Sra. **Marielle Esteves Coelho** para optar al grado de Doctor en Veterinaria se ha realizado bajo mi tutoría, y considerando está acabada, autorizo su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), el 4 de Diciembre de 2015.

David Prandi Chevalier



## **FINANCIACIÓN DEL PROYECTO**

Esta tesis doctoral ha sido financiada por el Instituto de Salud Carlos III, con número de expediente PI11/02231, titulado “Estudio experimental de terapia celular con células madres adultas expandidas “*ex vivo*” inmovilizadas en matriz ósea en el tratamiento de defectos óseos segmentarios”.



“Solo se ve bien con el corazón, lo esencial es invisible a los ojos.”

Antoine de Saint-Exupéry



## **AGRADECIMIENTOS**

Creo que este es el apartado más difícil en el desarrollo de este trabajo. Aunque escriba aquí algunas palabras no sé si podré valorar mi sincero agradecimiento a todos que de alguna forma indirecta o directamente participaron, acreditaron e hicieron posible que pudiera realizar, y terminar, este trabajo.

A Marius Aguirre, director de este trabajo pero ante de todo un gran apoyo tanto en la vida personal como profesional. Persona que me acompañó durante toda mi trayectoria en el mundo de la experimentación animal, y con quien compartimos algunas desilusiones cuando los proyectos no iban bien del todo. Pero siempre insistiendo y buscando el éxito.

A David Prandi, por todos los años, siempre animándome, y por todas las horas dedicadas al desarrollo de esta tesis. Sin su orientación este trabajo no hubiese visto la luz.

Sería imposible la conclusión de esta tesis sin la participación intensa de Lola, Marta Giral, Annita, Alba y Mire.

A Dolores García, con su servicio de guardia 24 horas y a Marta Giral, mi amiga de corazón blaugrana, os agradezco vuestra inestimable ayuda y colaboración que han sido fundamentales para poder completar el trabajo felizmente.

A Anna Server, que la búsqueda de refinamientos anestésicos traslacionales a la experimentación animal nos ha unido y hoy en día, aparte de contar con su incansable orientación anestésica, encontré una amiga.

A Alba López, pieza primordial en el Grupo de Ingeniería Tisular Musculoesquelética del VHIR, por ser una persona más que agradable, muy profesional y tener una dedicación inmensurable con los proyectos. Gracias a su entrada en nuestras vidas, hemos podido retomar este estudio y concluirlo.

A Mireia Campos, que por el poco pero intenso tiempo de contacto, ha sido siempre muy compañera y pieza fundamental tanto en la realización del estudio como en su análisis y revisión.

A Marta Rosal, grande líder y amiga. Sin palabras para agradecer los muchos años que seguimos codo a codo superando todos y cada uno de los desafíos que nos proponen.

A Álvaro Gimeno, mi primer contacto veterinario desde que llegué a España. Gracias a su indicación, hoy sigo el camino de la investigación animal y no podría sentirme más realizada.

A Montse Molano, mi mamis catalana. Siempre tan atenta y preocupada con mi bienestar. Como una mamis ejemplar ha estado siempre recordándome los tiempos.

A todo el Personal de la Plataforma de Grandes animales, en especial a Àngel y Albert, por su exquisito cuidado a los animales. Gracias por hacer de nuestra Plataforma un ambiente excepcional de trabajo.

A todos mis compañeros de la Family Estabulario, por todos los deseos de ánimos.

A todos los investigadores y cirujanos que pasan por nuestros quirófanos y hacen de mí día a día un constante desafío. Ver los resultados alcanzados en la experimentación animal trasladados a sus pacientes es siempre muy gratificante.

A mi familia, todo el agradecimiento del mundo!!! A mi mama Doña Marilene, por su protección que atraviesa el Atlántico y me sostiene con sus dosis diarias de inmensurable energía y cariño. A mi marido, Felipe y mis hijos, Marc y Marina, por la paciencia y comprensión con mi ausencia en los muchos días dedicados a este trabajo.

En especial, debo mencionar a todas estas personas mis sinceros agradecimientos.

<b>Índice de figuras y tablas</b> .....	VII
<b>Listado de abreviaturas</b> .....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>1</b> Importancia del uso de los animales en experimentación.....	3
<b>1.1</b> Normativa sobre el uso de animales de experimentación.....	4
<b>1.2</b> Datos estadísticos de los animales utilizados en experimentación.....	5
<b>2</b> Modelos animales de investigación en ortopedia.....	7
<b>2.1</b> Características generales del tejido óseo.....	7
<b>2.2</b> Elección del modelo animal.....	9
<b>2.2.1</b> Modelos en roedores.....	10
<b>2.2.2</b> Modelos en conejos.....	10
<b>2.2.3</b> Modelos en perros.....	11
<b>2.2.4</b> Modelos en cerdos.....	11
<b>2.2.5</b> Modelos en cabras.....	12
<b>2.2.6</b> Modelos en ovejas.....	12
<b>2.2.7</b> Resumen de los modelos animales en ortopedia.....	13
<b>3</b> Modelos animales de defecto óseo segmentario diafisario.....	15
<b>3.1</b> Definiciones y conceptos generales.....	15
<b>3.2</b> Modelos animales.....	16
<b>3.3</b> Complicaciones postoperatorias en el modelo ovino.....	18
<b>4</b> Técnicas anestésicas y analgésicas en modelos de ortopedia ovino.....	20
<b>4.1</b> Manejo pre-operatorio.....	21
<b>4.2</b> Técnicas anestésicas.....	22
<b>4.3</b> Técnicas analgésicas.....	22
<b>4.3.1.</b> Opioides.....	24
<b>4.3.2.</b> Agonistas $\alpha$ -2 adrenérgicos.....	24
<b>4.3.3.</b> Antiinflamatorios no esteroideos.....	24
<b>4.3.4.</b> Anestésicos locales.....	25
<b>5.</b> Bloqueo nervioso periférico guiado por ultrasonografía y con neuroestimulación.....	27
<b>5.1.</b> Bloqueo continuo de nervio periférico.....	29

<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	31
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	35
Animales.....	37
Aspectos éticos.....	38
Fases del estudio.....	38
<b>FASE 1</b> .....	39
<b>1. Material</b> .....	39
<b>1.1. Animales</b> .....	39
<b>1.2. Equipos, instrumentos y productos químicos</b> .....	39
<b>1.2.1. Disección del miembro pelviano</b> .....	39
<b>1.2.2. Estudio anatómico guiado por ultrasonografía</b> .....	40
<b>2. Métodos</b> .....	41
<b>2.1. Disección del miembro pelviano</b> .....	41
<b>2.2. Estudio anatómico guiado por ultrasonografía</b> .....	43
<b>2.2.1. Bloqueo periférico del nervio ciático</b> .....	43
<b>2.2.2. Bloque periférico del nervio femoral</b> .....	44
<b>FASE 2</b> .....	47
<b>1. Material</b> .....	47
<b>1.1. Animales</b> .....	47
<b>1.2. Instrumentos y aparatos</b> .....	47
<b>1.2.1. Anestesia, intubación y monitorización</b> .....	47
<b>1.2.2. Realización del bloqueo periférico de los nervios ciático y femoral</b> .....	48
<b>2. Fármacos</b> .....	48
<b>2.1. Premedicación, anestesia y postoperatorio</b> .....	48
<b>2.2. Realización del bloqueo periférico de los nervios ciático y femoral</b> .....	49
<b>3. Métodos</b> .....	49
<b>3.1 Sedación y anestesia para la realización del bloqueo periférico del nervio ciático y femoral</b> .....	49
<b>3.2. Realización de la técnica del bloqueo periférico</b> .....	50
<b>3.2.1 Bloqueo del nervio ciático</b> .....	50
<b>3.2.2. Bloqueo del nervio femoral</b> .....	51
<b>3.3. Valoración de la respuesta sensitiva y motora</b> .....	51

<b>FASE 3</b> .....	53
<b>1. Material</b> .....	53
<b>1.1. Animales</b> .....	53
<b>1.2. Instrumentos y aparatos</b> .....	53
<b>1.2.1. Habitación al sistema de inmovilización</b> .....	53
<b>1.2.2. Anestesia, intubación y monitorización</b> .....	54
<b>1.2.3. Colocación del bloqueo continuo y realización del bloqueo periférico del nervio ciático</b> .....	54
<b>2. Fármacos</b> .....	55
<b>2.1. Premedicación, anestesia y postoperatorio</b> .....	55
<b>2.2. Colocación del bloqueo continuo y realización del bloqueo periférico del nervio ciático</b> .....	56
<b>3. Métodos</b> .....	56
<b>3.1. Habitación previa de los animales al sistema de inmovilización</b> .....	56
<b>3.2. Tipos de tratamiento en el modelo ortopédico del defecto óseo segmentario diafisario</b> .....	60
<b>3.3. Realización de la anestesia y analgesia del Grupo A</b> .....	61
<b>3.4. Realización de la anestesia y analgesia del Grupo B</b> .....	61
<b>3.5. Colocación del bloqueo continuo del nervio periférico ciático</b> .....	61
<b>3.6. Seguimiento postoperatorio</b> .....	64
<b>3.7. Variables</b> .....	67
<b>3.8. Análisis estadístico</b> .....	67
 <b>RESULTADOS</b> .....	 69
<b>FASE 1</b> .....	71
<b>1. Estudio anatómico por disección y localización de las estructuras de interés</b> .....	71
<b>2. Comprobación de la técnica guiada por ultrasonografía</b> .....	72
<b>FASE 2</b> .....	74
<b>1. Desarrollo de la técnica del bloqueo guiada por ultrasonografía y con neuroestimulación</b> .....	74

2.	Respuesta sensitiva y motora.....	75
2.1.	Respuesta sensitiva.....	76
2.2.	Respuesta motora.....	77
<b>FASE 3.</b>	.....	<b>78</b>
1.	Evaluación general de los animales e incidencias.....	78
2.	Resultados técnicos de la aplicación del bloqueo nervioso.....	80
3.	Variación del peso de los animales.....	81
3.1.	Variación de peso desde la entrada de los animales hasta el inicio de la habituación al sistema de inmovilización.....	81
3.2.	Variación de peso desde la entrada de los animales en las dos semanas del postoperatorio.....	82
3.3.	Variación de peso inicio habituación al sistema de inmovilización hasta la intervención quirúrgica.....	82
3.4.	Variación de peso desde la habituación al sistema de inmovilización hasta las dos semanas del postoperatorio.....	82
4.	Comprobación de la ausencia de interferencia de los tratamientos experimentales del defecto óseo segmentario diafisario.....	84
4.1.	Test de Apoyo.....	84
4.2.	Test de Bienestar.....	85
5.	Análisis de tiempos intra y postoperatorio inmediatos.....	85
5.1.	Tiempo de duración de la intervención quirúrgica del defecto óseo segmentario diafisario.....	85
5.2.	Análisis de parámetros fisiológicos durante la intervención quirúrgica.....	86
5.3.	Análisis de la dosis de rescate de propofol requerida durante la Intervención quirúrgica.....	87
5.4.	Tiempo de recuperación de la respiración espontanea finalizada la anestesia quirúrgica hasta el momento de la extubación endotraqueal.....	87
5.5.	Tiempo necesario en permanecer en estación después de finalizada la intervención quirúrgica.....	88
6.	Análisis de parámetros de funcionalidad.....	89
6.1.	Análisis del apoyo de la extremidad durante el postoperatorio.....	89
6.2.	Correlación entre la duración del bloqueo continuo y el apoyo.....	91

7. Análisis de parámetros del bienestar.....	91
7.1. Análisis del bienestar animal durante el postoperatorio.....	91
8. Análisis de la necesidad de rescate analgésico durante las dos semanas del postoperatorio.....	93
<b>DISCUSIÓN</b> .....	96
1. Modelos animales en experimentación.....	98
2. Modelos animales de defecto óseo segmentario diafisario.....	98
3. Técnicas anestésicas y analgésicas en modelos de ortopedia ovino.....	101
4. Bloqueo nervioso periférico en oveja.....	104
5. Bloqueo continuo de nervio periférico para el control del dolor postoperatorio en oveja.....	107
6. Limitaciones del estudio.....	108
 <b>CONCLUSIONES</b> .....	 110
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	 114
 <b>ANEXOS</b> .....	 130
<b>Anexo I</b> – Registro bloqueo nervioso periférico.....	132
<b>Anexo II</b> – Fichas de anestesia.....	134
<b>Anexo III</b> – Registro control de peso corporal.....	137



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

INTRODUCCIÓN

<b>FIGURA 1</b>	Imagen histológica de hueso compacto.....	<b>7</b>
<b>FIGURA 2</b>	Esquema de un hueso largo.....	<b>8</b>
<b>FIGURA 3</b>	Estudio radiográfico de la extremidad distal de la oveja. Imagen del sistema de fijación interna.....	<b>17</b>
<b>FIGURA 4</b>	Defecto óseo segmentario de 3 cm.....	<b>18</b>

MATERIAL Y MÉTODOS

FASE 1

<b>FIGURA 5</b>	Instrumental quirúrgico para disección del miembro pelviano.....	<b>40</b>
<b>FIGURA 6</b>	Material para bloqueo nervioso periférico guiado por ultrasonografía.....	<b>41</b>
<b>FIGURA 7</b>	Miembro pélvico ovino, vista lateral. Referencias óseas.....	<b>41</b>
<b>FIGURA 8</b>	Disección del plexo lumbosacro ovino, vista lateral y medial.....	<b>42</b>
<b>FIGURA 9</b>	Miembro pélvico ovino, vista lateral. Puntos de referencia ósea y posición del transductor ultrasonográfico.....	<b>43</b>
<b>FIGURA 10</b>	Imagen ecográfica del nervio ciático.....	<b>44</b>
<b>FIGURA 11</b>	Miembro pélvico ovino, vista medial. Posición del transductor ultrasonográfico.....	<b>45</b>
<b>FIGURA 12</b>	Imagen ecográfica del nervio femoral y demás estructuras.....	<b>46</b>
<b>FIGURA 13</b>	Zona teñida con azul de metileno: vista lateral y medial.....	<b>46</b>

FASE 2

<b>FIGURA 14</b>	Imagen ecográfica del nervio ciático rodeado de anestésico local y demás estructuras.....	<b>50</b>
<b>FIGURA 15</b>	Imagen ecográfica del nervio femoral rodeado de anestésico local y demás estructuras.....	<b>51</b>
<b>FIGURA 16</b>	Esquema de evaluación de respuesta sensitiva.....	<b>52</b>

FASE 3

<b>FIGURA 17</b>	Material para aplicación del vendaje.....	<b>54</b>
<b>FIGURA 18</b>	Material para colocación del bloqueo continuo.....	<b>55</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>FIGURA 19</b>	Aplicación del vendaje.....	<b>57</b>
<b>FIGURA 20</b>	Aplicación del vendaje sintético.....	<b>58</b>
<b>FIGURA 21</b>	Fragmentación del sistema de vendaje y fijación.....	<b>59</b>
<b>FIGURA 22</b>	Animal en establo con vendaje y chaleco.....	<b>59</b>
<b>FIGURA 23</b>	Animal durante postoperatorio con vendaje y chaleco.....	<b>60</b>
<b>FIGURA 24</b>	Extremidad posterior de la oveja, creación del defecto óseo.....	<b>62</b>
<b>FIGURA 25</b>	Posición del transductor e imagen ecográfica del nervio ciático.....	<b>62</b>
<b>FIGURA 26</b>	Imagen ecográfica del nervio ciático rodeado de anestésico local.....	<b>67</b>
<b>FIGURA 27</b>	Set de catéter para bloqueo continuo y fijación.....	<b>68</b>
<b>FIGURA 28</b>	Aspecto final fijación catéter.....	<b>69</b>
<b>FIGURA 29</b>	Conexión del catéter con el sistema infusor de anestésico local.....	<b>69</b>
<b>FIGURA 30</b>	Protección del catéter.....	<b>70</b>
<b>RESULTADOS</b>		
<b>FASE 1</b>		
<b>FIGURA 31</b>	Disección plexo lumbosacro, vista lateral.....	<b>71</b>
<b>FIGURA 32</b>	Disección plexo lumbosacro, vista medial.....	<b>72</b>
<b>FIGURA 33</b>	Imagen ecográfica del nervio ciático y nervio femoral.....	<b>72</b>
<b>FIGURA 34</b>	Zona teñida, nervio ciático.....	<b>73</b>
<b>FIGURA 35</b>	Zona teñida, nervio femoral.....	<b>73</b>
<b>FASE 2</b>		
<b>FIGURA 36</b>	Imagen ecográfica nervio ciático rodeado de anestésico local y demás estructuras.....	<b>74</b>
<b>FIGURA 37</b>	Imagen ecográfica nervio femoral rodeado de anestésico local y demás estructuras.....	<b>74</b>
<b>FIGURA 38</b>	Correlación duración efecto sensitivo y dosis ropivacaína.....	<b>76</b>
<b>FIGURA 39</b>	Presentación déficit propioceptivo y dosis ropivacaína.....	<b>77</b>
<b>FASE 3</b>		
<b>FIGURA 40</b>	Correlación entre variación de peso y los días de aclimatación.....	<b>81</b>
<b>FIGURA 41</b>	Correlación entre variación de peso (dos semanas del postoperatorio) y los días de aclimatación.....	<b>82</b>
<b>FIGURA 42</b>	Variación del peso en función de los días habituación vendaje.....	<b>83</b>
<b>FIGURA 43</b>	Variación del peso (dos semanas postoperatorio) en función a los días habituación vendaje.....	<b>83</b>
<b>FIGURA 44</b>	Test de apoyo comparando distintos tratamientos.....	<b>84</b>
<b>FIGURA 45</b>	Test de bienestar comparando distintos tratamientos.....	<b>85</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>FIGURA 46</b>	Comparación duración intervención quirúrgica entre Grupos A y B.....	<b>85</b>
<b>FIGURA 47</b>	Comparación de la frecuencia cardíaca pre y post osteotomía entre los Grupos A y B.....	<b>86</b>
<b>FIGURA 48</b>	Comparación de la presión arterial media pre y post osteotomía entre los Grupos A y B.....	<b>86</b>
<b>FIGURA 49</b>	Comparación del número de dosis de rescate de propofol entre los Grupos A y B durante la intervención quirúrgica.....	<b>87</b>
<b>FIGURA 50</b>	Comparación tiempo extubación endotraqueal y regreso estabulación.....	<b>88</b>
<b>FIGURA 51</b>	Comparación tiempo extubación endotraqueal y estado de estación.....	<b>88</b>
<b>FIGURA 52</b>	Puntuación del apoyo: 24 horas postoperatorio.....	<b>89</b>
<b>FIGURA 53</b>	Puntuación del apoyo: 1 semana postoperatorio.....	<b>90</b>
<b>FIGURA 54</b>	Puntuación del apoyo: 2 semanas postoperatorio.....	<b>90</b>
<b>FIGURA 55</b>	Puntuación apoyo (2 semanas postoperatorio) y bloqueo continuo.....	<b>91</b>
<b>FIGURA 56</b>	Comparación bienestar animal: 24 horas postoperatorio.....	<b>92</b>
<b>FIGURA 57</b>	Comparación bienestar animal: 1 semana postoperatorio.....	<b>92</b>
<b>FIGURA 58</b>	Comparación bienestar animal: 2 semanas postoperatorio.....	<b>93</b>
<b>FIGURA 59</b>	Comparación rescate analgésico en dos semanas postoperatorio.....	<b>93</b>

## TABLAS

### INTRODUCCIÓN

<b>TABLA 1</b>	Resumen de las características, ventajas e inconvenientes de los modelos animales más utilizados en ortopedia.....	<b>13</b>
----------------	--	-----------

### MATERIAL Y MÉTODOS

<b>TABLA 2</b>	Test de apoyo. Evaluación de la extremidad intervenida.....	<b>65</b>
<b>TABLA 3</b>	Test de bienestar. Evaluación estado general animal.....	<b>66</b>

### RESULTADOS

<b>TABLA 4</b>	Ovejas incluidas en los Grupos I y II.....	<b>75</b>
<b>TABLA 5</b>	Grupo A – sin bloqueo intraoperatorio y continuo.....	<b>79</b>
<b>TABLA 6</b>	Grupo B – con bloqueo intraoperatorio y continuo.....	<b>79</b>
<b>TABLA 7</b>	Grupo B – bloqueo continuo.....	<b>80</b>



## LISTADO DE ABREVIATURAS

**3R's:** tres erres (Refinar, Reducir, Reemplazar)

**Agonistas  $\alpha 2$ :** agonistas  $\alpha 2$  adrenérgicos

**AINE:** antiinflamatorios no esteroideos

**AL:** anestésicos locales

**ALG:** alogénicas

**AU:** autólogas

**BCNP:** bloqueo continuo de nervio periférico

**CEEA:** comité de ética de experimentación animal

**COX:** ciclooxigenasa

**CRI:** *constant rate infusión*

**CSD:** *critical size defect*

**d.e:** desviación estándar

**DOSD:** defecto óseo segmentario diafisario

**ENP:** estimulador nervioso periférico

**EtCO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono espiratorio final

**FC:** frecuencia cardiaca

**Felso:** fracción espirada de isoflurano

**FeO<sub>2</sub>:** fracción espirada de oxígeno

**Filso:** fracción inspirada de isoflurano

**FiO<sub>2</sub>:** fracción inspirada de oxígeno

**ID:** identificación animal

**IM:** intramuscular

**IV:** intravenoso

**L:** lumbar

**MM:** maléolo medial

**MO:** médula ósea

**MSC:** *mesenchymal stromal cells*

**NaCl:** cloruro de sodio

**NST:** neuroestimulación

**PaCO<sub>2</sub>:** presión parcial de dióxido de carbono arterial

**PAM:** presión arterial media

**PGE<sub>2</sub>:** prostaglandina E2

**S:** sacro

**TTA:** tuberosidad tibial anterior

**UE:** Unión Europea

**USG:** ultrasonografía

**VHIR:** Vall d'Hebron Institut de Recerca



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. IMPORTANCIA DEL USO DE LOS ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN

La investigación con animales sigue siendo esencial para el avance del conocimiento de los procesos biológicos, especialmente los relacionados con la salud y la enfermedad humana y animal. Los animales – especialmente los mamíferos - y los seres humanos tienen grandes similitudes a muy diversos niveles: la estructura de los órganos, las funciones fisiológicas, la genética, el metabolismo y diversos mecanismos patológicos. Gracias a estas similitudes, pueden desarrollarse modelos animales que reproducen con precisión enfermedades humanas, con el fin de que puedan ser analizadas y estudiadas más allá de lo que es posible en humanos. Estos modelos permiten una comprensión crítica de los mecanismos de la enfermedad, y la oportunidad de evaluar el efecto de los compuestos terapéuticos en los estudios preclínicos. De esta forma, el avance del conocimiento progresa mucho más rápidamente, y la búsqueda de métodos de prevención y terapias es mucho más eficaz.

A lo largo de la Historia, los modelos animales han contribuido al desarrollo de terapias seguras y eficaces para su uso, tanto en la práctica médica como veterinaria, y siguen aún desempeñando un papel clave en la mejora de los tratamientos para el beneficio de los pacientes de todo el mundo. Los modelos animales también son actualmente esenciales para la investigación más aplicada, como por ejemplo, el estudio de la interacción de los medicamentos o su toxicidad.

Los animales más usados en investigación biomédica son los pequeños mamíferos, y más concretamente los ratones; hecho que se justifica por razones tanto económicas como de manejo. No obstante, existen ciertos estudios que requieren animales de mayor tamaño ya que en muchos casos los roedores no replican fielmente la enfermedad humana. Además, entre ratones y humanos hay diferencias esenciales derivadas del tamaño corporal y la longevidad, para las que el uso de modelos animales de gran tamaño, entre los que se incluye la oveja, proporciona una alternativa idónea (1–3).

La utilización de animales en investigación conlleva una serie de responsabilidades y ha de ser sometida a unos principios éticos. En términos éticos, el objetivo de la investigación debe ser beneficioso para el hombre o a los propios animales, y además debe cumplir una serie de requisitos que aseguren un uso racional de los animales y una adecuada metodología de trabajo (4–6). Actualmente existe un marco normativo estricto, pero mucho antes de que se legislara, surgía ya esta inquietud en la comunidad científica. De hecho, en 1959, Russell y Burch publicaron el “Principio de las tres erres” (3R’s) (7). Las 3R’s se refieren a “Reemplazar” el uso de animales de experimentación por otros métodos, “Reducir” el número de animales que se emplea en cada ensayo o estudio, y “Refinar” las técnicas para aminorar el malestar, dolor o sufrimiento de los animales (8,9). El concepto de estos principios evolucionó con los años y actualmente no solamente se intenta evitar el sufrimiento de los animales con el fin de obtener óptimos resultados, sino que también existe la preocupación de buscar una mejor calidad de vida para estos animales. Nuevos estudios y enfoques pueden ayudar a aplicar estos conceptos, dando lugar así a una investigación con modelos animales más eficientes y ética (10–13).

### **1.1. NORMATIVA SOBRE EL USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Con el objetivo de establecer medidas para la protección de estos animales y seguir trabajando nuevos métodos de aplicación de las 3R’s (14), la Unión Europea adoptó el 22 de septiembre de 2010 la nueva Directiva 2010/63/UE, derogando la Directiva 86/609/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (15). En España, se trasladaron las exigencias europeas a la normativa nacional, a través del Real Decreto 53/2013 (16). Dentro de España, las distintas comunidades autónomas tienen capacidad para legislar de modo más estricto que las normas españolas o europeas. En Cataluña, el Decreto 214/1997, de 30 de julio, regula la utilización de animales para experimentación y otros fines científicos (17).

## **1.2. DATOS ESTADÍSTICOS DE LOS ANIMALES UTILIZADOS EN EXPERIMENTACIÓN**

Según el Séptimo Informe (18), sobre las estadísticas relativas al número de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea, los roedores y los conejos representaron el 80% del total de animales utilizados en la Unión Europea. Los ratones fueron la especie más utilizada (el 61% del total), seguidos por las ratas (el 14%). El segundo grupo de animales más utilizado fue, como en años anteriores, el de los animales de sangre fría, con más del 12%, siendo el tercero el de las aves, con el 6% del total. Por su parte, el grupo de los perisodáctilos (caballos, burros y sus cruces) y los artiodáctilos (cerdos, cabras, ovejas y bovinos) representó poco más del 1% del número total de animales utilizados en los Estados miembros, mientras que la utilización de carnívoros y primates no humanos alcanzó en 2011 el 0,25% y el 0,05% del total, respectivamente. Estos datos fueron recogidos en el año 2011, y publicados en 2013, a excepción de Francia, que facilitó datos de 2010.

En lo que respecta al objetivo de los estudios, más del 60% de los animales se utilizaron para actividades de investigación y desarrollo en medicina, odontología y veterinaria y en estudios de biología fundamental. En torno al 14% se empleó para la producción y control de calidad de productos e instrumentos de medicina, odontología y veterinaria, y el 9% se destinaron a evaluaciones toxicológicas y otras evaluaciones de seguridad. El porcentaje restante se destinó a otros fines, que engloban una amplia gama de experimentos de virología, inmunología para la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales, fisiología de la interacción materno-fetal en ratones transgénicos, etc.

El número de animales utilizados en estudios sobre enfermedades humanas aumentó en más de 115.000 para enfermedades cardiovasculares, y en más de 250.000 para investigación oncológica. En comparación con 2008, también se produjeron aumentos en el número de perros (más de 1000 animales), de otros carnívoros (unos 500), otros mamíferos (en torno a 300) y otras aves (más de 2.500).

En nuestro país, los datos más recientes se refieren a 2014 (19), y reflejan una disminución de más de 100.000 animales utilizados respecto al año anterior. Asimismo, se observa que el cáncer humano fue la finalidad más frecuente de los animales destinados a investigación traslacional y aplicada (28%), mientras que las enfermedades músculo-esqueléticas, en las que se enmarca el presente trabajo, fueron una finalidad minoritaria a la que sólo dedicaron el 1% de los animales de ese apartado.

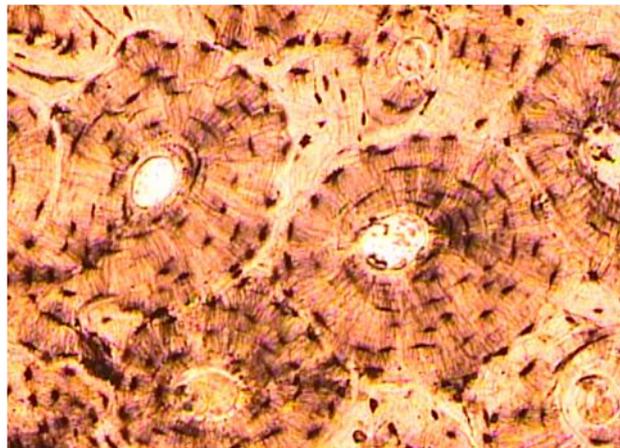
Por otra parte, en lo que se refiere a especies animales, el ratón sigue siendo con diferencia el más utilizado, aunque ahora los peces, y no la rata, ocupan el segundo lugar. El uso de ovejas ha continuado siendo bajo, sin apenas alcanzar el 0,4%.

El presente estudio se realizó con esta especie de uso minoritario, que sin embargo resulta idónea para modelos de defecto óseo, como se explicará en siguientes apartados.

## 2. MODELOS ANIMALES DE INVESTIGACIÓN EN ORTOPEDIA

### 2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL TEJIDO ÓSEO

El hueso es un tejido óseo de sostén altamente especializado y caracterizado por su rigidez y dureza. Sus cuatro funciones principales son: proporcionar sostén mecánico (ej.: costillas), permitir la locomoción (ej.: huesos largos), proporcionar protección (ej.: cráneo) y actuar como reservorio metabólico de sales minerales (20). El tejido óseo está formado por células y material intercelular calcificado, la matriz ósea. Las células son los osteocitos, que se sitúan en las cavidades o lagunas en el interior de la matriz, los osteoblastos, productores de la parte orgánica de la matriz, y los osteoclastos, células gigantes, móviles y plurinucleadas, que reabsorben el tejido óseo participando en los procesos de remodelación de los huesos (21) (figura 1).

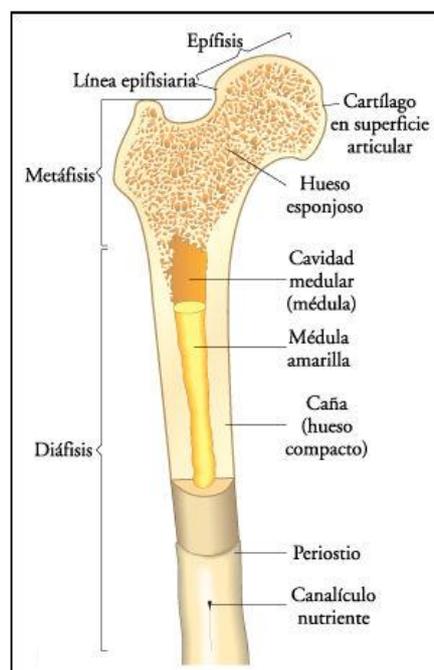


**Figura 1.** Imagen histológica. Corte transversal de hueso compacto a un aumento de 100x. Se observan las láminas concéntricas y los osteocitos dentro de las lagunas (21).

El hueso es un tejido dinámico, que se forma y destruye constantemente bajo el control de factores hormonales y físicos. Esta actividad constante permite el proceso de la remodelación. El recambio óseo normalmente es lento en adultos, pero en lactantes y niños es elevado, lo que permite el crecimiento y la remodelación activa necesaria para hacer frente a nuevas demandas, como el inicio del andar.

Sin embargo, los adultos pueden aumentar el recambio óseo cuando la demanda aumenta, por ejemplo en el caso de reparar una fractura o debido a procesos patológicos (20).

La mayoría de los huesos presenta una arquitectura básica compuesta por una zona externa, cortical o compacta, y una zona interna, trabecular o esponjosa (22). El hueso cortical o compacto forma un escudo rígido externo, resistente a la deformación, mientras que la malla trabecular interna proporciona resistencia al formar un complejo sistema de contrafuertes internos. Los espacios de la malla trabecular están ocupados por la médula ósea (20). En los huesos largos (Figura 2), las extremidades o epífisis están formadas por hueso esponjoso con una delgada capa superficial compacta. La diáfisis (parte cilíndrica) está casi totalmente formada por tejido óseo compacto, con pequeñas cantidades de hueso esponjoso en su parte más interna que delimita el conducto medular (21). Las superficies internas y externas de los huesos están recubiertas por células osteogénicas y tejido conjuntivo que forman el endostio y el periostio. El endostio está formado generalmente por una capa de células osteogénicas aplanadas, que recubren la cavidad de los huesos esponjosos. La capa más superficial del periostio contiene principalmente fibras de colágeno y fibroblastos, y en su parte más interna se puede encontrar las células osteoprogenitoras.



**Figura 2.** Esquema de un hueso largo (Extraído de Biología WEB).

## 2.2. ELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL

En estudios de ortopedia se utilizan diversos modelos animales tales como los roedores (23), los perros (24), los conejos (25) , los cerdo (26), las cabras (27) y las ovejas (28). La elección del modelo se basa en las características de cada especie según el objetivo final del estudio y composición ósea (22,29).

En estudios sobre problemas quirúrgicos y ortopédicos, tales como fijación de fracturas, osteotomías (30), reparación de ligamentos (31) y defectos de cartílago (32), el tipo de animal seleccionado -y en particular su tamaño y la anatomía- debe satisfacer plenamente las necesidades del estudio. Para muchos de estos estudios se necesitan animales con extremidades y segmentos óseos de tamaño adecuado, lo más parecidos posibles a los de los seres humanos (33). La evaluación de los dispositivos ortopédicos, de ensayos de implantes y estabilidad biomecánica, requiere animales de gran tamaño, con un comportamiento postoperatorio que tenga propensión a la carga de peso como, por ejemplo, la oveja (34–37).

Actualmente existen numerosos modelos que se utilizan en ortopedia para probar materiales de implante *in vivo*, con el objetivo de evaluar las interacciones hueso-implante antes de su uso clínico en seres humanos (38). Estos modelos determinan requisitos de biocompatibilidad, estabilidad y seguridad mecánica, como también aceleración de la consolidación de la fractura para una rehabilitación más rápida (39,40). Por otro lado, comprender el comportamiento de las fracturas óseas es imprescindible en la investigación ortopédica, así como también el control de la técnica quirúrgica.

A continuación se describen diferentes tipos de modelos usados en estudios de ortopedia.

### **2.2.1. MODELOS EN ROEDORES**

El modelo animal más comúnmente utilizado es la rata, ya que supone un bajo costo económico y son de fácil manejo. Sin embargo, al ser un animal tan pequeño, la toma de muestras seriadas representa un inconveniente. Otra desventaja es que no se pueden aplicar implantes similares a los usados en clínica, debido al pequeño tamaño del animal. Además, se ha descrito que a pesar de que los roedores modelan el tejido óseo esponjoso, tienen limitada la remodelación cortical (41). Por otro lado, si se utiliza esta especie, hay que tener en cuenta también que los roedores tienen las placas de crecimiento abiertas de por vida (34,42,43).

### **2.2.2. MODELOS EN CONEJOS**

Debido a su facilidad de manejo y tamaño, el conejo también es un animal bastante utilizado para la investigación biomédica en general (25). No obstante, un inconveniente es también su limitación de tamaño, por ejemplo, para la evaluación de materiales de implante. De hecho, según Pearce *et al.* (35) en el International standard ISO 10993-6 - Pruebas para efectos locales después de la implantación (44), se recomienda un máximo de 6 implantes (3 pruebas y 3 implantes de control) por conejo. Esta es la mitad del número máximo de implantes recomendados para ovejas, perros, cabras y cerdos. Además, el tamaño del implante que puede insertarse es limitado; los implantes cilíndricos no se recomiendan si tienen más de 2 mm de diámetro y 6 mm de longitud (35,44).

Comparado con el humano, existen grandes diferencias en la anatomía ósea, tanto en el tamaño y en la forma de los huesos, como en la carga, debido a las diferencias de posición entre las dos especies. A pesar de todo esto, el conejo sigue siendo una opción bastante utilizada para ensayos de materiales de implante en el hueso (35).

### 2.2.3. MODELOS EN PERROS

Debido a cuestiones éticas y emocionales, su uso se está viendo reducido en la investigación biomédica en general, pero sin embargo se aplican con mayor frecuencia en estudios musculoesqueléticos y también en investigación dental (45,46). Un estudio realizado por Aerssens *et al.* (29), concluyó que hay más similitud en la composición ósea (peso de cenizas, hidroxiprolina, proteínas extraíbles y el contenido IGF1) entre el perro y el ser humano que en otras especies animales.

### 2.2.4. MODELOS EN CERDOS

Los cerdos se han establecido como modelos de elección para una gran variedad de estudios, tales como los de osteonecrosis de la cabeza femoral, del cartílago y del hueso (26,47,48). Según Thorwart *et al.* (35), características como la anatomía del hueso, la morfología, la curación y la remodelación del mismo, harían del cerdo una especie de elección, pues presenta muchas similitudes con el hueso humano. En referencia a la composición ósea, Aerssens *et al.* (21) encontraron similitudes al hueso humano tanto en el cerdo, como también en el ya descrito modelo canino.

Los inconvenientes para utilizar este tipo de animales radican sobre todo en cuestiones logísticas y económicas. Los cerdos híbridos comerciales no son recomendables debido a su alta tasa de crecimiento y al incremento excesivo de peso corporal al final del estudio. Además, su manejo puede resultar complicado; más por ejemplo, que el de pequeños rumiantes, que gozan de un carácter mucho más dócil. En caso de necesitar animales esqueléticamente maduros, se podría optar por las razas de cerdo enano (*minipig*), pero su elevado coste lo convierte en un importante inconveniente.

### **2.2.5. MODELOS EN CABRAS**

La cabra, igual que la oveja también puede ser un modelo de elección para estudios de ortopedia (49,50), ya que presenta un tamaño corporal adecuado para la colocación y evaluación de implantes (51). Pero debido a su carácter más interactivo y curioso, podría ser más difícil su confinamiento a la hora de realizar estudios de larga duración.

En referencia a las características de remodelación y cicatrización ósea, se ha descrito que presentan similitudes a los humanos (52).

### **2.2.6. MODELOS EN OVEJAS**

La oveja es la especie más utilizada en investigación ortopédica (28,34,53–55). Los animales adultos ofrecen la ventaja de tener un peso corporal similar al de los humanos y huesos largos de dimensiones adecuadas para el uso de implantes y prótesis humanas. Sin embargo, según se reporta en un estudio de Nafei *et al.* (40), existen diferencias en la densidad ósea entre el humano y la oveja: las ovejas presentan huesos con una densidad significativamente mayor, así como una mayor resistencia.

Por otra parte, diferentes estudios han demostrado que la oveja es un modelo muy valioso para evaluar la actividad de remodelación (56,57). Un factor importante a tener en cuenta en los estudios de remodelación ósea es la madurez esquelética de esta especie. El hueso trabecular esqueléticamente inmaduro es más débil, menos rígido, tiene mayor capacidad de absorción de impactos, contiene más colágeno y es menos denso que en la oveja esqueléticamente madura (40). Este hecho es importante a considerar a la hora de diseñar un estudio.

### 2.2.7. RESUMEN DE LOS MODELOS ANIMALES EN ORTOPEDIA

En la siguiente tabla se resumen las características, ventajas e inconvenientes, de los modelos animales mencionados (34,35,58,59):

<b>Especie</b>	<b>Similitudes con el hueso humano</b>	<b>Diferencias con el hueso humano</b>	<b>Ventajas del modelo</b>	<b>Inconvenientes del modelo</b>
<b>Roedores</b>	No hay similitudes macroscópicas.	Tasa de remodelación ósea muy alta. Placas de crecimiento óseo abiertas durante toda la vida del roedor. Diferencias en composición, densidad y calidad ósea.	Fácil manipulación, tamaño y precio.	Poco traslacional, más indicados para estudios de screening.
<b>Conejos</b>	Mínima similitud macroscópica.	Anatomía ósea diferente, tamaño y forma diferentes. Estructura ósea primaria longitudinal. Tasa de remodelación más rápida.	Fácil manipulación y tamaño. Madurez esquelética alrededor de los 6 meses de edad. Modelo usado para el screening de materiales para implantes.	El tamaño limita el uso de implantes.
<b>Perros</b>	Hueso secundario. Composición y densidad ósea muy similar.	Hueso plexiforme adyacente a las áreas del periostio y del endostio. La densidad mineral es significativamente mayor. Tasa de remodelación ósea superior.	Implantes comerciales y material quirúrgico específico disponibles.	Cuadrúpedo. Variaciones significativas interindividuales debido a la diversidad de cruces. Aspectos éticos negativos.

<b>Cerdos</b>	Anatomía ósea, morfología, regeneración y remodelación muy representativa a la humana. Estructura lamelar similar. Densidad y concentración mineral ósea similares. Procesos de remodelación ósea similares, tasas de regeneración ósea similares (más que los perros).	Forma de los huesos largos diferente a la humana.	Estructura, composición y metabolismo óseo más parecidos con el humano.	Peso corporal excesivo. Manejo complicado. Cuadrúpedo.
<b>Cabras</b>	Composición mineral similar.	Estructura secundaria distribuida de forma no uniforme.	Huesos largos de tamaño similar a los humanos.	Cuadrúpedo. Manejo complicado.
<b>Ovejas</b>	Patrón similar de crecimiento óseo. Composición mineral similar.	Estructura ósea primaria en ovejas jóvenes (3-4 años). Estructura ósea secundaria más prevalente en ovejas de más de 7 años. Densidad ósea mayor. Dureza ósea mayor.	Huesos largos de tamaño similar a los humanos. Peso similar al humano. Animales de trato dócil.	Cuadrúpedo.

**Tabla 1.** Resumen de las características, ventajas e inconvenientes de los modelos animales más utilizados en ortopedia.

### 3. MODELOS ANIMALES DE DEFECTO ÓSEO SEGMENTARIO DIAFISARIO

#### 3.1. DEFINICIONES Y CONCEPTOS GENERALES

La investigación de la regeneración ósea en animales ha desarrollado diferentes modelos experimentales que incluyen estudios de la consolidación ósea en cualquier tipo de fractura (abierta, cerrada simples, conminuta, etcétera), el estudio de las condiciones que determinan los retardos de consolidación y la pseudoartrosis y la evaluación de los procesos de regeneración y la gran mayoría de las lesiones óseas creados *ex profeso* (58).

En general, el hueso posee una buena capacidad de curación y la gran mayoría de los defectos óseos, cuando son estimulados por un buen balance de las condiciones biológicas y micro-ambientales, se curan espontáneamente. Sin embargo, un gran defecto óseo no tiende a curar espontáneamente. Este hecho se ha aprovechado en los estudios experimentales de regeneración ósea para poder evaluar las condiciones de la misma, proponiendo realizar defectos óseos segmentarios diafisarios (DOSD) también llamados “defecto de tamaño crítico” (en inglés *critical size defect*, CSD).

En experimentación animal se han propuesto varias definiciones para el defecto de tamaño crítico. La clásica lo identifica como aquél defecto de tejido que no se cura completamente durante la vida útil natural de un animal (60–62). Según otros autores (34,63), el DOSD es aquel defecto que tiene menos del 10% de regeneración del hueso durante toda la vida del animal. Si el 10% de la regeneración no ha sido alcanzado en 1 año, es poco probable que ocurra.

Aunque el tamaño mínimo para que un defecto óseo pueda ser considerado DOSD no ha sido bien establecido, se estima que si el defecto óseo es de una longitud superior a 2-2,5 veces del diámetro del hueso afectado cumpliría los criterios de DOSD (58,64). Sin embargo, según Reichert *et al.* (47-49), un defecto crítico en los huesos largos no puede ser simplemente definido por su tamaño, porque también puede depender de otros factores como la especie, ubicación del defecto anatómico, los tejidos blandos asociados y las condiciones biomecánicas en

el miembro afectado, así como la edad, morbilidades metabólicas y las condiciones sistémicas, que afectan a la curación de defectos.

### **3.2. MODELOS ANIMALES**

Debido a las distintas causas de los defectos óseos, tamaños y localización, hay una constante búsqueda para encontrar sustitutos del tejido óseo adecuados en cada caso. Estos estudios se han convertido en una necesidad, y los modelos animales permiten una traslacionalidad que podría aportar soluciones en el ámbito de la medicina regenerativa, aplicables a la práctica clínica (58,65). Como ya se ha mencionado, la elección del modelo más adecuado dependerá de la finalidad del estudio, así, existen modelos de pequeños y grandes animales de defectos óseos críticos. Los modelos en especies de pequeño tamaño son más adecuados para evaluar mecanismos y parcialmente la funcionalidad (66). Los roedores (67–70), y conejos (71,72) son buenos para estos fines, ya que tienen un hueso con elevado metabolismo, por lo que se curan rápido (34). Esto hace que sean relativamente rentables y sean considerados como modelos de animales adecuados en estudios preclínicos. Sin embargo, para estudios traslacionales, los modelos con grandes animales son los preferidos. Los modelos en perros (64,73–75), cerdos (26,76–78), ovejas y cabras (27,79–82) se utilizan principalmente para probar la funcionalidad en situaciones de soporte de carga, y de entre todos ellos, la ovejas es la especie más utilizada (28,34,53–55).

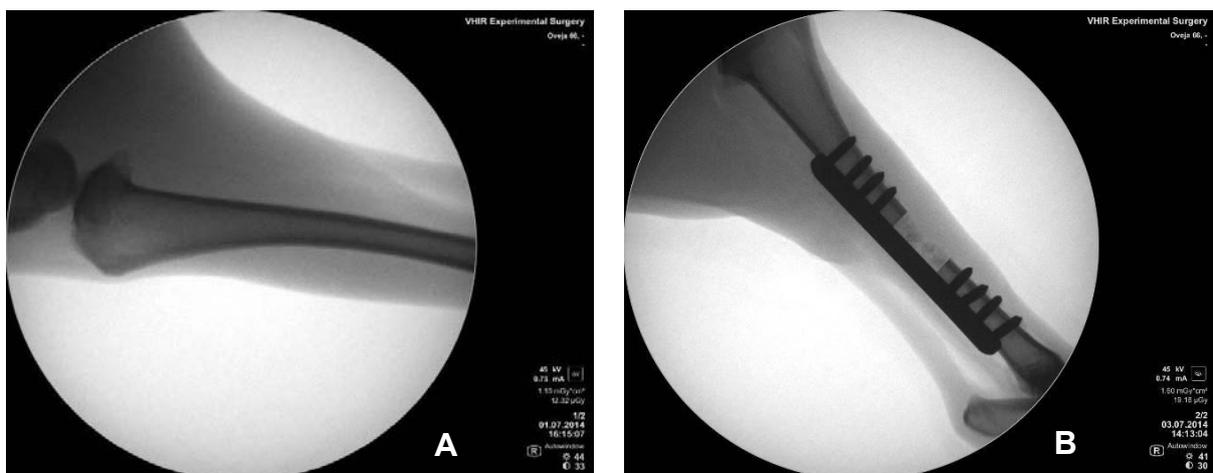
Otra aplicación de estos modelos animales es el estudio de la administración de fármacos implicados en la regeneración ósea (83).

Durante la última década, el número de ovejas utilizadas en los estudios de regeneración ósea ha aumentado debido a las múltiples ventajas que presentan en comparación con otros animales grandes como perros, cerdos o cabras (35). El peso corporal similar a los seres humanos y los huesos largos de dimensiones adecuadas para implantes humanos, son dos de estas ventajas ya descritas. Además, no hay grandes diferencias en la composición mineral y la remodelación del hueso, que es muy parecida a la de los seres humanos (84). Por otra parte, el perro es una opción poco deseada, ya que es un animal de compañía, hecho que se traduce en una

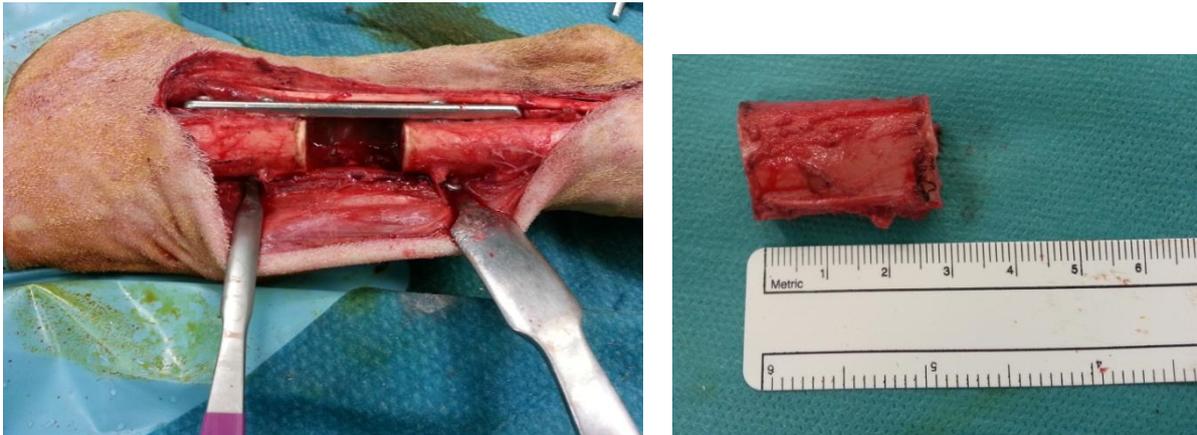
disminución de su uso para este tipo de estudios (34,58,85). Además, se ha de tener en cuenta que son estudios con altos costos y requieren, además, de una amplia experiencia y logística (35,36,58).

La mayoría de los estudios de regeneración ósea de defecto segmentario crítico optan, pues, por utilizar la especie ovina esqueléticamente madura y el sitio anatómico más común para producir estos defectos óseos es en la diáfisis tibial (58,86–89).

El grupo de Ingeniería Tissular Musculoesquelética, del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), ha puesto a punto en los últimos años un modelo de defecto óseo segmentario diafisario en tibia, utilizando ovejas adultas, en el que el cierre de las placas de crecimiento se comprueba mediante estudio radiográfico, utilizando como referencia el cierre de la fisis proximal tibial (Figura 3, A; pendiente de publicación). En este modelo, el defecto creado es de 3 cm (Figura 4) y la comprobación del correcto alineamiento de los fragmentos óseos y del defecto segmentario, así como de la adecuada colocación de la fijación interna y los tornillos transcorticales, se realiza también mediante un intensificador de imágenes radiológicas (Figura 3, B). La experiencia técnica del grupo con este modelo ha sido satisfactoria, por lo que se puso de manifiesto la oportunidad de refinar los protocolos anestésicos y analgésicos, con el fin de mejorar el manejo quirúrgico y la evolución postoperatoria.



**Figura 3** - Estudio radiográfico de la extremidad distal de la oveja. **A:** análisis del cierre de la placa de crecimiento de la fisis proximal tibial; **B:** imagen final del sistema de fijación interna.



**Figura 4** – Extremidad posterior intervenida de la oveja. Se visualiza la creación del defecto óseo segmentario de 3 cm en la tibia.

### 3.3. COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS EN EL MODELO OVINO

Diversas situaciones pueden agravar o alargar la duración de los estudios en animales, acarreando un indeseable aumento del número de individuos utilizados y pérdidas económicas importantes. Reportar los problemas clínicos, incluyendo la presentación de los resultados negativos, es de esencial importancia para facilitar investigaciones posteriores y para el pleno cumplimiento de los criterios bioéticos (90). Sin embargo, muchos estudios no proporcionan información relacionada con incidencias postoperatorias (91–96).

Se puede considerar un gran logro concluir estudios con grandes animales sin complicaciones durante las fases intraoperatoria, anestésica o de recuperación inmediata (97–99), o, en el mejor de los casos, en el estudio completo (100). Los problemas principales relacionados con el manejo anestésico son la regurgitación, la hipoventilación y el timpanismo. Se han reportado incidencias como neumonía por aspiración (101) o paro cardíaco (36). Es común encontrar distintas incidencias en modelos de defecto óseo segmentario crítico en ovejas como laminitis (98), infecciones (57,102,103), hinchazón (104), fracturas (98,103,105–107) o fracaso del material de osteosíntesis (102,108–111).

Para la inmovilización postoperatoria, se han descrito diversos sistemas de suspensión y enyesado. Los arneses (en terminología inglesa, *slings*) se utilizan como sistemas de suspensión, permiten que los animales se queden de pie y soporten su peso completo, impidiendo que se tumben y que recaigan fuerzas de carga máxima en la extremidad operada (90). Se puede realizar un vendaje de inmovilización para prevenir las fracturas (95,97,101,112), o en combinación con una suspensión de 24 h en un cabestrillo (109,111). También se ha descrito el uso de tenotomía percutánea del tendón de Aquiles para reducir la carga de peso sobre la extremidad intervenida (107). Mientras que hay estudios que especifican detalles como que no restringen la carga de peso y la deambulación de la extremidad intervenida (36,91,103,105,106,113), otros no proporcionan información (57,87,102,114,115).

#### 4. TÉCNICAS ANESTÉSICAS Y ANALGÉSICAS EN MODELOS DE ORTOPEDIA OVINO

La correcta elección de la técnica anestésica proporciona una mejora de las tasas de supervivencia de cualquier estudio en animales, lo que por tanto aumenta la eficiencia del modelo experimental. Utilizando el protocolo anestésico más adecuado, se asegura el bienestar de los animales, se reduce la morbilidad, se mejora el rendimiento y se garantiza la calidad de la investigación (116,117).

Schuppli CA y Fraser D (125), identificaron tres factores claves que impiden la correcta aplicación del principio de las 3R's:

- Incompleta comprensión del concepto de las 3R's (especialmente el "refinamiento").
- Falta de consenso entre los miembros de los comités de ética sobre la naturaleza y la importancia del dolor y sufrimiento de los animales.
- Falta de consenso en los comités de ética en la aplicación de medidas para minimizar el daño general a los animales utilizados (118).

Según Auer *et al.* (90), la R de "Refinamiento" se define como las técnicas usadas con el objetivo de minimizar el dolor de los animales, el sufrimiento y la angustia, siendo necesario el uso de la anestesia y la analgesia postoperatoria para reducir o minimizar el dolor y la angustia postoperatoria. Unos anestésicos apropiados y una correcta gestión de los analgésicos, adecuados a los objetivos científicos de los modelos de fractura, deberían ser indispensables para cumplir los objetivos de refinamiento en la investigación con animales.

Puede considerarse que los modelos animales de ortopedia corresponden, en general, a un nivel de severidad entre moderado y alto (15), y como tales se han de tratar.

#### 4.1. MANEJO PRE-OPERATORIO

Para un postoperatorio exitoso es necesaria una completa evaluación clínica en el periodo pre-operatorio y una correcta aclimatación de los animales.

La aclimatación es necesaria para que los animales se acostumbren al personal responsable de su cuidado, a la nueva instalación donde permanecerán estabulados, y a su manipulación (119). También durante este periodo se puede comprobar el correcto estado de salud de los animales (90). Para garantizar el restablecimiento de los valores fisiológicos basales, se ha recomendado un periodo mínimo de una semana (120), aunque en la literatura podemos encontrar tiempos de aclimatación muy diferentes como 1 mes (36), 3 semanas (104), 2 semanas (93) y 1 semana (99,103,121). Sin embargo, la mayor parte de artículos no proporcionan este tipo de información (57,91,92,94,95,100,101,114). Se recomiendan periodos más largos (3-4 semanas) para asegurarse de que los animales se adapten mejor a su medio ambiente, a las rutinas de las instalaciones y al personal (90).

A los animales se les debe ofrecer una dieta equilibrada durante todo el período de investigación. En algunos estudios (98,99,108,115) se ha descrito el mantenimiento de los animales con pienso comercial, heno y agua *ad libitum*. También deben someterse a un tratamiento antiparasitario eficaz (90). Se han propuesto diferentes tratamientos y pautas, según estos autores (96,97,110).

Existen diferentes corrientes, una de ellas (96,98,110) postula que el uso de los antibióticos no son necesarios siempre y cuando se utilice una técnica aséptica adecuada. Se evita tener que considerar las posibles interacciones entre los antibióticos y otros medicamentos, o entre los primeros y el proceso de cicatrización de la herida, así como los problemas de resistencia microbiana. Otra corriente (36,94,95,99,103,114) establece que las dosis terapéuticas de antibióticos de amplio espectro son indicadas en el pre-operatorio. Así, se han reportado el uso de antibióticos betalactámicos como las cefalosporinas, la amoxicilina (102,107), las penicilinas (93,97,121), fluoroquinolonas como la enrofloxacin (115) y lincomicina (57,92). Su consideración es que estos fármacos no interfieren con la consolidación ósea, y ayudan a reducir la morbilidad, hecho que se traduce en una reducción de

las pérdidas de los animales (90). Otros estudios (87,91,104,106,109,111) no proporcionan este tipo de información.

#### **4.2. TÉCNICAS ANESTÉSICAS**

Las técnicas de anestesia deben ser adecuadas para cada especie y cada tipo de manipulación, y esto requiere tener un conocimiento especializado. Se necesita experiencia y conocimientos sobre los posibles efectos adversos de los anestésicos y analgésicos empleados, así como sus posibles interacciones con los objetivos del estudio. Se hacen necesarios protocolos que abarquen, no sólo el momento de las intervenciones quirúrgicas, sino también el control de la recuperación de los animales, el cuidado de las fracturas y el manejo del dolor en todos los momentos de la experimentación.

Para los modelos de ortopedia ovina, los animales son normalmente sometidos a anestesia general. Los problemas anestésicos más frecuentes en ruminantes son: regurgitación, timpanismo abdominal, oxigenación inadecuada, depresión respiratoria, apnea o neumonía por aspiración (101). Para reducir estos riesgos, se recomienda realizar un periodo de ayuno adecuado, una intubación endotraqueal inmediata a la inducción anestésica y colocación de una sonda orogástrica (122–125). Se han reportado diferentes tiempos de ayuno de 12 horas (70,103,104), de 24 horas (121), de 48 horas (115) y de 24-36 horas (96,110).

En la mayor parte de estudios publicados se describen procedimientos anestésicos basados en la inhalación de una mezcla de isoflurano y oxígeno (93,95,114,121,126).

#### **4.3. TÉCNICAS ANALGÉSICAS**

El estudio del dolor en los animales es importante debido a las implicaciones éticas y los desafíos científicos planteados. Si reconocemos que los animales tienen la capacidad de experimentar dolor, entonces estamos obligados a minimizar su ocurrencia, a través de la prevención y el tratamiento.

Por otra parte, el dolor causa malestar físico y estrés que resultan en alteraciones de la homeostasis, incluyendo alteraciones cardiopulmonar, endocrinas, metabólicas y anomalías de termorregulación y cambios de comportamiento. Todo ello son potenciales interferencias en los resultados de los estudios.

Según Auer J *et al.* (90), hay tres requisitos para el manejo adecuado del dolor en los animales de experimentación:

- ✓ Conocimiento de la fisiopatología del dolor.
- ✓ Buen conocimiento farmacológico.
- ✓ Capacidad de identificar y evaluar el dolor en determinadas especies y animales individuales.

Para diseñar un protocolo de analgesia eficaz se debe tener en cuenta la especie animal, el tipo de intervención dolorosa y los posibles eventos que puedan tener lugar durante todo el procedimiento. En cualquier caso, la analgesia debe comenzar en el pre-operatorio para conseguir un efecto preventivo y cubrir el periodo postoperatorio, aunque son muchos los estudios que no proporcionan información del uso de analgésicos en este periodo (87,91–93,95,101,105,106,108,109,111).

La evaluación del dolor en pequeños rumiantes es difícil, ya que estos animales difícilmente muestran signos evidentes de dolor (propio de especies presa), y se han de buscar indicios como trastornos de la marcha o postura, mirada fija, rechinar de dientes, actividad motora repetitiva, inapetencia, y la separación del rebaño (119,127).

Los analgésicos más usados en ovino incluyen opioides, agonistas  $\alpha$ -2 adrenérgicos (agonistas  $\alpha$ -2), antiinflamatorios no esteroideos (AINE), y anestésicos locales (AL).

#### 4.3.1 OPIOIDES

El uso intraoperatorio de opioides es una práctica rutinaria dentro una técnica anestésica equilibrada (128,129). En algunos estudios se han utilizado en infusión continua de fentanilo (CRI) (95,121), y en otros en forma de parches transdérmicos, que producen una liberación sistémica continua durante las primeras 72 horas tras su aplicación (130,131), con unos niveles máximos a las 12-24 horas (132). Christou *et al.* (133) recomiendan la aplicación previa del parche de fentanilo (24-36 horas antes) en modelos de ortopedia, a una dosis mínima de 2 µg/kg/h. En modelos de defecto óseo segmentario diafisario se ha reportado el uso del parche de fentanilo a las 12 horas (36) y 72 horas (70,103) previas a la intervención quirúrgica. También se ha descrito el uso de otros opioides como buprenorfina (57,97), y combinaciones con AINE como el carprofeno (96,110,126) o flunixinina (115).

#### 4.3.2 AGONISTAS A-2 ADRENÉRGICOS

Se ha reportado el uso de un agonista α-2, como la xilacina, en una infusión continua a través de un catéter durante 3 días postoperatorio (100).

#### 4.3.3 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

Debido a su largo periodo de acción y su efecto analgésico y antiinflamatorio, los AINE son los fármacos de elección para el control del dolor postoperatorio, y se han utilizado en un gran número de estudios de ortopedia (70,102–104,107).

Dahners y Brian (134) han descrito que los AINE actúan bloqueando la ciclooxigenasa (COX), que es una enzima implicada en la producción de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. La isoforma COX-1 parece ser importante en la producción de prostaglandinas durante los procesos fisiológicos de diversos tejidos. La inhibición de la función de la COX-1 en el aparato digestivo parece ser responsable de muchos efectos secundarios de los AINE tradicionales, incluyendo las úlceras de estómago e intestino y las hemorragias digestivas.

Por el contrario, la COX-2 parece ser una isoforma inducible de COX, responsable de la respuesta inflamatoria que tiene lugar en diversos tejidos. Por lo tanto, los inhibidores selectivos de la COX-2 pueden reducir la inflamación sin producir tantos efectos secundarios gastrointestinales como la COX-1 (134).

Varias prostaglandinas, sobre todo la PGE<sub>2</sub>, son importantes para la formación de hueso nuevo. Por ello, los AINE tienen efectos significativos sobre este proceso, incluyendo la formación de hueso heterotópico tras una lesión, la neoformación ósea de la consolidación de las fracturas e incluso la formación de hueso alrededor de prótesis de recubrimiento poroso (134). En contraste con dichos efectos, muchos AINE parecen estimular la síntesis de colágeno, que puede tener un efecto beneficioso sobre la cicatrización de las partes blandas (134). Esto producirá una mayor resistencia del cartílago, de la piel y de los tendones. Aunque los datos disponibles sobre los inhibidores de la COX-2 no son tan amplios ni tan convincentes como los que existen sobre los AINE tradicionales, los inhibidores de la COX-2 también parecen tener efectos negativos sobre la formación de hueso nuevo (134).

Estudios experimentales con animales tratados con AINE, demuestran que la consolidación ósea es más lenta, que hay más casos de pseudoartrosis y que la consolidación es más débil (135,136).

Teniendo en cuenta que el uso de este medicamento durante el periodo de consolidación de la fractura retarda la consolidación (137), se deberían considerar alternativas, como el uso de anestésicos locales.

### **4.3.4 ANESTÉSICOS LOCALES**

Los AL impiden la propagación del impulso nervioso disminuyendo la permeabilidad del canal de sodio y bloqueando la fase inicial del potencial de acción, lo que da lugar a la pérdida transitoria de la función sensorial, motora y autonómica (138).

Los anestésicos locales más comúnmente usados son la lidocaína, la mepivacaína, la ropivacaína, la bupivacaína y la levobupivacaína. La ropivacaína, la bupivacaína y la levobupivacaína son anestésicos locales de acción prolongada y tienen el potencial de producir un bloqueo preferentemente sensitivo, con menor o escasa afectación motora, dependiendo de la concentración. Se debe tener en cuenta siempre las dosis tóxicas y nunca sobrepasarlas con el fin de evitar la toxicidad (139).

Se han descrito algunas formas de aplicación en cirugía ortopédica de DOSD, como la infiltración de bupivacaína alrededor de la herida antes del cierre, como analgesia postoperatoria (36).

La anestesia regional y los bloqueos nerviosos periféricos son ampliamente utilizados en anestesia humana. El uso de esta técnica se ve actualmente incrementada en animales siendo descrita en perros (140,141), gatos (142), conejos (143), cerdos (144), cabras (145) y ovejas (146,147).

## 5. BLOQUEO NERVIOSO PERIFÉRICO GUIADO POR ULTRASONOGRAFÍA Y CON NEUROESTIMULACIÓN

Se ha descrito una gran variedad de técnicas de anestesia regional para perros y gatos; sin embargo, sólo unos pocos métodos se han probado en pequeños rumiantes, siendo la administración espinal de analgésicos la técnica de elección para la cirugía de la extremidad posterior. Sin embargo, los bloqueos nerviosos periféricos al ser más distales y evitar la vía axial, permiten una anestesia selectiva en la zona intervenida, asimismo permiten evitar o disminuir el uso de opioides o AINE, no afectan a la hemodinámica ni a la función respiratoria, y reducen el tiempo de recuperación postoperatoria. Como consecuencia, el bienestar postoperatorio puede ser mejorado.

Según Waag *et al.* (148), la inervación de la articulación de la cadera es específica de cada especie. En el perro, esta articulación está inervada por los nervios ciático y femoral (este último aparentemente contiene tanto fibras motoras como sensitivas), y por el nervio glúteo craneal, que tiene exclusivamente función motora. En los seres humanos y el caballo, el nervio obturador, que también se considera puramente motor, está también implicado en esta articulación. En rumiantes no hay información específica publicada hasta el momento.

El uso de un estimulador nervioso periférico (ENP), neuroestimulador o neurolocalizador, es una alternativa actual a otros métodos de localización e identificación nerviosa (149). La neuroestimulación (NST) en anestesia regional es una técnica auxiliar de localización nerviosa que ha ido desplazando lentamente a las otras técnicas clásicas directas e indirectas, sobre todo a las parestésicas, para ocupar un lugar importante en anestesia regional y convertirse en el método de elección de identificación nerviosa durante muchos años, hasta la llegada reciente de la ultrasonografía (USG). La NST se puede utilizar sola o en combinación con la USG. La utilización conjunta permite, a través de la respuesta motora, confirmar que la estructura visualizada corresponde al nervio y permite la correcta infiltración del anestésico local alrededor del mismo.

La realización del bloqueo nervioso guiado por USG es una técnica emergente en la anestesia regional periférica, y ya se han descrito algunas técnicas en medicina humana y en animales de compañía (141,150).

La visualización ecográfica permite la distribución óptima del anestésico local alrededor de la estructura nerviosa y la prevención de complicaciones, como lesiones nerviosas o inyecciones intravasculares accidentales.

El uso de esta técnica requiere un conocimiento profundo de las estructuras anatómicas que participan (151–153). Como se ha mencionado, los nervios ciático y femoral son los principales nervios de la extremidad posterior.

El nervio ciático es la continuación del tronco lumbosacro. En su formación participan L6 y S2 (154). Tras dejar la cavidad pélvica, el nervio ciático pasa por el foramen isquiático mayor. En su trayecto, pasa dorsocaudalmente por la articulación coxofemoral protegido por el trocánter mayor y tuberosidad isquiática. Sigue el trayecto entre los músculos bíceps y semimembranoso. Inerva los músculos extensores de la cadera, los músculos flexores de la rodilla y la mayor parte de los músculos de la porción distal del miembro pelviano. Antes de llegar al músculo gastrocnemio, se divide en nervio tibial y peroneo común, ambos responsables de la inervación de todas las estructuras distales de la rodilla (155).

El nervio femoral se origina en los segmentos L4, L5 y L6 del tronco lumbosacro (155). Participa en la formación del nervio obturador. Pasa por el músculo psoas mayor y sigue los vasos femorales. Distalmente a estas estructuras, separa el nervio safeno como el principal nervio sensitivo de la articulación de la rodilla, estando en el borde caudal del músculo sartorio. Cerca de su origen, el nervio safeno envía ramas motoras para los músculos sartorio, pectíneo y grácil (156).

Un bloqueo periférico de estos nervios permite realizar una cirugía en la tibia y en la rodilla. Hasta el momento, solamente hay un estudio anatómico que describe la técnica del bloqueo del nervio ciático y femoral guiado por USG en ovejas *ex vivo* (148).

Las principales ventajas del uso de la USG en los bloqueos regionales son las siguientes (151):

- ✓ Visualización directa del nervio, de las estructuras adyacentes y de la difusión del anestésico local.
- ✓ Visualización de la aguja en tiempo real.
- ✓ Detección de variaciones anatómicas.
- ✓ Reducción del volumen de anestésico local utilizado.
- ✓ Disminución del tiempo en realizar la técnica.

### **5.1. BLOQUEO CONTINUO DE NERVIO PERIFÉRICO**

El bloqueo continuo de nervio periférico (BCNP) es una técnica de gran éxito en medicina humana para el tratamiento del dolor intenso en las extremidades (157), que consiste en una infusión continua de anestésico local a través de catéteres colocados junto a los nervios periféricos. El sistema infusor se basa en una bomba elastomérica que produce una liberación controlada del anestésico local y la velocidad de infusión puede ser regulada según requerimientos analgésicos. Se ha demostrado que proporciona un mejor control del dolor con menos efectos secundarios que los analgésicos sistémicos, mejorando la recuperación postoperatoria (158).

Permite extender la analgesia por el tiempo que se desee, por lo que podría resultar muy útil en el manejo postoperatorio de cirugías de modelos de DOSD, donde los mejores indicadores de eficacia son la correcta deambulación y la ingesta voluntaria de alimentos a pocas horas de la intervención. No obstante, se debe tener especial cura del sistema del catéter y reservorio y controlar signos de infección de forma periódica.

Asimismo, cuando se utiliza como parte de un protocolo anestésico multimodal, el BCNP puede reducir sustancialmente la cantidad necesaria de anestésicos generales durante la intervención, ayudando así a preservar la función cardiopulmonar adecuada en el paciente anestesiado.

De todo lo expuesto puede deducirse que resulta necesario desarrollar nuevas técnicas de refinamiento que disminuyan el dolor en procedimientos experimentales, especialmente en aquellos clasificados como moderados o severos. Si esto es indudable en cualquier especie animal, en ovino resulta aún de mayor interés por la escasa experiencia previa, y por el especial comportamiento de estos animales, que hace que la evaluación del dolor suponga un desafío.

El desarrollo de este tipo de técnicas de refinamiento contribuirá a un mayor bienestar animal durante el desarrollo de los estudios experimentales, así como a una mayor calidad de los resultados obtenidos, ya que se podrán evitar potenciales interferencias relacionadas con los mecanismos alterados por el dolor y/o con el uso de agentes analgésicos y anestésicos sistémicos.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **OBJETIVOS GENERALES**

- ✓ Desarrollar un método analgésico para la aplicación de un modelo de defecto óseo segmentario en oveja.
- ✓ Evaluar la aplicabilidad y eficacia de este método analgésico en el intra y postoperatorio de este modelo quirúrgico.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Desarrollar la técnica de bloqueo nervioso periférico de los nervios ciático / femoral con neuroestimulación guiado por ultrasonografía y aplicación de un bloqueo continuo a nivel ciático, en un modelo de defecto óseo segmentario en oveja.
- ✓ Comprobar la eficacia de esta técnica en la evolución postoperatoria, en términos del control del dolor y recuperación.
- ✓ Comprobar la validez de esta técnica como remplazo del uso de sustancias que enmascaran la evolución de la lesión.

## HIPÓTESIS CONCEPTUAL

- ✓ La aplicación de técnicas de analgesia locoregional en un modelo de defecto óseo segmentario en oveja es adecuada a la severidad del modelo, supone un refinamiento de éste y proporciona la analgesia necesaria para evitar el uso de sustancias que puedan interferir en los fenómenos del estudio.

## HIPÓTESIS OPERATIVA

- ✓ La aplicación de una técnica de bloqueo nervioso periférico continuo del nervio ciático guiado por ultrasonografía y con neuroestimulación, proporciona una analgesia óptima en el intra y postoperatorio de un modelo de defecto óseo segmentario en oveja, disminuyendo el tiempo de recuperación postoperatoria, sin enmascarar la evolución de la lesión.

## HIPÓTESIS ESTADÍSTICAS

- ✓ **Hipótesis nula:** la aplicación de una técnica de bloqueo nervioso periférico continuo del nervio ciático guiado por ultrasonografía y con neuroestimulación, NO proporciona analgesia suficiente en el intra y postoperatorio de un modelo de defecto óseo segmentario en oveja.
- ✓ **Hipótesis alternativa:** la aplicación de una técnica de bloqueo nervioso periférico continuo del nervio ciático guiado por ultrasonografía y con neuroestimulación, minimiza el dolor en el intra y postoperatorio de un modelo de defecto óseo segmentario en oveja, y disminuye el tiempo de recuperación postoperatoria.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



### ANIMALES

Para la realización del estudio se utilizaron 32 ovejas (*Ovis aries*) de la raza Ripollesa x Lacaune, procedentes del centro proveedor de animales A. M. Animalia Bianya S.L. (Gerona, España), inscrito en el registro de centros de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación con el número G9900009.

Se utilizaron ovejas adultas de entre 2 y 5 años de edad con un rango de peso entre 35,5 y 70 kg. Se comprobó mediante ecografía que las ovejas no estuvieran gestantes. Para la realización del estudio anatómico, se utilizaron miembros posteriores de ovejas utilizadas previamente en un proyecto de medicina fetal.

Antes de iniciar las diferentes fases del estudio, los animales fueron aclimatados durante un periodo mínimo de 4 días. Teniendo en cuenta que las ovejas son animales gregarios, fueron estabuladas en grupo.

Los parámetros ambientales se registraron y regularon diariamente durante todo el estudio. La temperatura se mantuvo dentro de un rango de 17-21 °C y la humedad de 45-65 %. El aire impulsado fue 100% exterior, prefiltrado y filtrado con un 95% de eficacia, y con una tasa de renovación de 15-20 ciclos/hora. El fotoperiodo se programó en 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, siendo el horario de luz de 8 a 20 h.

Todos los animales tuvieron libre acceso al agua dispensada por un bebedero automático de cazoleta. Su calidad química y microbiológica fue controlada regularmente. La dieta se compuso de heno *ad libitum*, un suplemento de pienso granulado que se les administró dos veces al día (con una formulación de 16,54 % de proteína, 4,6 % de fibra y 3,2 % de grasa), y un complemento de sal en bloque, durante todo el periodo experimental.

Las ovejas se monitorizaron diariamente durante todo el período del estudio. Este control incluyó: el aspecto y la condición corporal de la oveja, la observación de su conducta y hábitos, la ingesta de alimento y bebida, el seguimiento clínico del procedimiento y cualquier anomalía o incidencia. La observación de los animales fue realizada por cuidadores, técnicos, personal investigador involucrado, personal

asesor en bienestar animal y veterinarios que asistieron a estos animales. Durante las 24 horas se dispuso también de sistema de vigilancia remota, mediante cámara *webcam* que permitió grabar a las ovejas para estudiar y valorar su estado. Además, permitió poder estudiar su conducta sin la presencia de personas.

### ASPECTOS ÉTICOS

Los procedimientos experimentales incluidos en este estudio fueron revisados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEAA) del VHIR, con números de registro, 47/09 y 72/13. Asimismo, recibió el visto bueno del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya, con los números de orden 4980 y 8127, respectivamente.

El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Directiva Europea 2010/63/UE y la normativa nacional vigente en cada momento (reales decretos 1201/2005 y 53/2013), por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

### FASES DEL ESTUDIO

El presente estudio se realizó en tres fases, que se describirán en detalle en los siguientes párrafos:

**FASE 1.** Estudio anatómico de la inervación periférica del miembro pelviano ovino, con especial atención en los nervios ciático y femoral.

**FASE 2.** Prueba piloto de aplicación y eficacia de la técnica del bloqueo periférico de los nervios ciático y femoral guiado por ultrasonografía y con neuroestimulación.

**FASE 3.** Estudio experimental del refinamiento de la analgesia intra y postoperatoria, con aplicación de un bloqueo continuo del nervio ciático guiado por ultrasonografía y con neuroestimulación.

## **FASE 1. ESTUDIO ANATÓMICO DE LA INERVACIÓN PERIFÉRICA DEL MIEMBRO PELVIANO OVINO, CON ESPECIAL ATENCIÓN EN LOS NERVIOS CIÁTICO Y FEMORAL**

El estudio anatómico para la localización de los nervios ciático y femoral se abordó mediante dos técnicas:

- Disección macroscópica del miembro pelviano ovino, utilizando referencias óseas y estructuras vasculares.
- Estudio anatómico guiado por USG.

### **1. MATERIAL**

#### **1.1. ANIMALES**

Se reutilizaron 6 ovejas que habían sido incluidas previamente en un protocolo experimental de cirugía fetal, en el que no había habido manipulación de las extremidades posteriores. Los animales pesaron entre 50 y 70 kg, y se distribuyeron de la siguiente forma:

- Estudio anatómico por disección y localización de las estructuras de interés: 2 ovejas. Estudio *post mortem* examinando 4 extremidades posteriores.
- Comprobación de la técnica guiada por USG: 4 ovejas.

Previamente a la manipulación, los animales utilizados para el estudio anatómico se eutanasiaron mediante la administración de una sobredosis por vía intravenosa (IV) de pentobarbital sódico.

#### **1.2. EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS**

##### **1.2.1. DISECCIÓN DEL MIEMBRO PELVIANO**

- ✓ Instrumental quirúrgico (Figura 5): Mango de bisturí, pinza de disección, pinzas de disección con dientes, pinzas hemostáticas, tijera (Halstead; Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Alemania)

- ✓ Hoja de bisturí nº 24, (B.Braun, Tuttlingen, Alemania)
- ✓ Dormo®-Loop, en terminología inglesa “vessel loops”, de colores azul, naranja y amarillo (TELIC, S.A., Barcelona, España)
- ✓ Pentobarbital sódico 5% (Dr. Carreras, Hospital 14, Barcelona, España)



**Figura 5.** Instrumental quirúrgico utilizado para disección del miembro pelviano de la oveja.

### 1.2.2. ESTUDIO ANATÓMICO GUIADO POR ULTRASONOGRAFÍA

- ✓ Equipo portátil de ultrasonidos Mindray M7 (Schenzhen Mindray BioMedical Electronics Co., LTD. Nanshan, Shenzhen, China; Figura 6)
- ✓ Transductor Cónvex C5-2s, 2,5-5 MHz (Schenzhen Mindray BioMedical Electronics Co., LTD. Nanshan, Shenzhen, China)
- ✓ Transductor Lineal L14-6Ns, 8-12 MHz (Schenzhen Mindray BioMedical Electronics Co., LTD. Nanshan, Shenzhen, China)
- ✓ Aguja de estimulación nerviosa ecogénica, 22G x 50 mm, (Echoplex®, Vygon, Ecoen, Francia)
- ✓ Neuroestimulador, Stimuplex® HNS 12 (B. Braun, Melsungen, Alemania)
- ✓ Transonic Gel 250ml (TELIC, S.A., Barcelona, España)
- ✓ Jeringas 2.5, 5 y 10 ml BD Plastipak™ (Drogheda, Irlanda)
- ✓ Aguja 18G (ICO plus3®, Berlin, Alemania)
- ✓ Azul de metileno 1% (Dr. Carreras, Hospital 14, Barcelona, España)

- ✓ Suero glucosado 5% 500 ml (Viaflo, Baxter S.L, Valencia, España)



**Figura 6.** Preparación del material para la realización del bloqueo nervioso periférico de la extremidad posterior guiado por ultrasonografía de la oveja.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. DISECCIÓN DEL MIEMBRO PELVIANO

Después de realizar la eutanasia al animal, se posicionó en decúbito lateral (Figura 7) y se inició una exploración macroscópica para encontrar puntos de referencias óseas. Por palpación, se identificó la tuberosidad isquiática y el trocánter mayor del fémur.

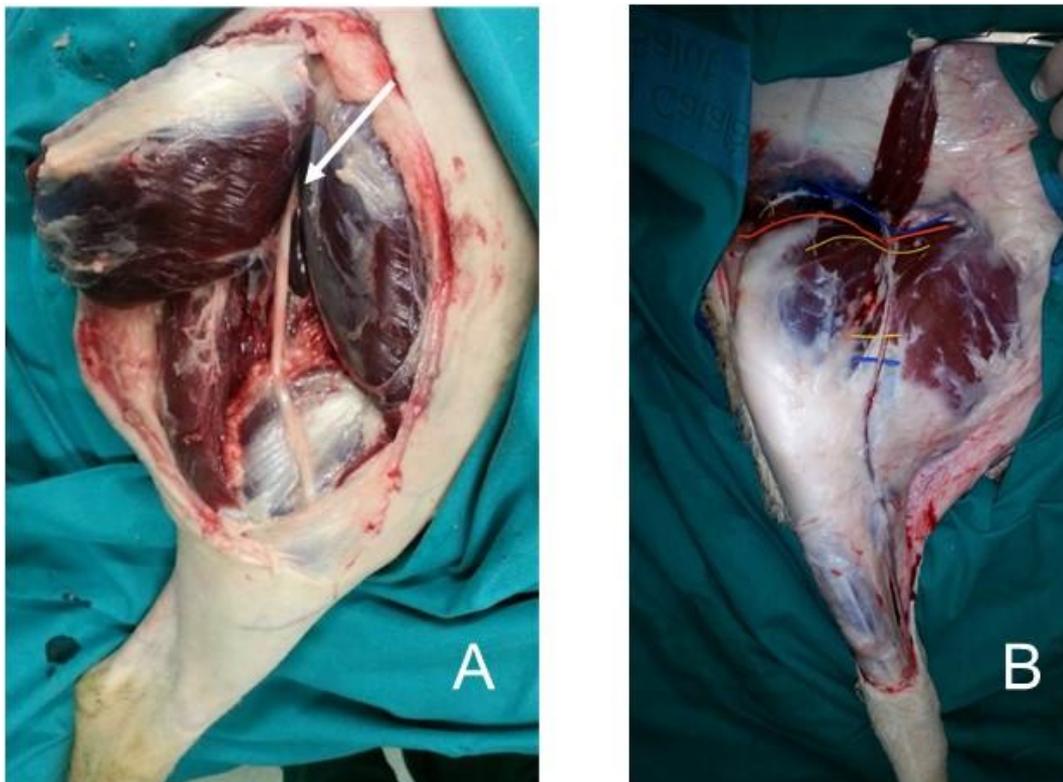


**Figura 7** - Miembro pelviiano de la oveja, vista lateral. Identificación de los puntos de referencias óseas: tuberosidad isquiática y trocánter mayor del fémur.

## FASE 1 - MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, se realizó una incisión y disección de la piel en la zona glútea para la visualización de la musculatura. Se realizó la desinserción de la porción craneal del músculo glúteo bíceps, y se localizó el nervio ciático y sus ramas debajo de la porción craneal del músculo bíceps femoral (Figura 8, A).

Se colocó al animal en decúbito dorsal y se realizó una incisión y disección de la piel en la zona inguinal para visualizar la musculatura. Se localizó la arteria safena y el nervio safeno y la vena safena media. Seguidamente se procedió a la desinserción de la parte distal de las porciones craneal y caudal del músculo sartorio con visualización de la arteria, vena y nervio femorales (Figura 8, B).



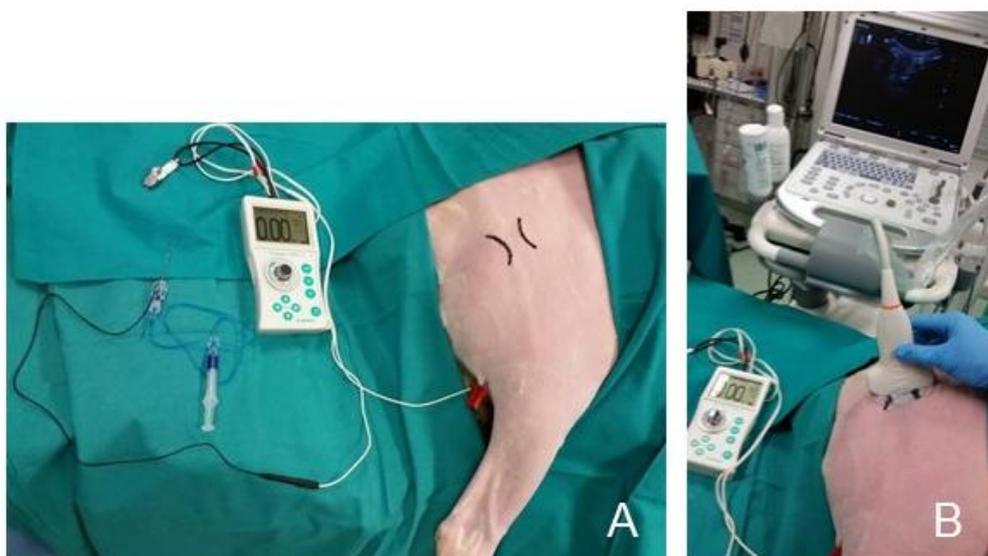
**Figura 8.** Disección miembro pelviano ovino - plexo lumbosacral; **A:** vista lateral, visualización del nervio ciático y sus ramas (flecha blanca). **B:** vista medial, colores más proximales marcan: azul la vena femoral; naranja la arteria femoral. Colores más distales marcan: azul la vena safena; amarillo nervio safeno.

## 2.2. ESTUDIO ANATÓMICO GUIADO POR ULTRASONOGRAFÍA

### 2.2.1. BLOQUEO PERIFÉRICO DEL NERVI0 CIÁTICO

Estando el animal bajo anestesia general y en decúbito lateral, se tomaron como puntos de referencia ósea la tuberosidad isquiática y el trocánter mayor del fémur.

La técnica se realizó con la ayuda de un neuroestimulador y bajo control ecográfico estricto, previas medidas de asepsia. El aparato de neuroestimulación se aplicó mediante un electrodo en la piel del animal y el otro extremo se conectó a la aguja de estimulación. El sistema fue purgado con suero glucosado al 5%. Se utilizó un transductor de baja frecuencia (cónvex) posicionando en un plano transversal entre la tuberosidad isquiática y el trocánter mayor del fémur (Figura 9). Se escaneó el área hasta visualizar una imagen hiperecogénica entre ambas estructuras óseas que teóricamente correspondía al nervio ciático (Figura 10).



**Figura 9.** **A.** Miembro pelviano de la oveja, vista lateral. La zona marcada indica la referencia ósea. **B.** Posición del transductor para localización del nervio ciático.

El avance de la aguja fue controlado en todo momento bajo visión dinámica ecográfica. Una vez posicionada la punta de la aguja al lado de la estructura elegida se aplicó un estímulo de entre 0,3 y 0,5 mA para poder confirmar la correcta identificación de la estructura nerviosa. Inmediatamente se consiguió una respuesta motora flexo-extensora distal de la extremidad posterior (respuesta a nivel de las falanges) que se aceptó como válida de nervio ciático.

Finalmente se inyectó una solución de azul de metileno diluida en suero fisiológico (1 ml, 0,1%) bañando el nervio ciático.



**Figura 10.** Imagen ecográfica del miembro pelviano de la oveja; (N) nervio ciático.

### 2.2.2. BLOQUEO PERIFÉRICO DEL NERVIO FEMORAL

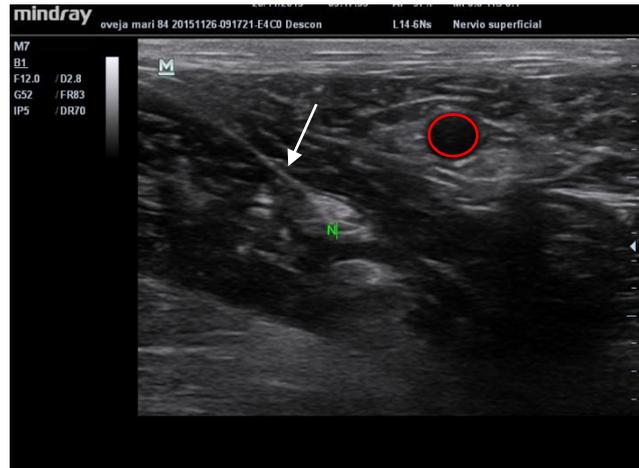
Girando el miembro pelviano con un ángulo de 90°, se procedió a la localización del nervio femoral. La vena y la arteria femorales, localizadas ecográficamente, se utilizaron como puntos de referencia anatómica. Se posicionó el transductor lineal de alta frecuencia en un plano transversal al músculo sartorio, localizando la imagen ecográfica de la vena y arteria femorales (Figura 11).



**Figura 11.** Imagen de la oveja en decúbito dorsal, mostrando la zona medial del miembro pelviano. Posición del transductor para localización de la vena y arteria femorales.

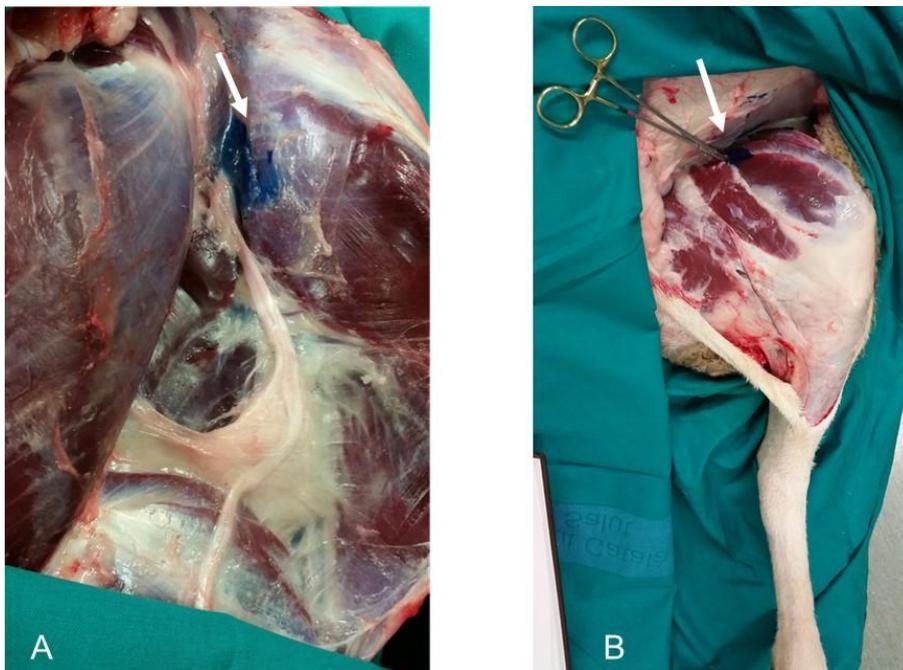
El nervio se identificó como una estructura hiperecogénica bien delimitada en el centro de la pantalla del ecógrafo (Figura 12) y se procedió al abordaje con la aguja de estimulación nerviosa. El avance de la aguja se controló de la misma forma que en la técnica anterior hasta el alcance de una respuesta motora flexo-extensora proximal de la extremidad posterior (respuesta patelar) que se aceptó como válida del nervio femoral. Seguidamente se inyectó una solución de azul de metileno diluida en suero fisiológico (1 ml, 0,1%) bañando el nervio femoral.

## FASE 1 - MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura 12.** Imagen ecográfica del miembro pelviano de la oveja. (N) nervio femoral; (círculo rojo) arteria femoral; (flecha blanca) imagen hiperecogénica del trayecto de la aguja.

A continuación, se realizó una disección tal y como se describe en el apartado 2.1. y se comprobó la zona teñida (Figura 13).



**Figura 13.** Miembro pelviano de la oveja, visualización de la zona teñida con azul de metileno (flecha blanca). **A:** vista lateral, zona teñida del nervio ciático **B:** vista medial, zona teñida del nervio femoral.

## **FASE 2. PRUEBA PILOTO DE APLICACIÓN Y EFICACIA DE LA TÉCNICA DEL BLOQUEO PERIFÉRICO DE LOS NERVIOS CIÁTICO Y FEMORAL GUIADO POR ULTRASONOGRAFÍA Y CON NEUROESTIMULACIÓN**

Desarrollo de la técnica del bloqueo periférico de los nervios ciático / femoral guiado por USG y con neuroestimulación. Se comprobó la duración del bloqueo sensitivo y los efectos del bloqueo motor.

### **1. MATERIAL**

#### **1.1. ANIMALES**

Se incluyeron 8 ovejas con un peso entre 35 y 60 kg. Cuatro de ellas (Grupo I) eran reutilizadas, similares a las descritas en la fase anterior, y las otras 4 (Grupo II) formaban parte del grupo piloto para el desarrollo del modelo de defecto óseo segmentario.

#### **1.2. INSTRUMENTOS Y APARATOS**

##### **1.2.1. ANESTESIA, INTUBACIÓN Y MONITORIZACIÓN**

- ✓ Respirador Datex-Ohmeda Aespire-7900 (GE Healthcare, Madison, EEUA)
- ✓ Monitor Datex-Ohmeda Cardiacap™ /5 (GE Healthcare, Madison, EEUA)
- ✓ Bombas de perfusión Lifecare® Micro Macro (Abbott vascular, Santa Clara, EEUU).
- ✓ HOTLINE® Fluid Warmer (Smiths Medical, Kent, Reino Unido)
- ✓ Aguja intramuscular 21G
- ✓ Abbocath 20G y 22G Venisystems (Hospira, Sligo, Irlanda).
- ✓ Jeringas 5, 10, 20 ml (BD Plastipak™, Drogheda, Irlanda).
- ✓ Mascarilla anestesia VetCare® (B.Braun S.A., Barcelona, España)
- ✓ Laringoscopio pala Miller 4 (Truphatek®, Netanya, Israel).
- ✓ Tubo endotraqueal con balón de 10, 10.5, 11 mm (Rusch, Co Westmeath, Irlanda)

- ✓ Electrodo Ambu Blue Sensor VL (Ambu®, Ballerup, Dinamarca).

### **1.2.2. REALIZACIÓN DEL BLOQUEO PERIFÉRICO DE LOS NERVIOS CIÁTICO Y FEMORAL**

Material descrito en la Fase 1 – Apartado 1.2.2.

## **2. FÁRMACOS**

### **2.1. PREMEDICACIÓN, ANESTÉSIA Y POSTOPERATORIO**

- ✓ Fentanilo transdérmico Fendivia 25, 50, 75, 100 µg/h (Nycomed, Roskilde, Dinamarca)
- ✓ Midazolam 15 mg/3ml Midazolam Sala (Lab. Ramon Sala, S.L., Barcelona, España)
- ✓ Propofol 10 mg/ml Propofol Fresenius (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Alemania)
- ✓ Antibiótico Cefazolina 1g Cefazolina Sala (Lab. Ramon Sala, S.L., Barcelona, España)
- ✓ Amoxicilina - Duphamox LA (Zoetis, Madrid, España)
- ✓ Isoflurano Forane® (AbbVie Farmacéutica, S.L.U., Madrid, España)
- ✓ Suero Ringer lactato 500 ml - Viaflo Hartmann (Baxter S.L, Valencia, España)
- ✓ Fentanilo 0,05 mg/ml - Fentanest® (Kern Pharma, Barcelona, España).
- ✓ Metamizol magnésico 0,4 g/ml - Nolotil 2 g/5 ml (Boehringer Ingelheim, Barcelona, España)
- ✓ Morfina hidrocloreto 20 mg/ml - Morfina 2% (B. Braun Medical S.A., Jaén, España)
- ✓ Carprofeno 50 mg/ ml - Rimadyl® (Zoetis, Madrid, España)

## 2.2. REALIZACIÓN DEL BLOQUEO PERIFÉRICO DE LOS NERVIOS CIÁTICO Y FEMORAL

- ✓ Povidona yodada - Iodina 10% (Lab. Farm. Orravan, S.L., Barcelona, España)
- ✓ Suero glucosado 5%
- ✓ Ropivacaína 2 mg/ml - Ropivacaína G.E.S. (Genéricos Españoles Laboratorio, S.A., Madrid, España)

## 3. MÉTODOS

### 3.1. PREMEDICACIÓN Y ANESTESIA PARA LA REALIZACIÓN DEL BLOQUEO PERIFÉRICO DEL NERVIO CIÁTICO Y FEMORAL

**Grupo I** - se realizó una inducción con propofol a una dosis de 4 mg/kg por vía intravenosa (IV) a través de un acceso venoso establecido en la vena cefálica del miembro anterior, y se mantuvo la anestesia mediante una mezcla de 100% de oxígeno y 3% de isoflurano, aplicada mediante una mascarilla durante todo el procedimiento.

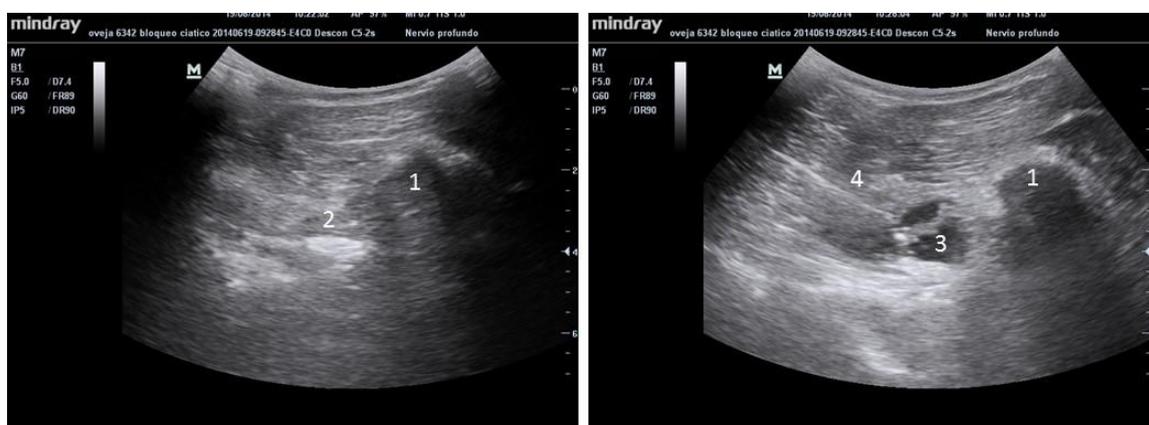
**Grupo II** – se realizó bajo anestesia inhalatoria con ventilación mecánica. La analgesia pre-operatoria consistió en la aplicación de un parche transdérmico de fentanilo en el antebrazo a dosis de 2,5–5 µg/kg, 24 h antes de la intervención quirúrgica. Como premedicación, se utilizó midazolam a 0,5 mg/kg, administrado por vía intramuscular (IM) mientras los animales estaban en el establo. A continuación, se transportaron en un carro hasta el pre-quirófano, donde se canalizó la vena cefálica a través de la que se inyectó propofol (4 mg/kg) como inducción anestésica. Asimismo, se canuló la arteria auricular media para la monitorización de la presión arterial. Durante toda esta manipulación, se aplicó oxígeno al 100% a través de una mascarilla anestésica.

La intubación endotraqueal se realizó ya en el quirófano, y la anestesia se mantuvo con una  $FiO_2$  de 50-60% de oxígeno y 1,5-2% de isoflurano. Se colocó una sonda orogástrica a fin de evitar el timpanismo ruminal y minimizar el hinchazón por el acúmulo de los gases libres en el rumen. Durante el procedimiento quirúrgico, se infundió de manera continua la solución de Ringer lactato a 10 ml/kg/h. Como analgesia intraoperatoria se administró una infusión continua de fentanilo (CRI) a una velocidad de 10  $\mu$ g/kg/h. Los parámetros ventilatorios de anestesia fueron monitorizados permanentemente, controlándose las fracciones inspiradas ( $Fi$ ) y espiradas ( $Fe$ ) de  $O_2$ /Isoflurano, la presión arterial de  $CO_2$  ( $PaCO_2$ ) y la concentración final de  $CO_2$  ( $ETCO_2$ ). La monitorización de parámetros como temperatura corporal, frecuencia cardíaca, electrocardiograma, pulsioximetría y presión arterial invasiva fueron igualmente registrados mediante un monitor. Como profilaxis antibiótica, todos los animales recibieron 22 mg/kg IV de cefazolina en el momento de la inducción anestésica y 15 mg/kg IM de amoxicilina en el postoperatorio.

### 3.2. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA DEL BLOQUEO PERIFÉRICO

#### 3.2.1. BLOQUEO DEL NERVI0 CIÁTICO

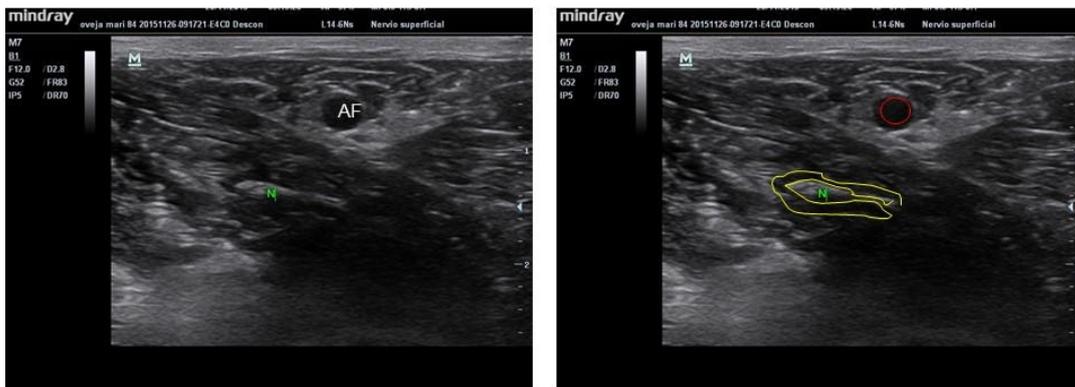
Se siguió el mismo método descrito para la Fase 1 (apartado 2.2.1.). Una vez conseguida una respuesta motora flexo-extensora distal de la extremidad posterior, se realizó la prueba de aspiración negativa de sangre y se inyectó ropivacaína 0,2%, hasta que el nervio ciático quedaba rodeado por el anestésico. La imagen característica que se obtuvo se denomina “imagen de donut” (Figura 14).



**Figura 14.** Imagen ecográfica del miembro pelviano de la oveja. 1: tuberosidad isquiática; 2: nervio ciático; 3: nervio ciático rodeado de AL; 4: imagen hiperecogénica del trayecto de la aguja.

### 3.2.2. BLOQUEO DEL NERVIIO FEMORAL

Seguidamente se procedió a la realización del bloqueo periférico del nervio femoral – como se describe en la Fase 1 (apartado 2.2.1.), y una vez se consiguió una respuesta motora flexo-extensora distal de la extremidad posterior, se realizó la prueba de aspiración negativa de sangre y se inyectó ropivacaína 0,2% hasta comprobar que el nervio femoral quedaba rodeado de AL (Figura 15).



**Figura 15.** Imagen ecográfica del miembro pelviano de la oveja. N: nervio femoral; AF / círculo rojo: arteria femoral; en amarillo: zona delimitada con AL rodeando el nervio femoral.

### 3.3. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA SENSITIVA Y MOTORA

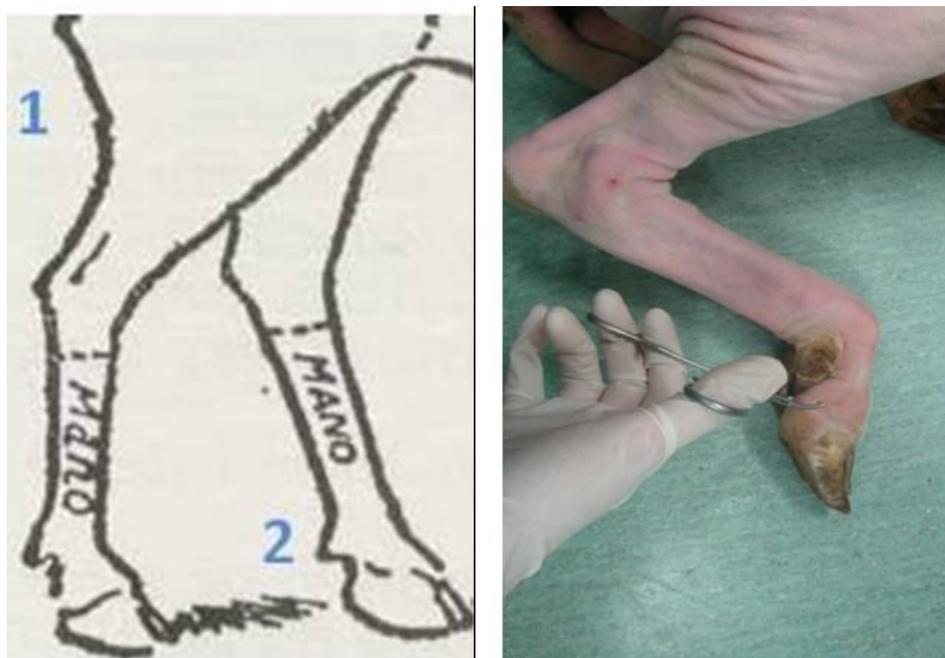
Después de la aplicación del anestésico local se evaluó la eficacia y duración del bloqueo nervioso valorando la función sensitiva y la motora en la extremidad posterior anestesiada.

La función sensitiva se evaluó en cada extremidad mediante la aplicación de un estímulo nocivo, pellizcando con una pinza hemostática de mosquito (Halstead; Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Alemania).

El estímulo se aplicó cada 60 minutos, desde la finalización de la técnica hasta que se produjo la retirada del miembro en la cara medial y lateral del área de la tibia, metatarsos y falanges (Figura 16).

La función motora se evaluó en cada oveja probando su capacidad para soportar el peso sobre la extremidad anestesiada cada 60 minutos.

Las evaluaciones sensitivas y motoras se registraron en una ficha diseñada para este fin (ver Anexo I).



**Figura 16.** Esquema para evaluación de la respuesta al estímulo nocivo por pellizco de la extremidad posterior anestesiada de la oveja. 1: diseño de la cara lateral para la evaluación de respuesta al estímulo; 2: diseño de la cara medial para la evaluación de respuesta al estímulo. Visualización del estímulo nocivo siendo aplicado en la extremidad anestesiada.

## **FASE 3. ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL REFINAMIENTO DE LA ANALGESIA INTRA Y POSTOPERATORIA, CON APLICACIÓN DE UN BLOQUEO CONTINUO DEL NERVI PERIFÉRICO CIÁTICO GUIADO POR ULTRASONOGRAFÍA Y CON NEUROESTIMULACIÓN**

Valoración del efecto del bloqueo periférico del nervio ciático, con aplicación de un bloqueo continuo realizado por la técnica de estimulación nerviosa guiada por USG, en un grupo de animales sometidos a la cirugía de defecto óseo segmentario en tibia. Seguimiento postoperatorio para valoración del bloqueo continuo durante 2 semanas.

### **1. MATERIAL**

#### **1.1. ANIMALES**

Para esta fase del estudio se utilizaron 20 ovejas, distribuidas de la siguiente forma:

- Grupo A (n = 9): no se les realizó ni bloqueo periférico del nervio ciático ni bloqueo continuo.
- Grupo B (n = 11): se les realizó la técnica del bloqueo periférico del nervio ciático y se les aplicó el bloqueo continuo.

#### **1.2. INSTRUMENTOS Y APARATOS**

##### **1.2.1. HABITUACIÓN AL SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN (VENDAJE – Figura 17)**

- ✓ Venda de inmovilización de poliéster Delta-Cast® Elite (BSN Medical, Hamburg, Alemania)
- ✓ Vendaje de espuma 3M™ Microfoam™ (Surgical Tape, Nederland, EEUA)
- ✓ Venda para acolchado sintético Soffban® S (BSN Jobst, S.L., Barcelona, España)
- ✓ Vendaje elástico Coverplast® Standart (BSN Medical, Hamburg, Alemania)
- ✓ Venda elástica adhesiva LF-BSN® (BSN Medical, Hamburg, Alemania)

- ✓ Apósito de espuma Mipelex® Talon (Mölnlycke Health Care, Göteborg, Suecia)
- ✓ Sierra de yeso (Hebu Medical, Tuttlingen, Alemania)



**Figura 17** – Material necesario para aplicación del vendaje: bote para humedecer la venda de inmovilización de poliéster, venda para acolchado sintético, vendaje elástico, vendaje de espuma y venda elástica adhesiva.

### 1.2.2. ANESTESIA, INTUBACIÓN Y MONITORIZACIÓN

Materiales idénticos a los descritos en la Fase 2 (Apartados 1.2.1.).

### 1.2.3. COLOCACIÓN DEL BLOQUEO CONTINUO Y REALIZACIÓN DEL BLOQUEO PERIFÉRICO DEL NERVIÓ CIÁTICO

- ✓ Material descrito en la Fase 1 (Apartado 1.2.2.) - (Figura 18)
- ✓ Set de catéter para el bloqueo continuo de nervios periféricos, Contiplex® C (B. Braun, Melsungen, Alemania)
- ✓ Multirate Infusor LV® (Baxter, Healthcare Corporation, Zurich, Suiza)
- ✓ Funda para sonda con gel Ultracover® (Microtek Medical Malta LTD., Mosta, Malta)
- ✓ Aguja 19G
- ✓ Abbocath 14G

- ✓ Jeringas 5 y 10 ml
- ✓ Bisturí nº 11
- ✓ Sutura de seda 2 Silkam® (B.Braun, Barcelona, España)
- ✓ Apósitos quirúrgicos de tela Texpol® (Texpla, Barcelona, España)
- ✓ Apósito autoadhesivo Mepore® (Mölnycke Health Care AB, Göteborg, Suecia)
- ✓ Grapadora de piel Proximate 35 (Ethicon Endo-Surgery, LLC, Guaynabo, Puerto Rico)
- ✓ Chaleco para soporte del infusor de ropivacaína (Tapicería Gallardo, Barcelona, España)



Figura 18. Material para colocación del bloqueo continuo, bolsa de ropivacaína y Multirate infusor LV.

## 2. FÁRMACOS

### 2.1. PREMEDICACIÓN, ANESTÉSIA Y POSTOPERATORIO

Fármacos idénticos a los descritos en la Fase 2 (Apartado 2.1.).

- ✓ Ropivacaína 2 mg/ml
- ✓ Povidona yodada
- ✓ Gel de povidona yodada - Betadine® Gel (Meda Pharma SAU, Madrid, España)
- ✓ Jabón de povidona yodada - Kendall® (Covidien, Barcelona, España)

- ✓ Nitrofurazona 2 mg/g - Furacín Pomada (SEID, S.A., Barcelona, España)
- ✓ Cyclo Spray 2,45% p/p (EuroVet Animal Health, Bladel, Países Bajos)
- ✓ Fisiológico - solución de irrigación 0,9% 500 ml (Fresenius Kabi, Barcelona, España)

## **2.2. COLOCACIÓN DEL BLOQUEO CONTINUO Y REALIZACIÓN DEL BLOQUEO PERIFÉRICO DEL NERVIO CIÁTICO**

- ✓ Ropivacaína 2 mg/ml

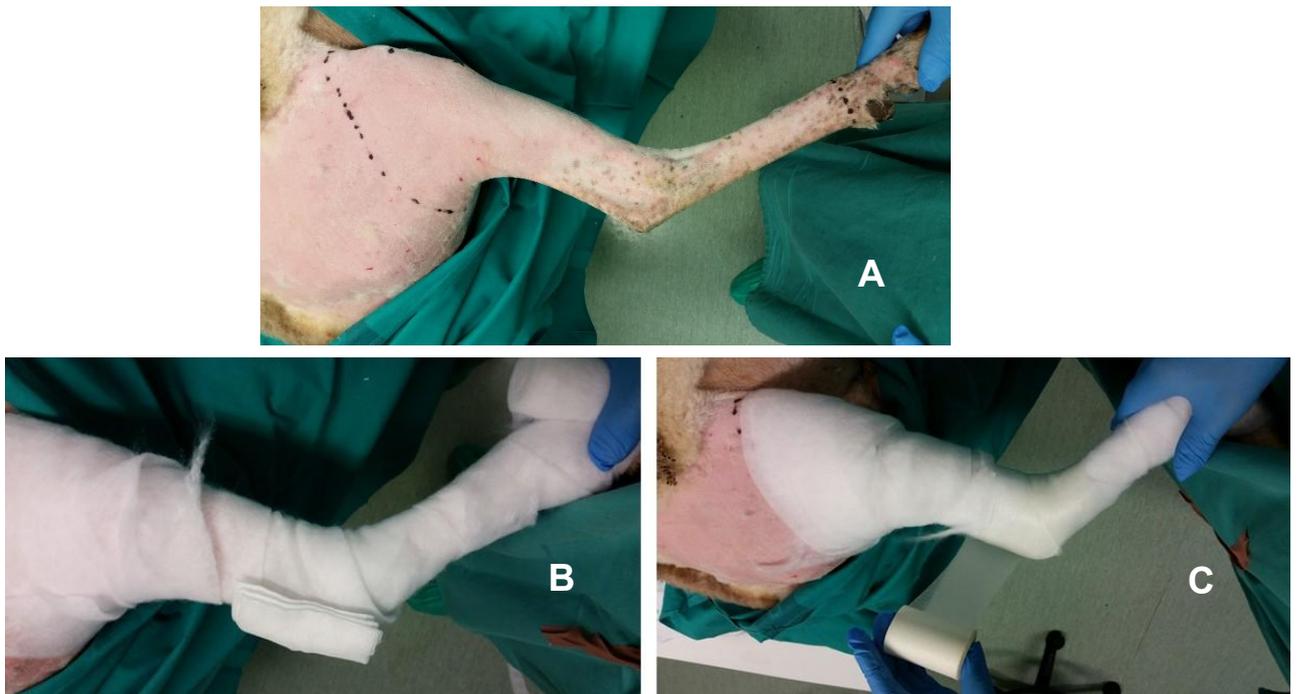
## **3. MÉTODOS**

### **3.1. HABITUACIÓN PREVIA DE LOS ANIMALES AL SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN (VENDAJE)**

Previamente a la intervención quirúrgica, se habituó a los animales al sistema de inmovilización de la extremidad intervenida, durante un periodo de 2-7 días. Este procedimiento se realizó sin sedación.

Estando el animal en decúbito lateral izquierdo, se rasuró y limpió la extremidad posterior derecha. A continuación se delimitó la zona tomando como límites proximal la tuberosidad tibial anterior (TTA) y como límite distal la pezuña, a nivel de la falange proximal (Figura 19, A) y se aplicó un vendaje de acolchado sintético dejando la pezuña sin cubrir.

Para prevenir presión y posibles rozaduras sobre la tuberosidad calcánea, se colocó una doble capa de relleno de acolchado y gasas (Figura 19, B). Seguidamente se aplicó un vendaje elástico sobre el vendaje de acolchado (Figura 19, C).



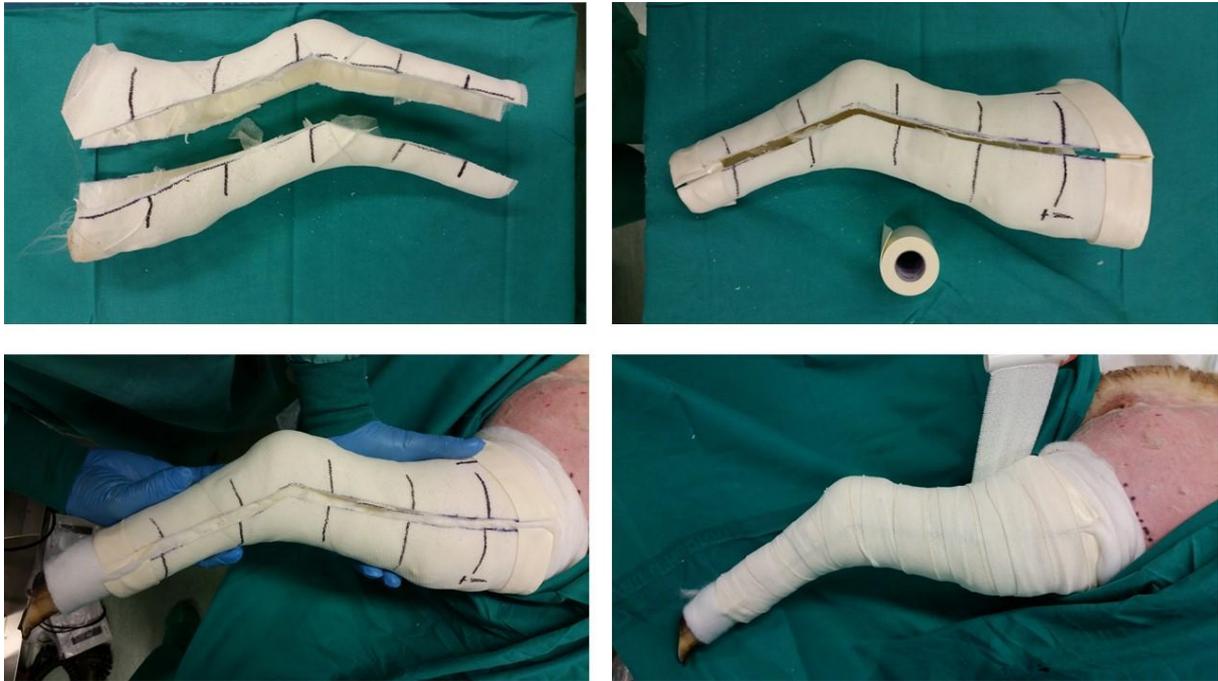
**Figura 19.** **A:** delimitación de la zona de inmovilización de la extremidad posterior de la oveja marcando como límite proximal la tuberosidad tibial anterior (TTA) y límite distal la pezuña, a nivel de la falange proximal, dejando esta sin cobertura. **B:** aplicación de vendaje de algodón y colocación de doble capa de algodón y gasas sobre la tuberosidad calcánea. **C:** aplicación de vendaje elástico sobre el vendaje de algodón.

Por encima del vendaje acolchado y a lo largo de toda la extremidad, se aplicó una venda de poliéster previamente sumergida en agua entre la rodilla y la falange proximal (ambos en una flexión de 30°). Una vez el vendaje sintético presentó una consistencia dura y seca, se marcó con un rotulador una alineación en el vendaje (Figura 20).



**Figura 20** – Venda de inmovilización de poliéster sumergido en agua. Miembro pelviano de la oveja, aplicación del vendaje entre la rodilla y la falange proximal ambos con una flexión de 30°. Obteniendo el vendaje con una consistencia endurecida y seca, se procedió a marcar con un rotulador la alineación del vendaje.

Seguidamente el vendaje se fragmentó en dos piezas con una sierra de yeso (Figura 21), con el fin de facilitar la cura de la herida quirúrgica así como el cambio del vendaje interior de acolchado. La frecuencia con la que se realizaron las curas dependió de las necesidades de cada animal pero, mínimo fue de dos veces a la semana. Los extremos de la venda de inmovilización de poliéster se protegieron con un vendaje de espuma para prevenir cortes y rozaduras causados por el material. En la cara más externa se aplicó una venda elástica adhesiva para fijar las dos piezas.



**Figura 21** – Después de la fragmentación del vendaje en dos piezas, se protegió los extremos con un vendaje de espuma para prevenir cortes y rozaduras. En la extremidad posterior de la oveja se aplicó las dos piezas y en la cara más externa una venda elástica adhesiva como fijación.

Después de 2 días del inicio de la habituación del vendaje, se inició la habituación al chaleco diseñado para soportar el sistema infusor de anestésico local (Figura 22).



**Figura 22** – Animal en el establo durante período de habituación del vendaje de la extremidad a intervenir y del chaleco (soporte del sistema infusor de AL).

El día de la cirugía, se retiró el vendaje, se limpió y se desinfectó la extremidad a intervenir. Al final de la cirugía, se aplicó gel de povidona yodada a la herida quirúrgica y se procedió a colocar un nuevo vendaje como descrito anteriormente (Figura 23).



**Figura 23** – Oveja al final de la intervención durante postoperatorio inmediato, aplicación de mascarilla anestesia con O<sub>2</sub>. Visualización del vendaje en la EPD y chaleco con infusor de AL.

### 3.2. TIPOS DE TRATAMIENTO EN EL MODELO ORTOPÉDICO DE DEFECTO ÓSEO SEGMENTARIO DIAFISARIO

Para este modelo de ortopedia se estipularon diferentes tratamientos para comprobar su participación en la regeneración ósea. En el día de la intervención quirúrgica, se efectuó una osteotomía obteniendo un defecto óseo de 30 mm de eje longitudinal en toda su circunferencia (Figura 24, A). El defecto se rellenó con un biomaterial y los animales recibieron distintos tratamientos con células mesenquimales (MSC; del inglés Mesenchymal Stromal Cells) autólogas (AU) y alogénicas (ALG) o con el biomaterial sin ninguna carga celular (Figura 24, B).



**Figura 24** – Extremidad posterior de la oveja, intervención para creación del defecto óseo segmentario de la tibia. **A:** defecto óseo de 30 mm. **B:** aplicación del biomaterial como tratamiento.

### **3.3. REALIZACIÓN DE LA ANESTESIA Y ANALGESIA DEL GRUPO A**

El procedimiento anestésico que se usó fue el mismo que el descrito en el Grupo B de la Fase 2. La analgesia postoperatoria consistió en la aplicación de un parche transdérmico de fentanilo en el antebrazo a dosis de 2,5–5 µg/kg, 24 h antes de la intervención. Después de 72 h de su aplicación se empleó un nuevo parche en el antebrazo contralateral. Según el peso del animal se calculó la dosis para la correcta combinación de los parches (presentación de 25, 50, 75 y 100µg/h). Se administró también carprofeno a dosis de 2-4 mg/kg SC, durante 3 días. En caso de necesidad de analgesia de rescate, se administró parche transdérmico de fentanilo 2,5–5 µg/kg, metamizol magnésico 40 mg/kg IM, carprofeno 2-4 mg/kg SC o morfina 0,2-0,5 mg/kg IM (159).

### **3.4. REALIZACIÓN DE LA ANESTESIA Y ANALGESIA DEL GRUPO B**

También se siguió el procedimiento anestésico descrito en el Grupo B de la Fase 2, con la salvedad de que, para conseguir analgesia intra y postoperatoria, se realizó el bloqueo continuo periférico del nervio ciático con neuroestimulación guiada por USG con ropivacaína. Como en el grupo anterior, se aplicó un parche transdérmico de fentanilo a dosis de 2,5–5 µg/kg en el antebrazo, 24 h antes de la intervención. Transcurridas 72 h desde su aplicación se empleó uno nuevo en el antebrazo contralateral. En caso de necesidad de analgesia de rescate, se administró parche transdérmico de fentanilo 2,5–5 µg/kg, metamizol magnésico 40 mg/kg IM, carprofeno 2-4 mg/kg SC o morfina 0,2-0,5 mg/kg IM.

### **3.5. COLOCACIÓN DEL BLOQUEO CONTINUO DEL NERVI PERIFÉRICO CIÁTICO**

La técnica se realizó bajo control ecográfico. Se utilizó el catéter para el bloqueo continuo de nervios periféricos y un estimulador.

### FASE 3 - MATERIAL Y MÉTODOS

Se conectó el cable de electrodo del neuroestimulador a la aguja de estimulación, y el electrodo a la piel del animal. El sistema fue purgado con suero glucosado al 5%. Se posicionó el transductor convexo en un plano transversal entre la tuberosidad isquiática y el trocánter mayor del fémur, obteniendo la imagen ecográfica del nervio ciático (Figura 25). Con la aguja se atravesó la piel y se avanzó hasta alcanzar el nervio.



**Figura 25.** Miembro pelviano de la oveja. Posición del transductor convexo en el plano transversal entre la tuberosidad isquiática y el trocánter mayor del fémur. Imagen de la penetración con la aguja en la piel. Imagen ecográfica del nervio ciático (N).

La frecuencia de estimulación fue de 2 Hz con una duración del estímulo de 0,1 ms. La intensidad del estímulo fue de 0,5 mA, disminuyendo hasta 0,3 mA tras conseguir una respuesta motora sostenida del extremo distal del miembro posterior. Manteniendo la aguja de estimulación a una distancia apropiada del nervio, se realizó la prueba de aspiración negativa de sangre y se inyectó ropivacaína 0,2% hasta que se observó que el nervio ciático quedaba rodeado de AL (Figura 26).



**Figura 26.** Imagen ecográfica del miembro pelviano de la oveja. Flecha blanca: área rodeada por el AL; N: nervio ciático.

Hay que recalcar que la aguja utilizada llevaba el catéter incorporado, esto permitió que mediante un sistema de C-Grip (Figura 26, B), una vez ubicada la punta de la aguja junto al nervio, se pinzara y se pudiera retirar la aguja sin necesidad de avanzar, dejando el catéter en su sitio. De esta forma se aseguró la correcta localización de la punta del catéter. Posteriormente, se procedió a la tunelización subcutánea del catéter utilizando un abbcath de 16G. Después de conectar el filtro de bacterias, se comprobó la permeabilidad del catéter (Figura 27) antes de su fijación en la piel con una sutura de seda 2 (Figura 28).



**Figura 27.** Set de catéter para bloqueo continuo de nervios periféricos. **B:** C-Grip; tunelización del catéter de forma subcutánea utilizando un abbcath 16G. Conexión al filtro de bacterias y comprobación de la permeabilidad del catéter.



**Figura 28.** Aspecto final de la tunelización subcutánea del catéter después de su fijación con sutura en la piel.

Al final de la intervención, se comenzó una perfusión conectando el catéter al infusor con 7ml/h de Ropivacaína 0,2% (Figura 29) y se protegió el catéter con un apósito autoadhesivo fijado a la piel con grapas (Figura 30).



**Figura 29.** Conexión del catéter con el sistema infusor de AL.



**Figura 30.** Protección del catéter con apósito autoadhesivo fijado a la piel.

### 3.6. SEGUIMIENTO POSTOPERATORIO

El seguimiento de la herida quirúrgica, el cambio del vendaje y la protección del catéter, se pautó con una frecuencia de 2 veces a la semana. El tratamiento de las heridas superficiales provocadas por el vendaje se realizó en los días de cambio, aumentando su frecuencia según la necesidad. Como tratamiento se estableció la limpieza y desinfección con jabón iodado, aplicación de productos como povidona yodada, gel de povidona yodada, furacín pomada, spray para heridas superficiales o dermatitis y apósitos de espuma.

El control radiográfico para la comprobación de la correcta estabilidad del sistema de fijación de la placa de osteotomía se realizó de forma semanal.

El dolor postoperatorio se evaluó mediante una ficha elaborada a partir de la bibliografía referente a los parámetros relevantes para el control del dolor en pequeños rumiantes (127,130,160) incluyendo lo que se registró como Test de Apoyo y Test de Bienestar. Los parámetros incluyeron: valoración de la apariencia, la postura y la marcha (161).

Durante las dos semanas del postoperatorio, se revisó la integridad del sistema infusor de AL, y también la necesidad de analgesia de rescate.

El seguimiento de la extremidad intervenida consistió en la evaluación de parámetros relacionados con la marcha (162) mediante el test de apoyo (Tabla 2). Con este test se estableció a los animales una puntuación de 0-4; puntuando 0 aquellos animales que no apoyaban la extremidad y 4 aquellos que deambulaban correctamente sin mostrar ningún tipo de cojera. Además, también se evaluó la respuesta motora y el aspecto del vendaje.

EVALUACIÓN MARCHA (TEST DE APOYO)	COMENTARIO	PUNTUACIÓN
(0) No apoyo		
(1) Severa - Cojera de la extremidad intervenida, falta de apoyo cuando se desplaza		
(2) Moderada - Cojera de la extremidad intervenida, falta de apoyo en algunos pasos		
(3) Leve - Cojera en la extremidad intervenida, apoyo de la punta de la pezuña al andar		
(4) Deambulación correcta, sin signos de cojera		
Total puntuación	0-4	
Aspecto vendaje		

Tabla 2 – Test de Apoyo. Evaluación de la extremidad intervenida.

Parámetros aplicados para evaluación de la extremidad intervenida y puntuación asignada:

- ✓ 0: no apoyo de la extremidad intervenida

Según los signos de cojera:

- ✓ 1: severa - cojera de la extremidad intervenida, falta de apoyo cuando se desplaza.
- ✓ 2: moderada - cojera de la extremidad intervenida, falta de apoyo en algunos pasos.
- ✓ 3: leve - cojera en la extremidad intervenida, apoyo de la punta de la pezuña al andar.
- ✓ 4: correcta deambulación, sin signos de cojera.

## FASE 3 - MATERIAL Y MÉTODOS

Mediante el test de bienestar se evaluó el comportamiento general del animal, su apariencia y su postura. Con este test se estableció a los animales una puntuación de 0-15; recibieron una puntuación máxima aquellos animales que no mostraban ningún tipo de signo de malestar. De manera general, los comportamientos considerados normales sumaban un punto, mientras que los considerados signos de dolor se puntuaban con un 0 (Tabla 3).

EVALUACIÓN PARAMETROS GENERALES (TEST DE BIENESTAR)				
FECHA / RESPONSABLE	SÍ		No	
Animal tranquilo	1		0	
Respiración tranquila	1		0	
Consumo de alimento	1		0	
Consumo de agua	1		0	
Acto de rumiar	1		0	
Letargia acentuada	0		1	
Cabizbaja	0		1	
Oreja caída	0		1	
Rechinar de dientes	0		1	
Retracción de labios	0		1	
Mirada fija	0		1	
Actividad motora repetida	0		1	
Separación del rebaño	0		1	
Vocalización	0		1	
Girar hacia la lesión	0		1	
Total puntuación	0-15			

Tabla 3 – Test de Bienestar. Evaluación del estado general del animal. Puntuación de 1 se considerada parámetro normal y 0 una respuesta negativa.

Este control se realizó dos veces al día durante los 3 primeros días tras la intervención quirúrgica, y posteriormente, una vez al día hasta la finalización del estudio. Los datos fueron recogidos en las dos semanas tras la intervención, período que se consideró para el control del bloqueo continuo.

### 3.7. VARIABLES

Se establecieron un conjunto de variables específicas que se registraron y se analizaron para este estudio como variables de tiempos, de funcionalidad, peso corporal y parámetros generales de su comportamiento:

- Test de Apoyo (Figura 2).
- Test de Bienestar (Figura 3).
- Duración de la aplicación de la técnica del bloqueo continuo guiado por USG del nervio ciático (Anexo I).
- Duración de la intervención quirúrgica del defecto óseo segmentario diafisario (Anexo II).
- Tiempo de recuperación de respiración espontánea una vez finalizada la anestesia quirúrgica hasta el momento de la extubación endotraqueal (Anexo II).
- Tiempo de recuperación del estado de estación después de finalizada la intervención quirúrgica (Anexo II).
- Peso del animal (Anexo III).

### 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados generados en este estudio se incluyeron en una hoja de cálculo Excel. El análisis estadístico se realizó en las Fases 2 y 3 con el programa Graph Pad Prism\_v6.

Para las variables cuantitativas, las diferencias significativas inter-grupo de los datos paramétricos se analizaron mediante test t de Student y test ANOVA. Se usó el test de Pearson para el análisis de correlaciones. Los datos no paramétricos se analizaron mediante el test Mann-Whitney y el test Spearman en el caso de las correlaciones. Las variables cualitativas (ej.: cojeras) se analizaron mediante tablas de contingencia.

En todos los análisis se consideró un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo con un intervalo de confianza del 95%.



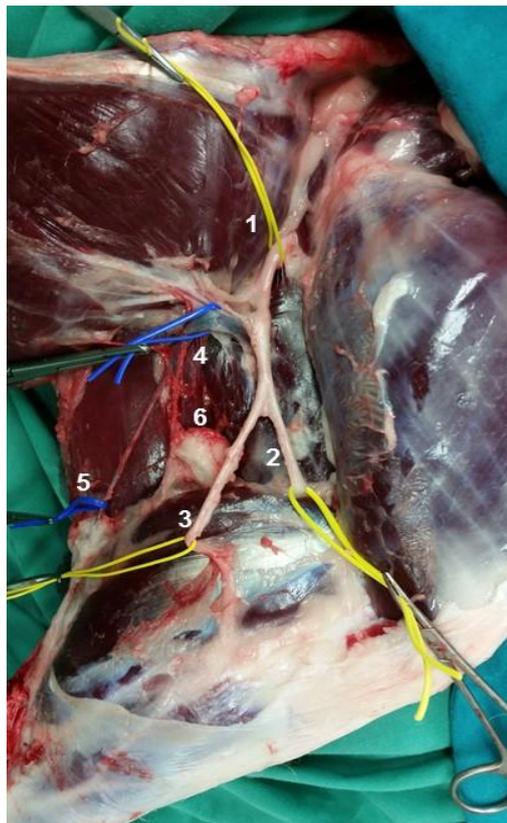
## **RESULTADOS**



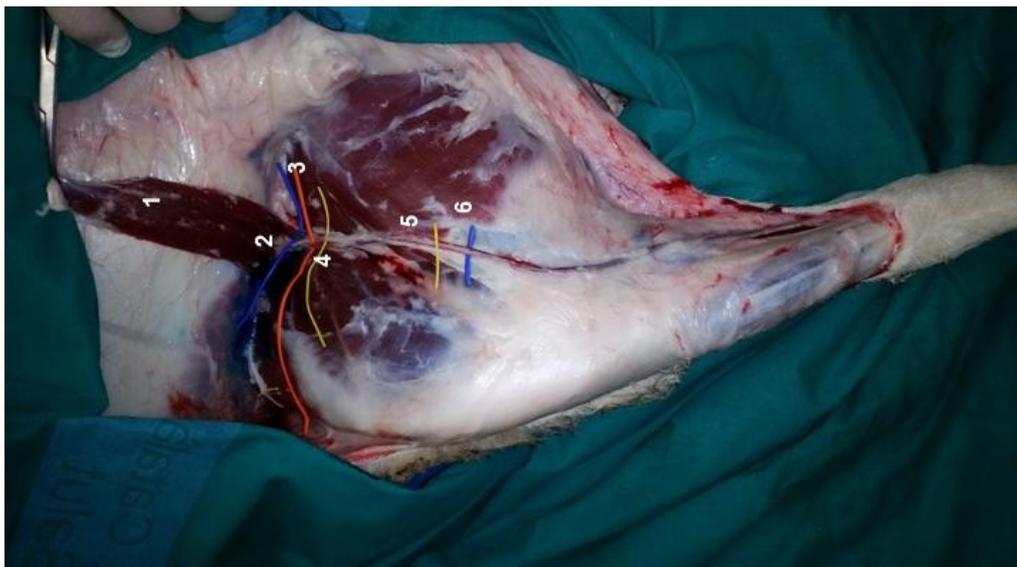
## ESTUDIO ANATÓMICO DE LA INERVACIÓN PERIFÉRICA DEL MIEMBRO PELVIANO OVINO, CON ESPECIAL ATENCIÓN A LOS NERVIOS CIÁTICO Y FEMORAL

### 1. Estudio anatómico por disección y localización de las estructuras de interés

Se examinaron 4 miembros pelvianos *post mortem* para el estudio anatómico logrando comprobar en todos ellos las referencias óseas, las estructuras vasculares y la localización de los nervios ciático y femoral (Figuras 31 y 32).



**Figura 31.** Vista lateral de un miembro pelviano de oveja en el que se diseccionó el plexo lumbrosacro y el nervio ciático, tras la desinserción del músculo glúteo bíceps. Los lazos amarillos marcan los nervios ciático (1), tibial (2), peroneo común (3). Los lazos azules marcan las venas femoral caudal (4), Circunfleja femoral media (5). También se observa el ganglio poplíteo (6) (156).



**Figura 32.** Miembro pelviano de una oveja, vista medial. 1: porción craneal y caudal del músculo sartorio; 2: vena femoral; 3: arteria femoral; 4: nervio femoral; 5: nervio safeno; 6: vena safena (156).

## 2. Comprobación de la técnica guiada por USG

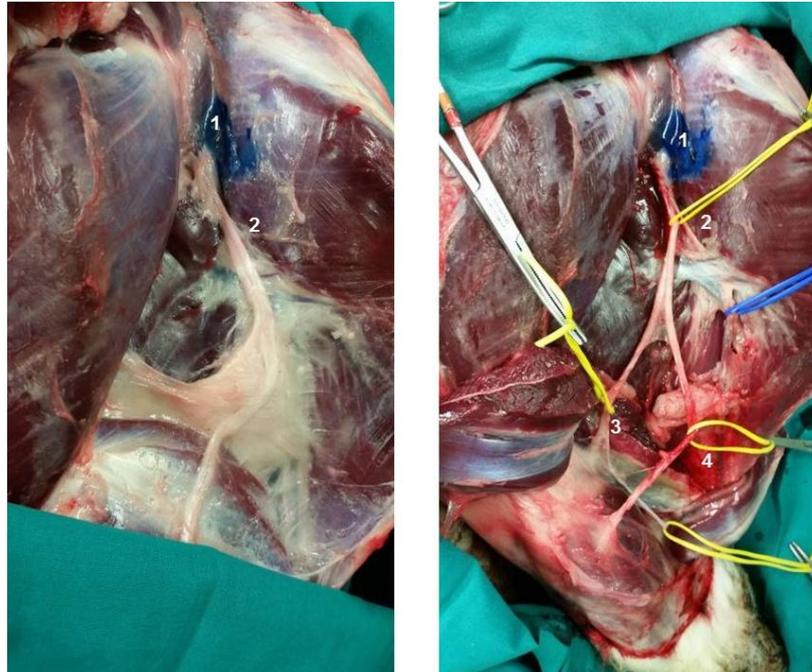
En los 4 animales utilizados se pudieron localizar por USG todas las estructuras musculares, óseas, nerviosas y vasculares (Figura 33).

Para el bloqueo periférico ciático, las referencias anatómicas óseas fueron la tuberosidad isquiática y trocánter mayor del fémur. El nervio ciático fue identificado como una estructura hiperecogénica bien delimitada entre las dos estructuras óseas (Figura 33, A). El nervio femoral no fue tan fácil de identificar como el nervio ciático pero se pudo identificar para realizar el bloqueo las estructuras como el músculo sartorio con su forma triangular, así como el nervio y los vasos femorales (Figura 33, B).

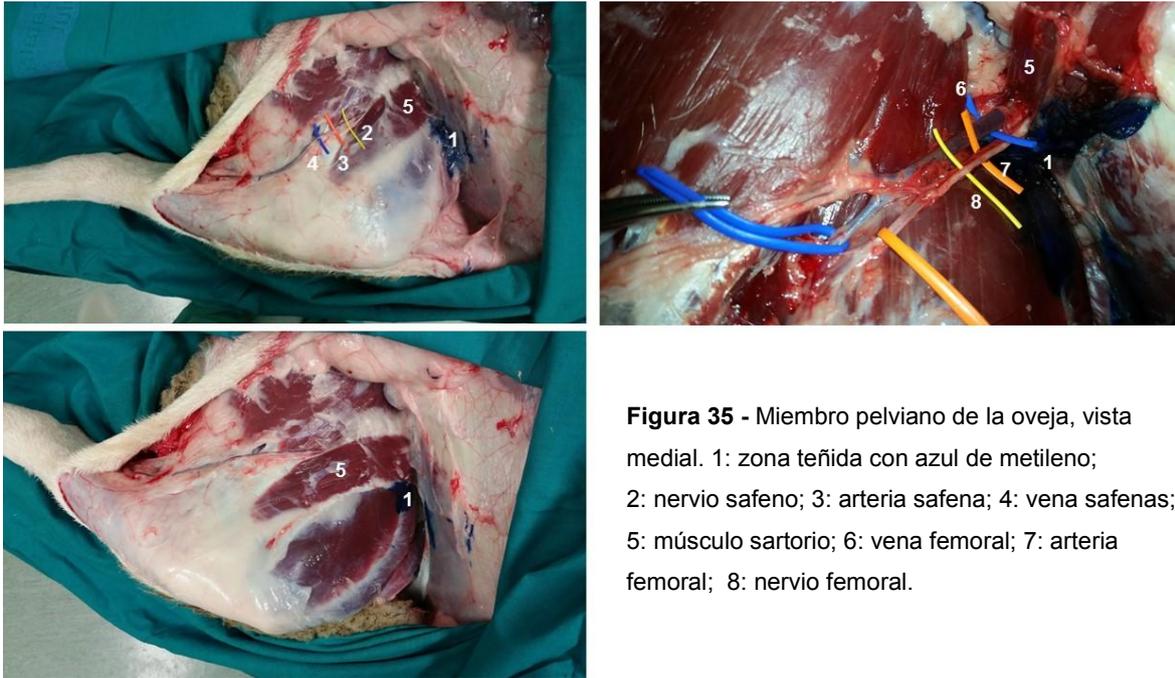


**Figura 33.** Imagen ecográfica del miembro pelviano de la oveja. **A.** Nervio ciático (N), tuberosidad isquiática (flecha). **B.** Nervio femoral (N), arteria femoral (círculo rojo).

Los miembros fueron disecados y se pudo comprobar que las zonas que se pretendía bloquear estaban teñidas con la solución de azul de metileno. De esta forma, se comprobó que se podía alcanzar tanto el nervio ciático (Figura 34), como el femoral (Figura 35).



**Figura 34.** Miembro pelviano de la oveja, vista lateral. 1: zona teñida con azul de metileno; 2: nervio ciático; 3: nervio tibial; 4: nervio peroneo común.



**Figura 35** - Miembro pelviano de la oveja, vista medial. 1: zona teñida con azul de metileno; 2: nervio safeno; 3: arteria safena; 4: vena safenas; 5: músculo sartorio; 6: vena femoral; 7: arteria femoral; 8: nervio femoral.

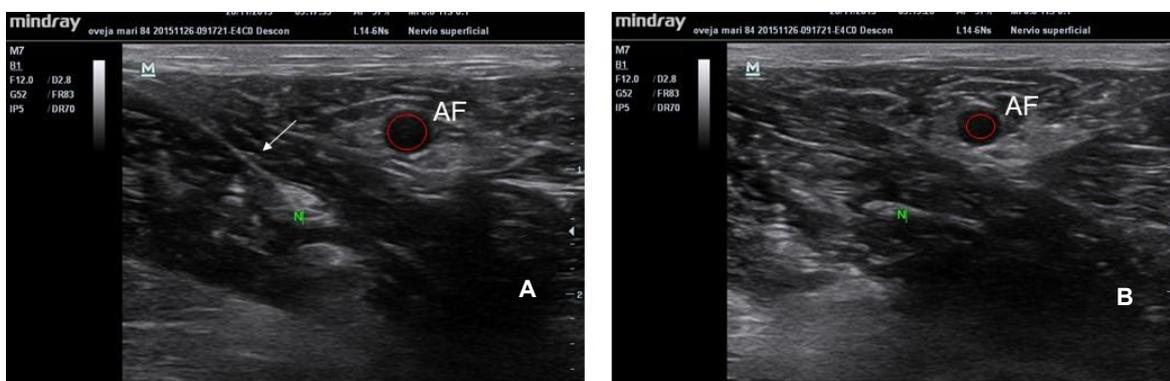
## PRUEBA PILOTO DE APLICACIÓN Y EFICACIA DE LA TÉCNICA DEL BLOQUEO PERIFÉRICO DE LOS NERVIOS CIÁTICO Y FEMORAL CON NEUROESTIMULACIÓN GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA

### 1. Desarrollo de la técnica del bloqueo guiada por USG y con neuroestimulación

Se desarrolló la técnica del bloqueo periférico de los nervios ciático y femoral con neuroestimulación guiada por USG. Los bloqueos propuestos se realizaron con éxito a todos los animales de los dos grupos (I y II). Se pudo visualizar la imagen hiperecogénica de los nervios ciático (Figura 36) y femoral (Figura 37), el trayecto de la aguja y estructuras adyacentes.



**Figura 36** – Imagen ecográfica del miembro pelviano de la oveja. 1: tuberosidad isquiática; 2: trocánter mayor fémur; N: nervio ciático; 3: nervio ciático rodeado de anestésico local.



**Figura 37** – Imagen ecográfica: A. (N) Nervio femoral, (AF) Arteria femoral, (Flecha) imagen hiperecogénica del trayecto de la aguja. B. (N) nervio ciático rodeado de o anestésico local.

## 2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA SENSITIVA Y MOTORA

Se incluyeron 8 ovejas con un rango de peso de  $48,94 \pm 7,74$  kg (media  $\pm$  d.e.).

**Grupo I:** cuatro ovejas reutilizadas de un protocolo experimental de cirugía fetal que no implicaba manipulación de los miembros posteriores, con un peso medio de  $42,88 \pm 5,02$  kg (Tabla 4).

**Grupo II:** cuatro ovejas que formaban parte del grupo piloto para el desarrollo del modelo de defecto óseo segmentario, con un peso medio de  $55,00 \pm 4,06$  kg (Tabla 4).

ID Animal	Grupo	Peso (kg)	Vol. AL N. ciático (ml)	Vol. AL N. femoral (ml)	Vol. AL total (ml)	Dosis mg/kg	Duración sensitivo (h)
1	I	44,00	15,00	7,00	22,00	1,00	7
2	I	45,50	10,00	18,00	28,00	1,23	7
3	I	35,50	15,00	13,50	28,50	2,41	9
4	I	46,50	10,00	9,00	19,00	0,82	4,5
5	II	51,00	12,00	8,00	20,00	0,78	6,5
6	II	52,50	13,50	8,00	21,50	0,82	-
7	II	56,50	14,00	10,00	24,00	0,85	-
8	II	60,00	15,00	9,00	24,00	0,80	7

**Tabla 4.** Ovejas incluidas en los grupos I y II. ID: identificación animal; Vol. AL. N. ciático: volumen de anestésico local inyectado en el nervio ciático; Vol. AL. N. femoral: volumen de anestésico local inyectado en el nervio femoral; Vol. AL total: volumen de anestésico local total.

Al ser una técnica guiada por USG, el volumen inyectado de AL (ropivacaína 0,2%) se determinó teniendo en cuenta cómo se visualizaba su distribución alrededor del nervio.

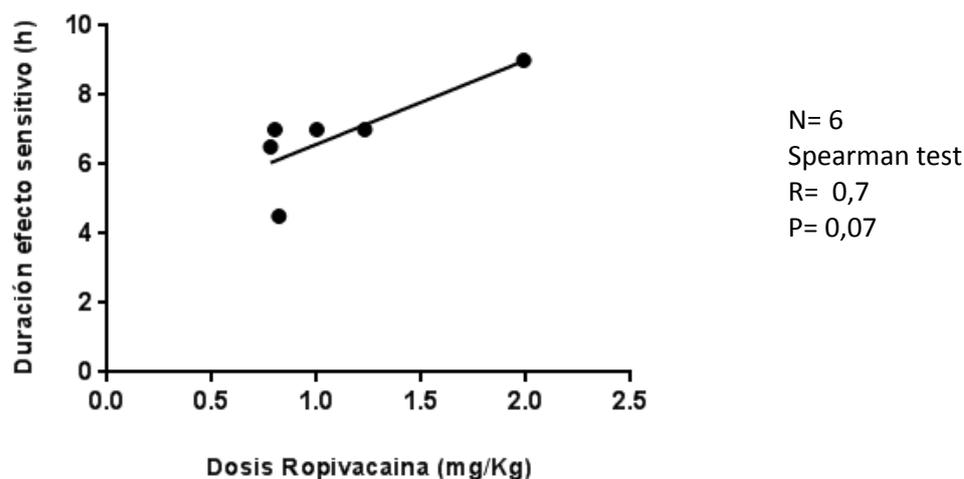
Se inyectó un volumen medio de  $13,06 \pm 2,15$  ml en el nervio ciático y  $10,31 \pm 3,67$  ml en el nervio femoral. Sumando el total que se aplicó en ambos nervios, la dosis media de AL fue de  $1,04 \pm 0,41$  mg/kg.

La duración media del bloqueo sensitivo fue de  $5,14 \pm 1,44$  h. El efecto del bloqueo motor se detallada a continuación.

## 2.1. RESPUESTA SENSITIVA

Dos animales (ID: 6 y 7; Tabla 4) fueron eutanasiados en el postoperatorio inmediato, ya que tras despertar de la anestesia y dar unos pasos con carga, se ocasionó una fractura en la extremidad intervenida. Consecuentemente, no fue posible evaluar la respuesta sensitiva.

De forma general, en el resto de animales se observó una clara asociación entre el volumen de AL recibido y la duración del efecto sensitivo, próxima a la significación estadística (Figura 38).



**Figura 38.** Correlación entre la duración del efecto sensitivo y la dosis de ropivacaina inyectada.

## 2.2. RESPUESTA MOTORA

Dos animales (ID: 2 y 3; Tabla 4) presentaron déficit propioceptivo. Un animal (ID: 4) permaneció sentado haciendo imposible la evaluación de su respuesta motora.

Se observó una tendencia a que los animales que recibían un mayor volumen de AL fueran los que mostraban déficit propioceptivo (Figura 39).

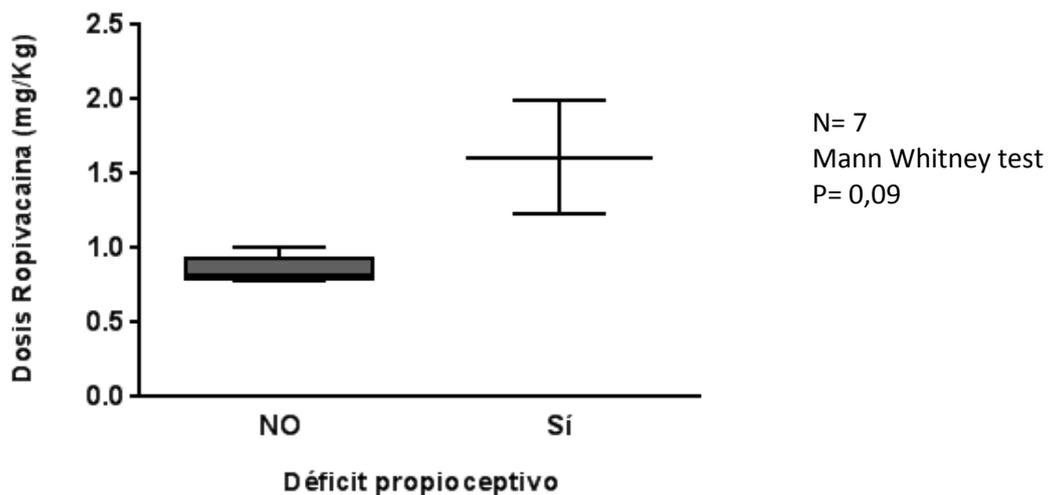


Figura 39. Presentación del déficit propioceptivo en función de la dosis de ropivacaína inyectada.

## **ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL REFINAMIENTO DE LA ANALGESIA INTRA Y POSTOPERATORIA, CON APLICACIÓN DE UN BLOQUEO CONTINUO DE NERVIOS PERIFÉRICOS CIÁTICOS GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA Y CON NEUROESTIMULACIÓN**

### **1. Evaluación general de los animales e incidencias**

Para la realización de esta tercera fase se utilizaron 20 ovejas sometidas a la cirugía de defecto óseo segmentario en tibia. La duración del seguimiento postoperatorio fue de 2 semanas. Como recordatorio, la distribución por grupos fue la siguiente:

- Grupo A (n = 9): sin realización del bloqueo periférico del nervio ciático y sin aplicación del bloqueo continuo.
- Grupo B (n = 11): realización la técnica del bloqueo periférico del nervio ciático y aplicación del bloqueo continuo.

Las tablas 5 y 6 recogen la duración de los periodos de aclimatación y los pesos registrados. A continuación se describen los datos más relevantes de los animales incluidos en los análisis de esta tercera fase, así como los motivos por los que algunos animales tuvieron que ser excluidos y las incidencias más destacadas.

La mayor parte de los animales se recuperaron sin incidencias de la anestesia, exceptuando uno del Grupo A (ID: 65) y tres del Grupo B (ID: 71, 72 y 75), que fueron encontrados muertos al día siguiente de la intervención quirúrgica y no pudieron ser incluidos en el estudio del postoperatorio con bloqueo continuo.

Los ovejas (ID: 77 y 78, Grupo B) sufrieron un paro cardiorrespiratorio (PRC) antes del inicio de la intervención quirúrgica, pero se realizó la maniobra de reanimación cardiopulmonar (RCP) con éxito en ambos casos. El animal 80 no se dejó ventilar de forma mecánica y se realizó una ventilación espontánea.

Se observaron complicaciones postoperatorias provocadas por el sistema de inmovilización como dermatitis, úlceras, bursitis calcánea o abrasiones provocadas por el vendaje en ambos grupos.

Finalmente se incluyeron un total de 16 animales válidos, con un rango de peso de  $45,72 \pm 6,24$  kg.

## FASE 3- RESULTADOS

ID Animal	Tipos tratamiento	Días de aclimatación	Peso inicial	Peso habituación	Días hab.	Peso Día cirugía	Peso Final
Grupo A	DOSD	(d)	(kg)	vendaje (kg)	vendaje (d)	CSD (kg)	2 sem (kg)
59	Control	15	40,50	43,00	2	42,50	41,50
60	Control	4	40,50	40,50	2	40,00	37,00
62	Control	26	42,00	44,50	2	43,50	43,50
63	Alogénico	11	35,50	36,00	2	36,00	34,50
64	Alogénico	5	37,50	37,50	2	37,00	36,00
65	Alogénico	21	35,00	37,00	2	37,00	exitus
66	Alogénico	8	43,00	42,50	2	42,50	42,00
68	Alogénico	4	44,50	44,50	2	44,50	-
69	Control	35	40,50	47,50	2	46,00	44,50

**Tabla 5** – Grupo de animales sin la realización de los bloqueos intraoperatorio y continuo. Tipos de tratamiento del modelo de CSD (ver apartado Fase 3 – 2.2.). Registro de la duración de los periodos de aclimatación, hab: habituación al sistema de inmovilización y pesos.

ID Animal	Tipos tratamiento	Días de aclimatación	Peso inicial	Peso habituación	Días hab.	Peso Día cirugía	Peso Final
Grupo B	DOSD	(d)	(kg)	vendaje (kg)	vendaje (d)	CSD (kg)	2 sem (kg)
70	Control	15	54,50	53,00	2	53,00	50,50
71	Alogénico	21	54,50	54,00	2	55,00	exitus
72	Alogénico	21	55,50	56,00	2	56,50	exitus
73	Alogénico	10	54,50	54,00	2	54,00	53,00
74	Alogénico	11	51,00	51,50	2	51,50	49,50
75	Control	23	55,00	56,00	7	56,50	exitus
76	Alogénico	51	51,00	57,50	7	56,50	55,50
77	Autólogo	30	54,00	57,50	7	56,00	53,50
78	Autólogo	37	51,00	51,00	7	48,50	48,00
79	Autólogo	44	46,00	50,00	7	49,00	45,50
80	Autólogo	45	45,50	49,00	7	47,00	46,50

**Tabla 6** – Grupo de animales con la realización de los bloqueos intraoperatorio y continuo. Tipos de tratamiento del modelo de CSD (ver apartado Fase 3 – 2.2.). Registro de la duración de los periodos de aclimatación, hab: habituación al sistema de inmovilización y pesos.

## 2. RESULTADOS TÉCNICOS DE LA APLICACIÓN DEL BLOQUEO NERVIOSO

El tiempo medio necesario para la aplicación del bloqueo continuo guiado por USG del nervio ciático fue de  $4,22 \pm 0,97$  min.

Como se ha mencionado, 3 animales murieron durante las 24 horas siguientes a la intervención quirúrgica, por lo que no se pudo incluir en el estudio postoperatorio. De los 8 restantes, en la mitad se pudo mantener la infusión continua hasta el día 14 del postoperatorio, y en los otros 4 el catéter se descolocó entre los días 5 y 13 (Tabla 7).

El volumen medio de ropivacaína inyectado en el nervio ciático fue de  $9,82 \pm 1,40$  ml. La velocidad inicial de infusión del AL fue de 7ml/h en todos los animales. Dos de ellos (ID: 76 y 79) presentaron déficit propioceptivo y se disminuyó la velocidad de infusión a 5ml/h hasta recuperar la capacidad de recolocar la extremidad en posición normal al suelo.

ID Animal (Grupo B)	Vol. AL intraoperatorio (ml)	Tiempo técnica bloqueo continuo (min)	Bloqueo nervio ciático continuo (días)
70	8	5	14
71	11	5	0
72	9	5	0
73	9	-	14
74	9	3	14
75	9	5	0
76	12	4	14
77	12	-	13
78	11	3	11
79	9	5	5
80	9	3	9

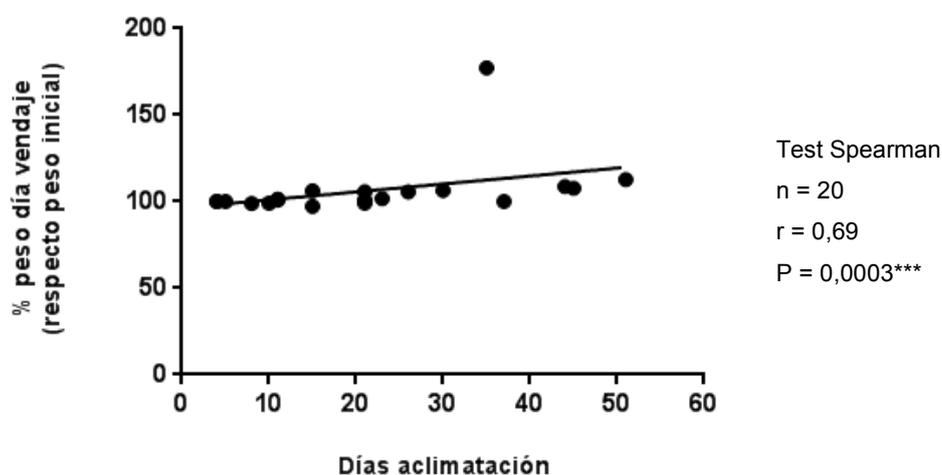
**Tabla 7** – Grupo de animales con la realización de los bloqueos intraoperatorio y continuo. Registro del tiempo necesario para realización de la técnica del bloqueo y duración del bloqueo continuo. Vol. AL: volumen anestésico local.

### 3. VARIACIÓN DE PESO DE LOS ANIMALES

#### 3.1. Variación de peso desde la entrada de los animales hasta el inicio de la habituación al sistema de inmovilización

Se consideró periodo de aclimatación desde la llegada del animal hasta la primera manipulación para habituarlo al sistema de inmovilización (vendaje). Estos periodos variaron entre animales (como se mostraba en las Tablas 5 y 6) y esto se debió a la disponibilidad de distribución del proveedor o a la capacidad de ocupación de la zona de estabulación experimental.

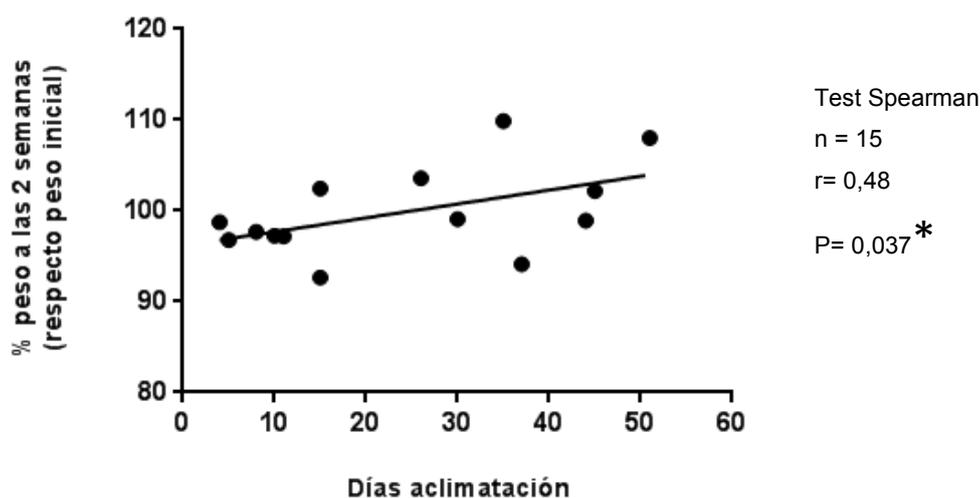
No obstante, independientemente de la duración de este periodo, todos los animales mantuvieron o incrementaron su peso; en ninguno de ellos se observó disminución. Asimismo, se observó un incremento de peso asociado significativamente al periodo de la aclimatación ( $p = 0,0003^{***}$ ; Figura 40). Para este análisis pudieron incluirse los 20 animales, 9 del Grupo A, y 11 del Grupo B.



**Figura 40** - Correlación entre la variación de peso (habituação vendaje respecto peso inicial) y los días de aclimatación.

### 3.2. Variación de peso de entrada de los animales en las dos semanas del postoperatorio

Se valoró un total de 15 animales (7 del Grupo A, 8 del Grupo B). En los que tuvieron un periodo de aclimatación (4 – 51 días) más largo, el aumento de peso fue también superior a las 2 semanas, con una asociación estadísticamente significativa ( $p = 0,037^*$ ; Figura 41).



**Figura 41** - Correlación entre la variación de peso (dos semanas del postoperatorio respecto peso inicial) y los días de aclimatación.

### 3.3. Variación de peso inicio habituación al sistema de inmovilización hasta la intervención quirúrgica

El tiempo de habituación al sistema de inmovilización varió entre los distintos animales, ya que inicialmente se fijó en 2 días y después se consideró necesario prolongarlo a 7. Se analizó la variación de peso desde el inicio de la habituación al sistema de inmovilización hasta el día de la intervención quirúrgica, y se observó que los animales con menos tiempo de habituación (2 días) tendieron a perder menos peso que los animales que estuvieron más tiempo (7 días), y esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p = 0,018^*$ ; Figura 42). En este análisis se incluyeron los 20 animales del estudio.



Figura 42 - Variación del peso (día cirugía respecto al día de colocación del vendaje) en función de los días de habituación al vendaje.

### 3.4. Variación de peso desde la habituación al sistema de inmovilización hasta las dos semanas del postoperatorio

Se analizó la variación de peso en el periodo desde la habituación al sistema de inmovilización hasta las dos semanas de postoperatorio, en un total de 15 animales (7 del Grupo A, y 8 del Grupo B). Se neutralizó junto con el análisis anterior la tendencia ( $p = 0,06$ ; Figura 43) que los animales con menos tiempo de habituación tendieron a perder menos peso que los animales a los que se les aplicó una duración mayor.

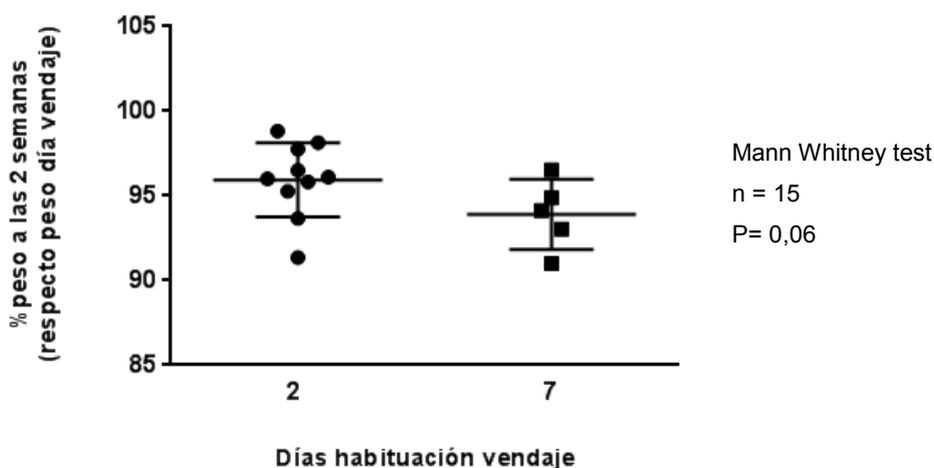


Figura 43 - Variación del peso (dos semanas respecto al día de colocación del vendaje) en función de los días de habituación al vendaje.

#### 4. COMPROBACIÓN DE LA AUSENCIA DE INTERFERENCIA DE LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES DEL DEFECTO ÓSEO SEGMENTARIO DIAFISARIO

Para descartar interferencias con los tratamientos experimentales aplicados para el defecto óseo, se realizó un análisis estadístico comparando estos grupos de tratamiento respecto a las variables más directamente relacionadas con los efectos beneficiosos del bloqueo nervioso durante el postoperatorio (Test de apoyo, Test de bienestar). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre esos grupos para ninguna de ambas variables (Figura 44 y 45). Para este análisis pudieron incluirse 10 animales, 2 con tratamiento control, 5 con tratamiento alogénico, y 3 con tratamiento autólogo.

##### 4.1. Test de Apoyo

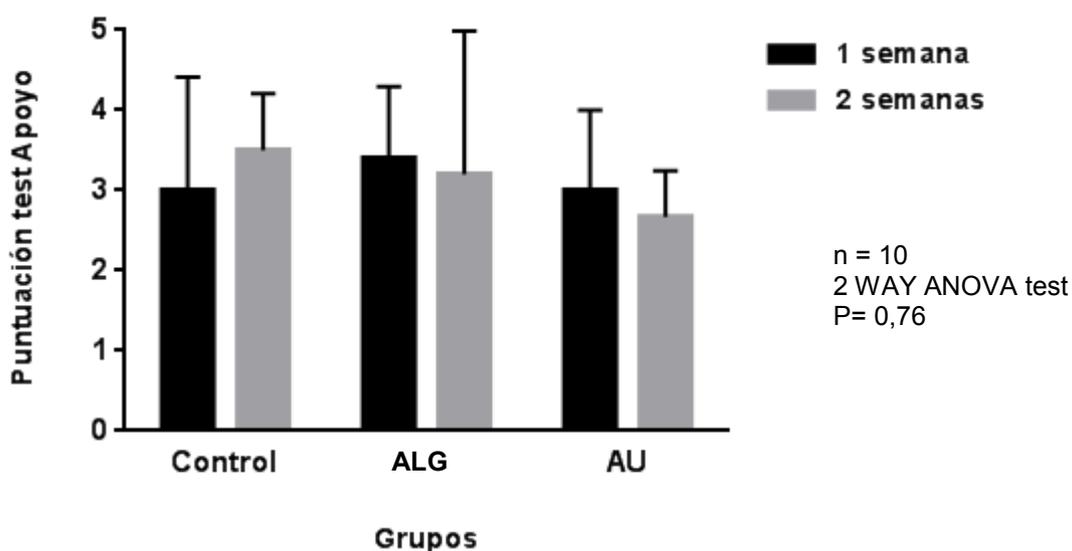
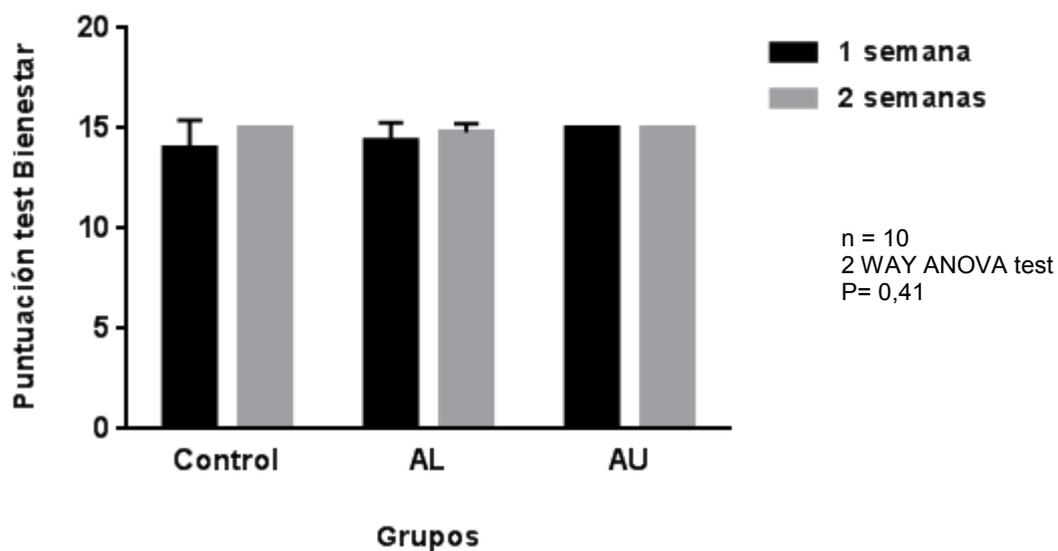


Figura 44 – Test de apoyo comparando los distintos tratamientos del modelo experimental de DOSD.

#### 4.2. Test de Bienestar



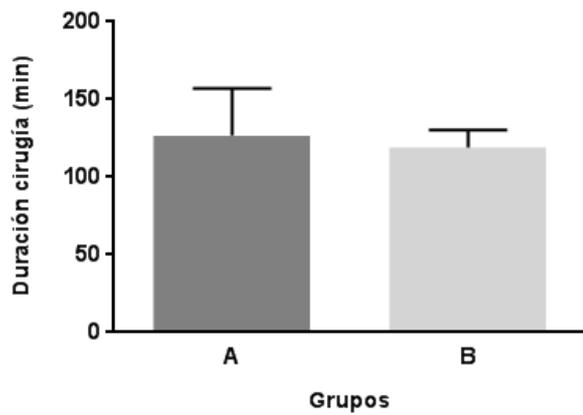
**Figura 45** – Test de Bienestar comparando los distintos tratamientos del modelo experimental de DOSD.

### 5. ANÁLISIS DE TIEMPOS INTRA Y POSTOPERATORIO INMEDIATO

#### 5.1. Tiempo de duración de la intervención quirúrgica del DOSD

El tiempo de duración de la intervención quirúrgica fue de  $123 \pm 22,36$  min. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B ( $p = 0,51$ ; Figura 46). En este análisis se incluyeron los 20 animales del estudio.

FASE 3- RESULTADOS



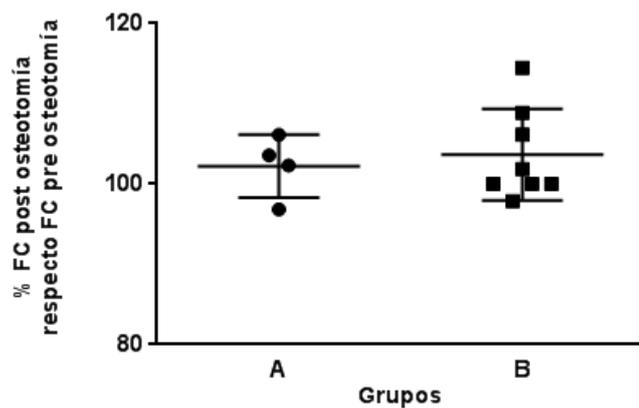
Grupo	Media	d.e.
A	126,9	30,23
B	119,1	11,12

n = 16  
 T test  
 P = 0,51

Figura 46 - Comparación de la duración de la intervención quirúrgica entre los grupos A y B.

**5.2. Análisis de parámetros fisiológicos durante la intervención quirúrgica.**

Durante la intervención quirúrgica, se registró la frecuencia cardiaca en cada fase de la anestesia. Se analizó entre las fases pre y post-osteotomía y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B ( $p = 0,47$ ; Figura 47). En este análisis se incluyeron 12 animales (4 del Grupo A y 8 del Grupo B).



n = 12  
 Mann Whitney test  
 P = 0,47

Figura 47 – Comparación de la frecuencia cardiaca pre y post osteotomía entre los Grupos A y B

Se registró también la presión arterial media (PAM) y también se analizó entre las fases pre y post-osteotomía. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B ( $p = 0,23$ ; Figura 48). En este análisis se incluyeron 12 animales (4 del Grupo A y 8 del Grupo B).

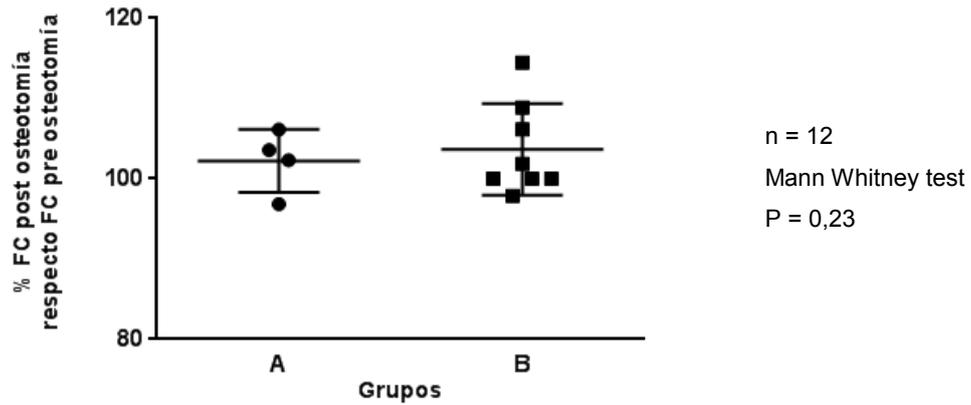


Figura 48 – Comparación de la presión arterial media pre y post osteotomía entre los Grupos A y B

### 5.3. Análisis de la dosis de rescate de propofol requerida durante la intervención quirúrgica.

Se comparó un total de 12 animales entre los grupos (4 del Grupo A, 8 del Grupo B) la dosis necesaria de rescate de propofol durante la intervención quirúrgica. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B ( $p = 0,27$ ; Figura 49).

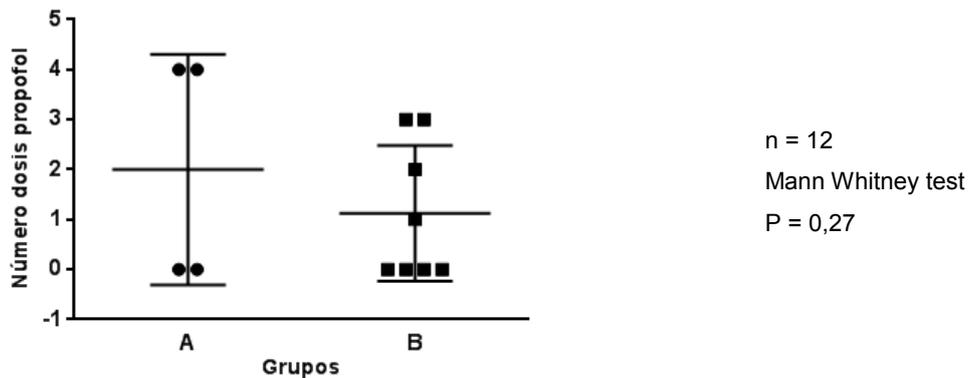
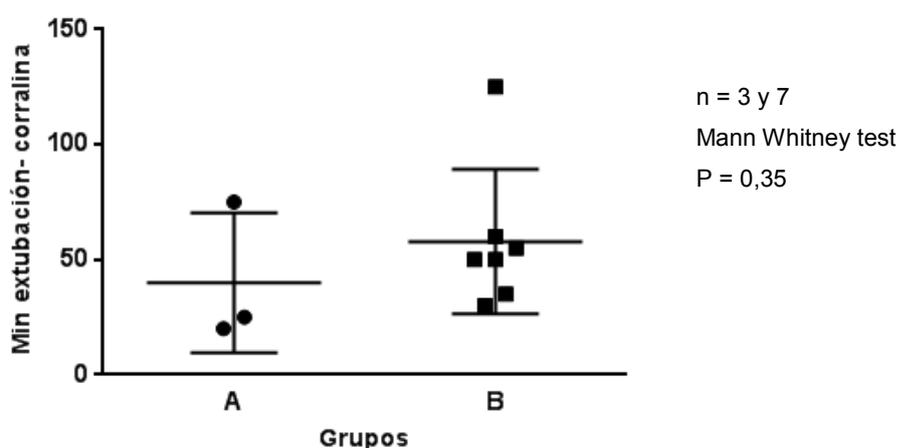


Figura 49 – Comparación del número de dosis de rescate de propofol entre los Grupos A y B durante la intervención quirúrgica.

#### 5.4. Tiempo de la extubación endotraqueal hasta el regreso al área de estabulación

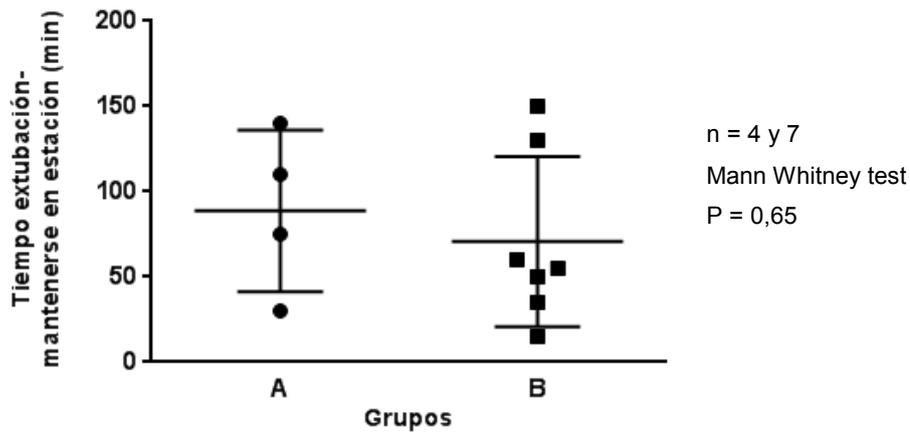
Se comparó un total de 10 animales entre los grupos (3 del Grupo A, 7 del Grupo B) el tiempo que los animales estuvieron en el postoperatorio inmediato, desde la extubación endotraqueal (tras la fase de ventilación mecánica) después de finalizar y seguidamente la extubación hasta su regreso al área de estabulación. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B ( $p = 0,35$ ; Figura 50).



**Figura 50** – Comparación del tiempo en el postoperatorio inmediato, desde la extubación endotraqueal hasta el regreso de los animales al área de estabulación.

#### 5.5. Tiempo en permanecer en estación después de finalizada la intervención quirúrgica

Se comparó entre los Grupos A y B el tiempo que los animales necesitaron después de finalizar la fase anestésica hasta ponerse de pie (estado de estación). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B ( $p = 0,65$ ; Figura 51). Se comparó un total de 11 animales (4 del Grupo A, 7 del Grupo B).

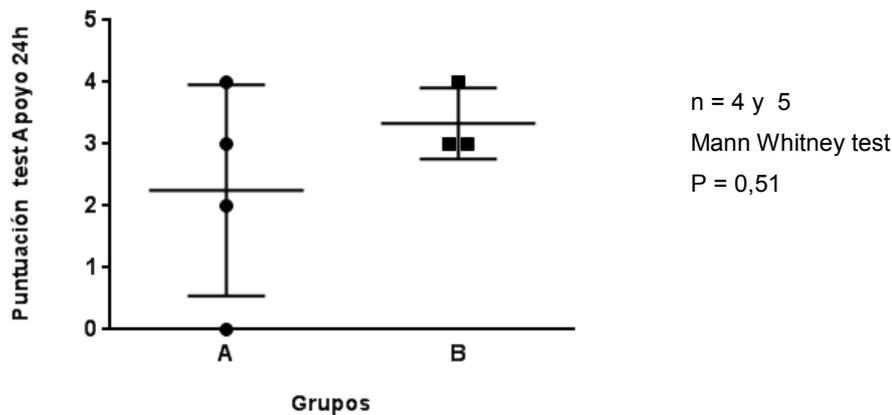


**Figura 51** - Comparación del tiempo que los animales necesitaron en recuperar el estado de estación después de la extubación endotraqueal entre los Grupos A y B

## 6. Análisis de parámetros de funcionalidad

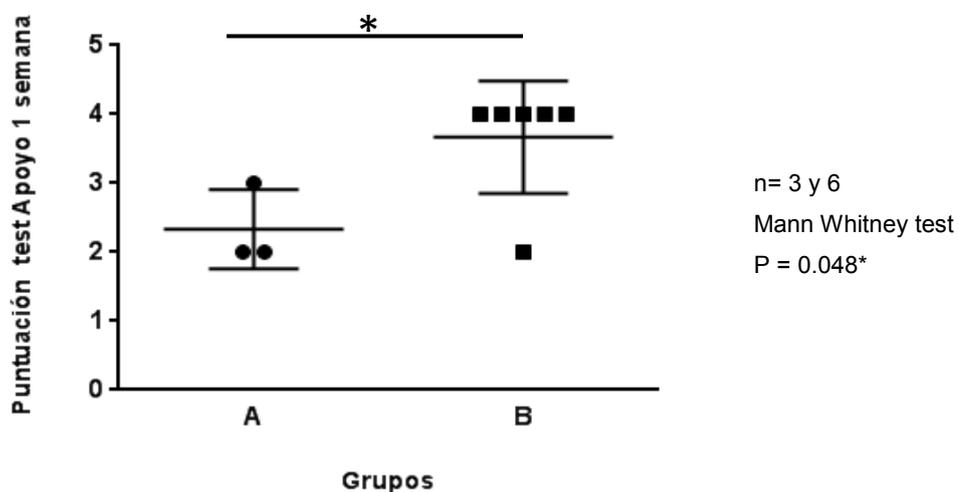
### 6.1. Análisis del apoyo de la extremidad durante el postoperatorio

Durante las primeras 24 horas del postoperatorio inmediato, se evaluó el apoyo de la extremidad intervenida. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los grupos con relación al apoyo ( $p = 0,51$ ; Figura 52). Se valoró un total de 9 animales (4 del Grupo A, 5 del Grupo B).



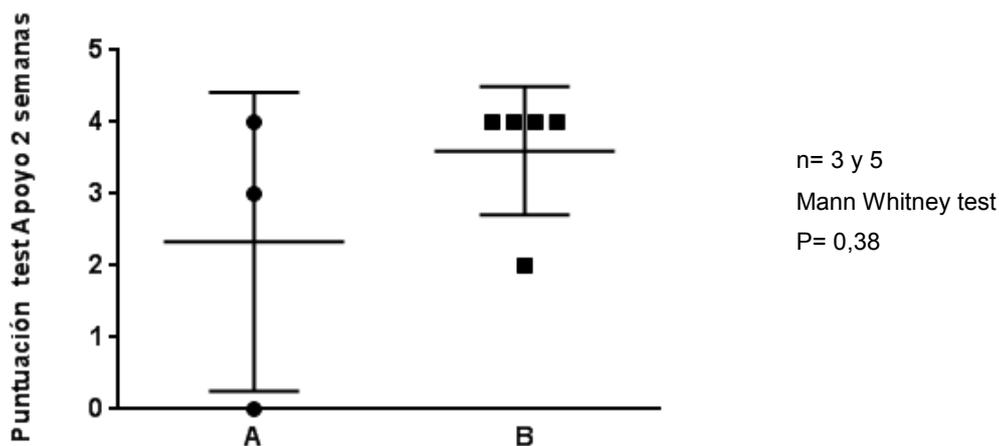
**Figura 52** – Puntuación del apoyo de la extremidad intervenida durante las 24 horas del postoperatorio de los Grupos A y B.

Durante la primera semana después de la intervención quirúrgica, se evaluó el apoyo de la extremidad intervenida. Se observó que un mayor número de animales del Grupo B presentaron un correcto apoyo y menos signos de cojera que los animales del Grupo A, y esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p = 0,048^*$ ; Figura 53). Se valoró un total de 8 animales (3 del Grupo A, 5 del Grupo B).



**Figura 53** - Puntuación del apoyo de la extremidad intervenida durante la primera semana del postoperatorio de los Grupos A y B.

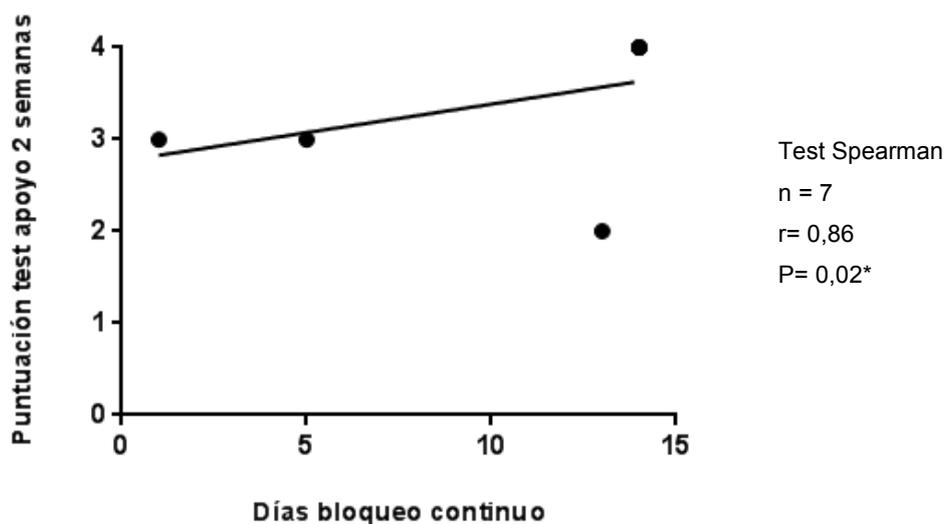
En la segunda semana, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los grupos con relación al apoyo, ( $p = 0,38$ ; Figura 54). Se valoró un total de 8 animales (3 del Grupo A, 5 del Grupo B).



**Figura 54** - Puntuación del apoyo de la extremidad intervenida durante las dos semanas del postoperatorio de los Grupos A y B.

### 6.2. Correlación entre la duración del bloqueo continuo y el apoyo

En el Grupo B se analizó si el apoyo de la extremidad intervenida durante el postoperatorio se relacionaba con la duración del bloqueo continuo, excluyendo un animal (ID: 80) porque se hizo una fijación en flexión (n = 7). Se observó que a mayor duración del bloqueo continuo, mejor era el apoyo de la extremidad, y esta correlación fue estadísticamente significativa (p = 0,02\*; Figura 55).

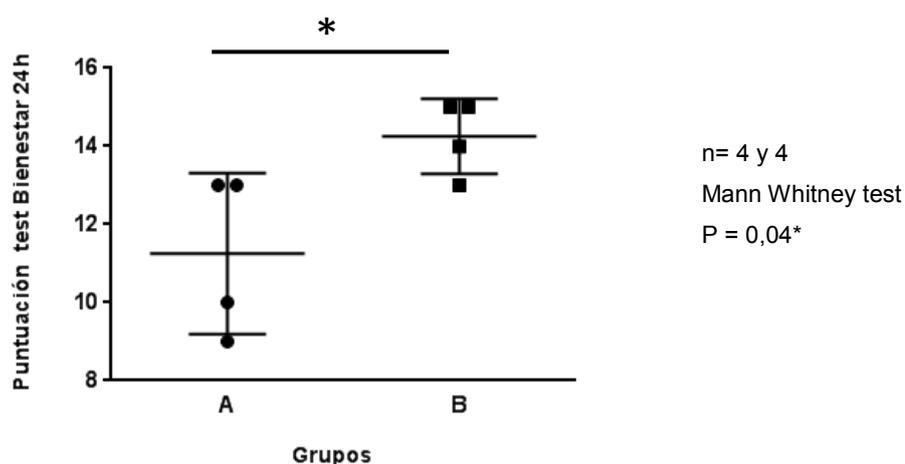


**Figura 55** - Correlación entre la puntuación del apoyo de la extremidad a las dos semanas del postoperatorio y los días de bloqueo continuo.

## 7. ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE BIENESTAR

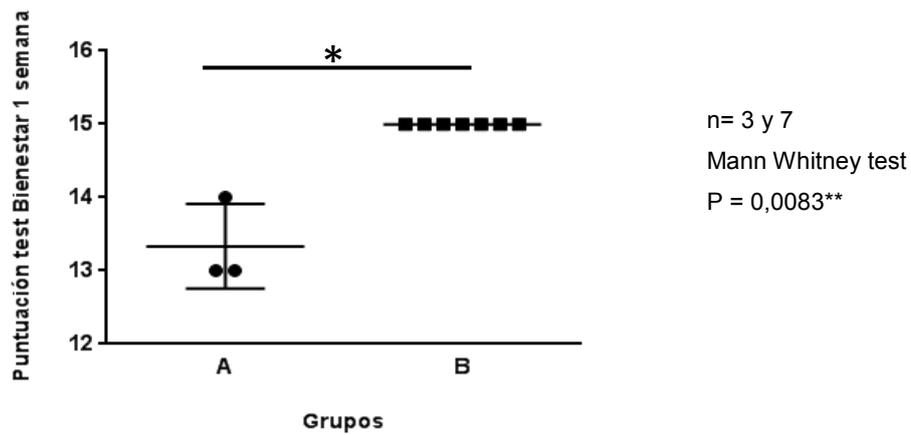
### 7.1. Análisis del bienestar animal durante el postoperatorio

Durante las primeras 24 horas después de la intervención quirúrgica, se aplicó el test de bienestar (Anexo II). Se evaluó los parámetros de comportamiento general del animal, y se observaron que los animales del grupo B tuvieron una mayor puntuación que los animales del grupo A, esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p = 0,04^*$ ; Figura 56). En este análisis se incluyeron 8 animales (4 del Grupo A, 4 del Grupo B).



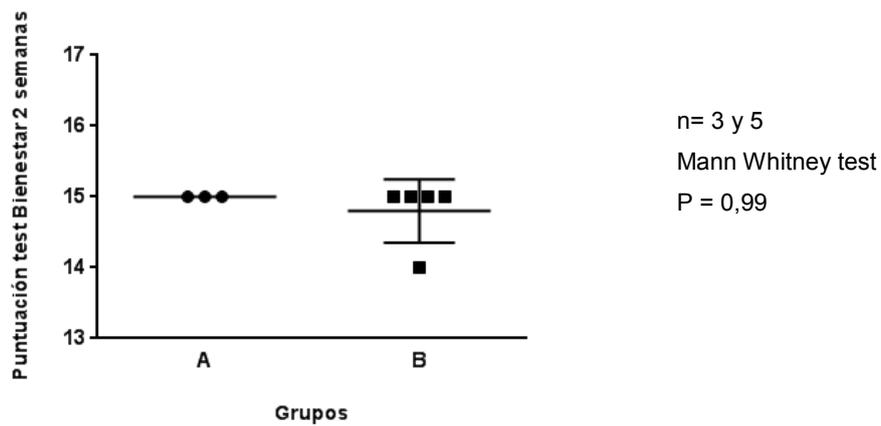
**Figura 56** - Comparación de la puntuación del test de bienestar animal a las 24 horas del postoperatorio entre los Grupos A y B.

Durante la primera semana después de la intervención quirúrgica, seguimos observando que un mayor número de animales del Grupo B tuvieron una mayor puntuación que los animales del Grupo A, manteniéndose la diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,0083^{**}$ ; Figura 57). Se valoró un total de 10 animales (3 del Grupo A, 7 del Grupo B).



**Figura 57** - Comparación de la puntuación del test de bienestar animal a la semana del postoperatorio entre los Grupos A y B.

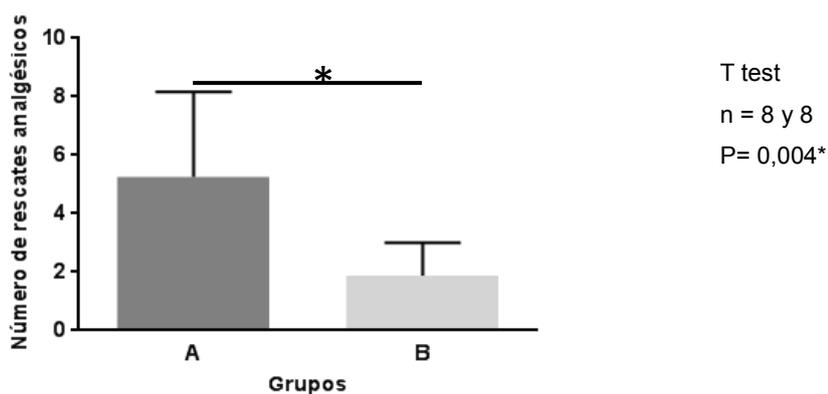
En la segunda semana, se pierde la significancia ( $p = 0,99$ ; Figura 58) entre los grupos. Fueron excluidos los animales del Grupo B que a las 2 semanas ya no llevaban el bloqueo continuo. Se valoró un total de 8 animales (3 del Grupo A, 5 del Grupo B).



**Figura 58** - Comparación de la puntuación del test de bienestar animal a las dos semanas del postoperatorio entre los Grupos A y B.

## 8. ANÁLISIS DE NECESIDAD DE RESCATE ANALGÉSICO DURANTE EL POSTOPERATORIO

Los animales necesitaron de rescate analgésico en algún momento del postoperatorio. Se observó una mayor necesidad de rescate analgésico de los animales del Grupo A en relación a los animales de Grupo B que llevaban puesto del bloqueo continuo, esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p = 0,004^*$ ; Figura 59). En este análisis se incluyeron los 16 animales incluidos en el estudio.



**Figura 59** - Comparación de la necesidad de rescate analgésico a las dos semanas del postoperatorio entre los Grupos A y B.

## **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

### 1. MODELOS ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN

Desde el principio de la Humanidad, se han utilizado los animales para mejorar la calidad de vida del ser humano y así poder prorrogar su existencia. El uso de animales por parte de la población ha evolucionado a lo largo de la historia de tal forma, que su utilización como modelo experimental para multitud de estudios existe desde hace siglos. El uso de animales para la investigación ha supuesto un gran beneficio para la sociedad. Este beneficio se puede apreciar en las ciencias básicas y especialmente en las de la salud (12). En estas últimas, el avance que se ha producido en el control de enfermedades y disfunciones ha sido espectacular, lo que se traduce en la mejora de la calidad de la vida humana y en la prolongación de su esperanza de vida. En especial el uso de grandes animales ha permitido aplicar de una forma traslacional las técnicas desarrolladas en los quirófanos experimentales.

### 2. MODELOS ANIMALES DE DEFECTO ÓSEO SEGMENTARIO DIAFISARIO EN OVINO

En el modelo ovino de DOSD aplicado en el presente estudio, se trabajó con animales esqueléticamente maduros. El animal de elección fue la oveja por presentar condiciones que la convierte en un valioso modelo de regeneración ósea humana (43,109). Actualmente, la mayoría de los estudios preclínicos en ortopedia traslacionales se realizan con esta especie (28,34,55).

En nuestra experiencia y respaldando los datos publicados por Auer *et al.* (90), tanto una valoración clínica preoperatoria como la familiarización del animal con su entorno, son componentes esenciales para una gestión postoperatoria exitosa. Se requiere un periodo de aclimatación para restaurar la homeostasis de los animales cuando llegan desde las instalaciones del distribuidor. Los animales seleccionados para el estudio deben acostumbrarse al lugar de estabulación así como al personal responsable de su cuidado, además de cualquier tipo de intervención pre o postoperatoria, como a los sistemas de inmovilización (163). En el

presente estudio, el periodo de aclimatación establecido fue de 2 semanas. En algunos animales, debido a problemas de disponibilidad, por parte de nuestro distribuidor, varió de 4 a 51 días. Durante este periodo alargado de aclimatación los animales pudieron mejorar su condición y robustez. Sin embargo, podemos afirmar que, independiente de la duración de la aclimatación, todos los animales mantuvieron o incrementaron su peso en este periodo. Por otra parte, se observó que los animales que presentaron un periodo de aclimatación más largo, presentaron un mayor incremento de peso respecto a los que se aclimataron durante periodos más cortos. Estos datos concuerdan con los publicados por Auer *et al.* (90), quien afirmó que periodos más largos (por ejemplo, 3-4 semanas) pueden ser más adecuados para asegurar que los animales estén acostumbrados a su entorno, a las rutinas de las instalaciones y al personal.

Considerando que la oveja es una especie gregaria, se puede inferir que el aislamiento en compartimentos individuales puede llevar consigo una situación de elevado estrés para los animales (164–166). Es por esto que en el presente estudio, las ovejas fueron estabuladas en grupos y se redujo el espacio de estabulación al mínimo que marca la legislación, con el propósito de evitar que se desplazaran en exceso y que realizaran movimientos bruscos (hechos que podrían ocasionar lesiones por fuerzas torsionales agudas).

La región anatómica para la creación del defecto óseo segmentario fue la diáfisis tibial, la más comúnmente utilizada en estos estudios ya que presenta unas dimensiones adecuadas para los sistemas actuales de fijación (36,104,109,121). En cuanto al sistema de fijación, sabemos por previa experiencia en nuestra institución, en un modelo ovino femoral (55) que las fijaciones externas pueden suponer un sistema óptimo en animales con un elevado peso corporal. Estas fijaciones suponen un trauma menor durante proceso quirúrgico y pueden soportar pesos corporales elevados. Alternativamente a las fijaciones externas, en este estudio se decidió utilizar el sistema de fijación interna, mediante una placa única de mayor grosor y con una diferente distribución de los tornillos de fijación, más adecuada para la región anatómica de estudio. Sin embargo, la ausencia de un sistema de soporte externo implica un elevado riesgo de fractura postoperatoria inmediata, como así ocurrió, en dos animales del Grupo Piloto de la Fase 2 (Grupo II).

Se han descrito otras alternativas para reducir la carga sobre la extremidad operada, como el corte percutáneo del tendón de Aquiles (107) o el uso de un sistema de fijación externa con un vendaje sintético (97). Mastrogiacomo *et al.* (97), por ejemplo, aplicaron un vendaje sintético en la extremidad operada en una posición funcional en animales con un rango de peso de entre 55 – 60 kg. Estabularon las ovejas en compartimentos individuales y permitieron que el animal cargara peso en la extremidad. Aun así, observaron que las placas de algunas ovejas se doblaron alrededor de 20 días del postoperatorio, y en algunos casos estos fallos mecánicos resultaron en una fractura en la zona del implante (97). Rozen *et al.* (95) inmovilizaron la extremidad con un vendaje sintético durante dos semanas, excluyendo las articulaciones de las falanges y de la rodilla para permitir movimientos, mientras que Lohfeld *et al.* (101) lo aplicaron durante todo el periodo de estudio. Sorprendentemente, ninguno de estos estudios reportaron complicaciones relacionadas con fallos mecánicos o fracturas óseas.

El presente estudio, optó por aplicar un sistema de inmovilización de vendaje sintético y como comentado anteriormente, los animales fueron estabulados en grupo. Todos los animales se adaptaron al vendaje sintético de poliéster antes de la intervención quirúrgica. De esta forma, los animales pudieron adaptar su marcha y aprender a echarse e incorporarse con esta nueva condición, evitando así movimientos bruscos una vez operados. El vendaje sintético se cortó en dos piezas para facilitar el seguimiento diario de la herida y otras complicaciones cutáneas que se pudieran derivar, ahorrando recursos y tiempo. Además, los animales podían andar e incorporarse libremente minimizando el riesgo de picos de fuerzas en el defecto y en la fijación. De manera práctica, también permitió tener un mayor número de ovejas en estudio de forma simultánea ya que no se requieren instalaciones específicas adicionales. Esto también repercute en una mejora de la calidad de vida del animal ya que puede ser estabulado en pequeños grupos dentro de un mismo compartimento, según recomienda la Guía de cuidado de los animales de laboratorio (119).

El tiempo de habituación al sistema de inmovilización varió entre los distintos animales, ya que inicialmente se fijó en 2 días y después se exploró la hipótesis de que un periodo de familiarización más largo (7 días) podría mejorar la homeostasia postquirúrgica de los animales. Sin embargo, al concluir el estudio se observó que la

pérdida de peso que se iniciaba en la habituación de 2 días aumentaba en la de 7 días, y posiblemente había hecho falta más tiempo para consolidar el acostumbamiento y recuperar el peso.

Durante la realización del estudio se desarrolló una ficha para el seguimiento postoperatorio, teniendo en cuenta la bibliografía referente a los parámetros relevantes para el control del dolor en pequeños rumiantes (127,130,160–162). El seguimiento de la extremidad intervenida consistió en la evaluación de parámetros relacionados con la marcha, mediante el establecimiento de una puntuación relacionada con el grado de apoyo (Test de apoyo). Mediante la evaluación del comportamiento general de los animales, su apariencia y su postura se aplicó el Test de bienestar.

En estos animales, la evaluación del dolor supone un reto, ya que difícilmente muestran signos evidentes de dolor (119,127,160) y existe en general una tendencia a no moverse (167). El dolor puede causar que estos animales dejen de rumiar, comer o beber y, por esta razón, un parámetro importante en el presente estudio para la evaluación postoperatoria fue el seguimiento del peso corporal (168).

Durante el presente estudio se comprobó como la condición corporal adecuada de los animales sometidos a un procedimiento quirúrgico experimental es esencial para evitar diversas situaciones que puedan agravar o alargar la duración de los estudios en animales y acarrear un indeseable aumento del número de individuos utilizados así como pérdidas económicas importantes.

### **3. TÉCNICAS ANESTÉSICAS Y ANALGÉSICAS EN MODELOS DE ORTOPEDIA OVINO**

El dolor crónico es una preocupación esencial en el diseño de modelos animales y es por esto que se requiere mucho cuidado a la hora de elegir los analgésicos. La ausencia de tratamiento analgésico en algunos estudios se puede atribuir a las dificultades para reconocer el dolor o a la falta de conocimiento de un uso apropiado de la analgesia (169).

De manera general podemos decir que la combinación de la analgesia pre y postoperatoria son necesarias para minimizar el dolor quirúrgico y que se debería evaluar el uso de una analgesia multimodal en los procedimientos de ortopedia. El tratamiento del dolor multimodal no es más que la combinación de diferentes fármacos o métodos analgésicos, con el fin de potenciar la analgesia y disminuir los efectos colaterales. El concepto de analgesia multimodal a pesar de no ser nuevo, cada día cobra más vigencia (170).

El presente estudio, optó por una anestesia equilibrada sometiendo a los animales a anestesia general con gases inhalatorios en combinación con opioides (95,121). Este tipo de protocolo es común en la mayoría de los modelos de ortopedia ovina (93,95,114,121,126). El protocolo analgésico de elección incluyó fármacos generalmente usados en ovino como antiinflamatorios no esteroideos, opioides y anestésicos locales. Debido a su largo periodo de acción y su efecto analgésico y antiinflamatorio, los AINE son los fármacos más utilizados para el control del dolor postoperatorio. Siguiendo las recomendaciones de Christou *et al.* (133) para modelos de ortopedia, previa intervención quirúrgica (24 horas), se aplicó parches transdérmicos de fentanilo a una dosis de 2,5-5 µg/kg/h. Se pauteó el uso del parche de fentanilo en los animales de los Grupos A y B como en un gran número de estudios de ortopedia (70,102-104,107), y también se usó como analgésico de rescate en caso de necesidad.

En el caso de los pequeños rumiantes, los problemas relacionados con el manejo anestésico incluyen: regurgitación, timpanismo abdominal, oxigenación inadecuada, depresión respiratoria, apnea y neumonía por aspiración (101). Igual que en el estudio de Smith *et al.* (36), durante los procedimientos, dos ovejas sufrieron un paro cardio-respiratorio antes de la intervención quirúrgica. Sin embargo, se logró realizar la maniobra de reanimación con éxito y los animales siguieron en el estudio.

Por otro lado, se ha demostrado que la administración de un anestésico local disminuye el tiempo de recuperación y las puntuaciones de dolor en clínica humana después de la intervención quirúrgica (171). En la actualidad, las técnicas de bloqueos nerviosos periféricos para anestesia y analgesia postoperatoria tienen su principal aplicación en la cirugía ortopédica, que se considera una de las más dolorosas en cirugía humana (172).

El uso de esta técnica en animales se está viendo incrementado en perros (140,141), gatos (142), conejos (143), cerdos (144), cabras (145) y ovejas (146,147).

Para conseguir un bloqueo sensitivo de larga duración en los principales nervios implicados en la inervación del área quirúrgica, se utilizó la ropivacaína 0,2%. La ropivacaína es un anestésico local de acción prolongada siendo utilizado como una alternativa a la bupivacaína, ya que presenta menos efectos tóxicos sobre el sistema nervioso central y sobre el sistema cardiovascular, factor importante en bloqueos nerviosos periféricos donde la inyección accidental intravascular podría ocurrir (139).

Hay poca información disponible sobre el uso de la ropivacaína en ovejas, por lo que la dosis del presente estudio se pautó según las respuestas sensitivas y motoras de la Fase 2, y por la visualización ecográfica de la distribución del anestésico local alrededor de la estructura nerviosa. Es de destacar que ninguna oveja presentó reacciones adversas a la ropivacaína.

Wagner *et al.* (147) en 2011, realizó un diseño experimental similar al presente estudio. Los autores evaluaron los efectos el bloqueo periférico de los nervios ciático y femoral en ovejas sometidas a una intervención de rodilla. A diferencia, realizaron la técnica solamente con neuroestimulación. Incluyeron 16 ovejas con bloqueo y 16 ovejas sin bloqueo nervioso. Como el presente estudio, también buscaban mejorar el bienestar de los animales en el periodo del postoperatorio, y tenían como primer objetivo reducir la cantidad de anestesia general requerida para la cirugía. Como AL de elección, utilizaron la bupivacaína, con duración de 4 a 8 horas y un protocolo analgésico multimodal. Controlaron la frecuencia cardíaca (FC), la presión arterial media (PAM) y la Filso durante la anestesia, y como resultado, observando un incremento significativamente mayor de la FC en las ovejas que no recibieron el bloqueo (147). En nuestro estudio, también se controlaron estos parámetros intraoperatorios, no encontrando diferencias significativas entre los grupos, probablemente por una falta de datos del Grupo A. Al principio del estudio se diseñó una ficha para registro de los parámetros fisiológicos durante la anestesia y observaciones del seguimiento animal. A medida que el estudio avanzó, la ficha se ajustó con las necesidades reales del estudio y se registraron los parámetros según las fases quirúrgicas (Anexo II: parte II).

Como el presente estudio, Wagner *et al.* (147), controlaron diversos parámetros de bienestar en el postoperatorio como la comodidad y la actitud, el movimiento, el comportamiento del rebaño, el comportamiento de alimentación y el apetito y la frecuencia respiratoria. Los resultados de Wagner *et al.* (147) fueron similares en cuanto a no encontrar efectos indeseables del AL. Sin embargo, el análisis del dolor postoperatorio difiere ya que aquellos autores concluyeron que los efectos beneficiosos de los bloqueos nerviosos fueron mínimos o no evidentes sus condiciones.

Adami *et al.* (145) en 2011, hizo su estudio acerca de la importancia de la concentración del anestésico local utilizado en el bloqueo periférico de los nervios ciático y femoral en cabras sometidas a una artrotomía de rodilla. A diferencia del presente estudio, pero al igual que el de Wagner *et al.* (147), realizaron la técnica con neuroestimulación pero sin el soporte de la ultrasonografía. Su AL de elección fue la bupivacaína a diferentes concentraciones: 0,25%; 0,5% y 0,75% y un grupo control con 0,9% NaCl. Los resultados de Adami *et al.* (145), fueron similares a los del presente estudio en cuanto a la realización de la técnica del bloqueo, demostrando ser una técnica eficaz y de fácil realización. La intensidad del bloqueo nervioso estaba determinada principalmente por la concentración de AL. Estos autores concluyeron que incrementando la concentración aumentaba la intensidad del bloqueo (mayor bloqueo motor). Al igual que el presente estudio, con la dosis de bupivacaína a 0,75% encontraron un importante efecto secundario no deseado del bloqueo motor (145).

#### **4. BLOQUEO NERVIOSO PERIFÉRICO EN OVEJA**

Al no tener experiencia previa con la técnica del bloqueo periférico del nervio ciático guiados por USG y con neuroestimulación en oveja, en el presente estudio se planteó realizar como primer paso un estudio anatómico del plexo lumbosacral, en miembros posteriores ovinos *post mortem*, localizando también puntos de referencias óseas y estructuras vasculares.

El segundo paso, como en el estudio de Waag *et al.* (148), se realizó el bloqueo periférico inyectando una solución de azul de metileno para asegurar la

validez de la técnica del estudio. Con el uso de la neuroestimulación, el nervio ciático fue localizado entre la tuberosidad isquiática y el trocánter mayor. El nervio femoral fue localizado medialmente al músculo sartorio y cranealmente a la arteria femoral. Seguidamente, se realizó una disección de las extremidades para comprobar la efectividad de la técnica, asegurando así la puesta a punto de una técnica viable y de rápido aprendizaje. Los autores Echeverry *et al.* (150), también describen un estudio anatómico de la técnica de ultrasonografía y neuroestimulación de los nervios axilar, ciático y femoral en perros, y como el presente estudio, concluyen ser un método preciso para distribución del anestésico local. En el estudio de Costa-Farré *et al.* (141), describen el bloqueo de los nervio ciático y safeno en perros utilizando la técnica de ultrasonografía y neuroestimulación. Utilizaron la lidocaína y lograron un bloqueo sensorial completo del nervio safeno en todos los animales a los 15 minutos, pero no obtuvieron en el nervio ciático un bloqueo motor y sensorial completo. Después de 2 horas todos los perros se habían recuperado por completo tanto las funciones motoras y sensoriales, y como en nuestro estudio, no se observaron complicaciones durante o después del procedimiento.

El presente estudio ofrece una descripción del estudio anatómico correlacionado con la imagen ecográfica detallada de los nervios ciático y femoral en la oveja. Se buscó, por un lado, una corta duración del bloqueo motor necesario para la cirugía y por otro, un bloqueo sensitivo de larga duración para analgesia postoperatoria que debía aplicarse sobre los nervios ciático y femoral, responsables de la inervación sensitiva del territorio quirúrgico.

El uso de la técnica ultrasonográfica en el presente modelo, facilitó la localización de las estructuras musculares y vasculonerviosas, y de esta forma se estableció una herramienta muy valiosa para conseguir una óptima anestesia regional. Cabe destacar que esta técnica aporta unas ventajas importantes respecto la técnica “ciega”, sobre todo en el número de intentos de paso de aguja, reduciendo traumatismos repetidos en los tejidos, disminuyendo el tiempo de realización del procedimiento y evitando las punciones vasculares accidentales en casos de variabilidad anatómica. Asimismo, el hecho de poder asegurar el correcto posicionamiento de la punta de la aguja y, por tanto, la correcta difusión del anestésico local a nivel perineural, favorece un menor tiempo de instauración del

bloqueo nervioso y puede comportar una disminución de la dosis de anestésico empleada.

Según nuestra experiencia, en el modelo ovino, el abordaje a nivel lateral del nervio ciático entre la tuberosidad isquiática y el trocánter mayor es una técnica rápida, fácil y efectiva. En esta área, la ubicación del nervio entre las dos estructuras óseas delimita claramente el área de escaneo y el abordaje no presenta complicaciones. Asimismo, el abordaje medial del nervio femoral a nivel inguinal también resultó fácil de realizar y el paquete vascular sirvió de referencia anatómica. La cercanía del nervio a las estructuras vasculares podría ocasionar la punción intravascular accidental descrita en las técnicas “ciegas”, por lo que la ultrasonografía cubrió esta área de especial importancia (173). El bloqueo nervioso periférico selectivo de los nervios ciático y femoral implicados en la inervación del territorio quirúrgico del defecto óseo segmentario tibial, y por lo tanto, del dolor postoperatorio en la cirugía de este estudio, fue efectivo a todos los animales de la Fase 2, con una duración media del bloqueo sensitivo de casi 5,5 horas. Dos animales presentaron fractura en el postoperatorio inmediato y no pudimos seguir evaluando la respuesta sensitiva.

Por otro lado, el bloqueo nervioso simultáneo de los nervios ciático y femoral, tan utilizados en clínica humana, se descartó en nuestro modelo ovino debido a la pérdida de sensibilidad propioceptiva que presentaron los animales en la Fase 2. (145). Concretamente, el bloqueo nervioso selectivo y simultáneo de los nervios ciático y femoral, provocó déficit motor. Este efecto no deseado se reportó también en el estudio de Adami *et al.* (145) en cabras y de Re *et al.* (174) en terneros. Todo ello desaconseja su uso prolongado durante el periodo postoperatorio en aquellos procedimientos ortopédicos experimentales en oveja que requieren la carga de la extremidad pélvica. Sin embargo, hay que añadir que en futuros estudios se podría plantear la realización de un bloqueo del nervio safeno interno (nervio sensitivo, rama del nervio femoral) con lo cual se podría obtener los efectos beneficiosos del bloqueo sensitivo sin presentar déficits motores.

## **5. BLOQUEO CONTINUO DE NERVIOS PERIFÉRICOS PARA EL CONTROL DEL DOLOR POSTOPERATORIO EN OVEJA**

La utilización de técnicas de analgesia continua con la colocación de catéteres perineurales es ampliamente utilizada en la medicina humana (175). Sus indicaciones más frecuentes son el dolor postquirúrgico previsto como moderado-severo, patologías que requieran terapia física dolorosa o para ocasionar un bloqueo simpático en síndromes de dolor regional complejo.

El presente estudio supone la primera descripción de una técnica de bloqueo continuo guiado por ultrasonografía y con neuroestimulación en un modelo ovino de experimentación traslacional. Se optó por colocar un catéter a nivel de nervio ciático por ser el responsable de la inervación ósea de la zona quirúrgica donde se realizó el defecto óseo segmentario. La colocación del catéter con el sistema especial de catéter sobre aguja utilizado resultó una técnica fácil y rápida, pudiendo realizarse por un solo operador.

Cabe destacar que en estas técnicas continuas es indispensable una buena fijación del catéter, y para evitar migraciones del mismo se optó por realizar una tunelización subcutánea. En los controles periódicos del sistema no se detectaron signos de infección y el sistema infusor incorporado fue bien tolerado por las ovejas. El periodo de duración del bloqueo continuo se estableció en 2 semanas, dado que previamente habíamos comprobado una mayor necesidad de rescate analgésico durante las 2 semanas del postoperatorio en los animales del Grupo A, en los que no se realizó esta técnica. De los 8 animales que recibieron el bloqueo continuo, en la mitad se pudo mantener la infusión continua hasta el día 14 del postoperatorio, y en los otros 4 el catéter se descolocó entre los días 5 y 13.

De manera general, el presente estudio demuestra que el bloqueo nervioso periférico del nervio ciático puede aplicarse en oveja intraoperatoriamente, y prolongarse de forma continua durante el primer periodo postoperatorio con un sistema de infusión. El bloqueo nervioso continuo del nervio ciático guiado por ultrasonografía y con neuroestimulación se desarrolló e implementó de forma exitosa, proporcionando un acceso seguro, preciso y viable, considerándose un bloqueo analgésico satisfactorio. En el periodo de la primera semana del postoperatorio, se observó que un mayor número de animales del Grupo B

presentaron un correcto apoyo y menos signos de cojera como también una mayor puntuación de los parámetros de bienestar que los animales del Grupo A. Se observó también, que la mayor duración del bloqueo continuo se correlacionaba con el correcto apoyo de la extremidad. En el modelo descrito de DOSD en oveja, la aplicación de esta técnica de bloqueo proporcionó una reducción del dolor postoperatorio con una rápida recuperación de la capacidad de carga de la extremidad pélvica.

Como en el estudio de Royal *et al.* (144) en cerdos, se considera que la técnica puesta a punto en ovejas representa un refinamiento del protocolo anestésico, que repercute en una mejora del bienestar animal durante el procedimiento experimental permitiendo disminuir las dosis de fármacos de rescate. Además, el hecho de poder controlar mejor el dolor de los animales, implica la reducción del uso de algunos fármacos que podrían interferir con los objetivos de la investigación científica (en nuestro caso, los AINE). Finalmente, consideramos que este nuevo refinamiento de la anestesia del bloqueo continuo experimental en ovejas podría ser útil en otros procedimientos ortopédicos.

## **6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

De manera muy marcada, pudimos constatar que la curva de aprendizaje es un factor crítico a tener en cuenta en este tipo de estudios experimentales. Hemos tenido problemas relacionados con el sistema de inmovilización que provocó en los animales dermatitis, úlceras, bursitis calcáneas y abrasiones provocadas por el vendaje. Con la experiencia, estos problemas se paliaron o solventaron con el uso de medicamentos y la aplicación de otras soluciones como el uso de un doble acolchonamiento en determinadas zonas de la extremidad del animal.

Por otro lado, la realización de este estudio (puesta a punto de la técnica, seguimiento de los animales, tratamientos y curas) requirió una gran dedicación e involucración del personal especializado. Conocemos, por los estudios de Bateson (176) y Montgomery (177), que el personal especializado debe conocer las características del comportamiento del animal experimental, dado que el éxito o el fracaso del estudio puede depender de la habilidad del personal en detectar las actitudes de dolor y angustia de los animales. El entrenamiento y la pericia del

personal veterinario fueron esenciales para el cumplimiento del alivio del dolor de los animales utilizados. Sin embargo no fue posible que la misma persona realizase el control durante toda la duración del estudio. Por todo ello, hay que aclarar que, en períodos de vacaciones, donde hubo cambios en el personal evaluador, o en épocas en que el volumen de trabajo de la Plataforma era realmente elevado, no se pudieron recoger todos los datos del estudio debidamente. Estas limitaciones logísticas justifican, pues, la falta de datos en algunos de los análisis.

Finalmente, es de conocimiento que investigadores que estudian el dolor y la analgesia en los animales utilizan sistemas de cámaras de videos para registrar su comportamiento, siendo evaluados permanentemente sin presencia humana (178). Ciertas actuaciones de los ovinos, y por lo tanto los resultados, pueden ser diferentes cuando los seres humanos están ausentes pues los animales están atentos al observador, escondiendo cualquier signo de dolor. Su aplicación como herramienta diagnóstica en futuros estudios podría ayudar a analizar estos signos de dolor que tienden a esconder.

## **CONCLUSIONES**



### CONCLUSIONES

A partir de estos resultados se concluye que:

1. Nuestro estudio ofrece una descripción del estudio anatómico correlacionado con la imagen ecográfica detallada del nervio ciático y femoral en la oveja. El abordaje ecográfico posterolateral entre la tuberosidad isquiática y el trocánter mayor permite localizar y bloquear el nervio ciático de forma rápida, fácil y efectiva. El abordaje ecográfico medial a nivel inguinal permite la localización y el bloqueo seguro del nervio femoral. La visualización ecográfica previene complicaciones como lesiones nerviosas o inyecciones intravasculares accidentales.
2. En nuestro estudio el bloqueo nervioso selectivo y simultáneo de los nervios ciático y femoral provocó una excesiva pérdida de sensibilidad propioceptiva y déficit motores lo cual desaconseja su uso prolongado durante el periodo postoperatorio en aquellos procedimientos ortopédicos experimentales en oveja que requieren la carga de la extremidad pélvica.
3. El bloqueo nervioso continuo del nervio ciático guiado por ultrasonografía y con neuroestimulación se ha desarrollado e implementado de forma exitosa. Ofrece un acceso seguro, preciso y viable proporcionando un bloqueo analgésico satisfactorio y creemos que debe ser considerado una alternativa adecuada en la oveja sometida a procedimientos experimentales ortopédicos.
4. El bloqueo nervioso periférico del nervio ciático puede aplicarse en oveja intraoperatoriamente, y prolongarse de forma continua durante el primer periodo postoperatorio con un sistema de infusión. En un modelo de defecto óseo segmentario diafisario en oveja, reduce el dolor postoperatorio recuperando con rapidez la capacidad de carga de la extremidad pélvica.

Esto supone un refinamiento de la técnica anestésica, que repercute en una mejora del bienestar animal durante el procedimiento experimental y permite disminuir las dosis de fármacos de rescate minimizando también el uso de los fármacos que podrían interferir con los objetivos de la investigación científica.

5. Se requieren estudios adicionales para evaluar si el bloqueo selectivo del nervio safeno interno, rama sensitiva del nervio femoral, obtiene los efectos beneficiosos del bloqueo sensitivo evitando la pérdida de sensibilidad propioceptiva y el déficit motor permitiendo su uso en procedimientos ortopédicos experimentales en oveja.

## **BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Peiro JL, Fontecha CG, Ruano R, Esteves M, Fonseca C, Marotta M, et al. Single-Access Fetal Endoscopy (SAFE) for myelomeningocele in sheep model I: amniotic carbon dioxide gas approach. *Surg Endosc*. 2013;27(10):3835–40.
2. Bellera N, Barba I, Rodriguez-Sinovas A, Ferret E, Asin MA, Gonzalez-Alujas M, et al. Single Intracoronary Injection of Encapsulated Antagomir-92a Promotes Angiogenesis and Prevents Adverse Infarct Remodeling. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(5):e000946–e000946.
3. Sanchez-de-Toledo J, Renter-Valdovinos L, Esteves M, Fonseca C, Villaverde I, Rosal M. Teaching Chest Ultrasound in an Experimental Porcine Model. *Pediatr Emerg Care*. 2015;00(00):1–5.
4. Forriol F. Métodos de investigación clínicos en cirugía ortopédica y traumatología. *Trauma*. 2010;21(Supl 1):7–20.
5. Curzer HJ, Perry G, Wallace MC, Perry D. The Three Rs of Animal Research: What they Mean for the Institutional Animal Care and Use Committee and Why. *Sci Eng Ethics*. 2015.
6. DeGrazia D, Sebo J. Necessary Conditions for Morally Responsible Animal Research. *Camb Q Healthc Ethics*. 2015 Oct;24(4):420–30.
7. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen; 1959.
8. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Special Ed. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW); 1992. 238 p.
9. Tannenbaum J, Tylor-Bennett B. Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54(2):120–32.
10. Buchanan-Smith HM, Rennie A, Vitale A, Pollo S, Prescott MJ, Morton DB. Harmonising the definition of refinement. *Anim Welf*. 2005;14(4):379–84.
11. Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX*. 2002;19(2):73–8.
12. Farnaud S. The evolution of the Three Rs. *Altern Lab Anim*. 2009;37(3):249–54.
13. Griffin G, Clark JM, Zurlo J, Ritskes-Hoitinga M. Scientific uses of animals: harm-benefit analysis and complementary approaches to implementing the three Rs. *Rev Sci Tech*. 2014;33(1):265–72.
14. Goldberg AM. *The Principles of Humane Experimental Technique: Is It Relevant Today?* *ALTEX*. 2010;(Special Issue):25–7.

15. Unión Europea. Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Diario Oficial de la Unión Europea L276, 20 de octubre de 2010. p. 33–79.
16. Ministerio de la Presidencia. RD 53/2013. Boletín Oficial del Estado. 2013. p. 11370–421.
17. Decreto 214/1997, de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para experimentación científica. Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya, 7 de agosto de 1997, núm. 2450. Departamento de Ganadería, Agricultura y Pesca; p. 9169–75.
18. Comisión Europea. Informe de la Comisión y al Parlamento Europeo. Séptimo informe sobre las estadísticas relativas al número de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea. Bruselas; 2013.
19. Informe sobre usos de animales en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia en 2014. España: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; 2014.
20. Stevens A, Lowe J. Histología Humana. 2ª edición. Madrid: Harcourt Brace; 1998.
21. Junqueira LC, Carneiro J. Histología básica. Texto y atlas. 5ª edición. Barcelona: Masson; 2002.
22. Wancket LM. Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. *Vet Pathol.* 2015;52(5):842–50.
23. Birkhold AI, Razi H, Weinkamer R, Duda GN, Checa S, Willie BM. Monitoring in vivo (re)modeling: A computational approach using 4D microCT data to quantify bone surface movements. *Bone.* 2015;75:210–21.
24. Wang C, Wang J, Zhang Y, Yuan C, Liu D, Pei Y, et al. A canine model of femoral head osteonecrosis induced by an ethanol injection navigated by a novel template. *Int J Med Sci.* 2013;10(11):1451–8.
25. Permuy M, Guede D, López-Peña M, Muñoz F, Caeiro J-R, González-Cantalapiedra A. Effects of diacerein on cartilage and subchondral bone in early stages of osteoarthritis in a rabbit model. *BMC Vet Res.* 2015;11(1):143.
26. Schubert T, Lafont S, Beaurin G, Grisay G, Behets C, Gianello P, et al. Critical size bone defect reconstruction by an autologous 3D osteogenic-like tissue derived from differentiated adipose MSCs. *Biomaterials.* 2013;34(18):4428–38.
27. Nair MB, Varma HK, Menon K V., Shenoy SJ, John A. Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma. *Acta Biomater.* 2009;5(5):1742–55.
28. Vélez R, Hernández-Fernández A, Caminal M, Vives J, Soldado F, Fernández A, et al. Treatment of femoral head osteonecrosis with advanced cell therapy in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2012;132(11):1611–8.

29. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*. 1998;139(2):663–70.
30. Barbieri G, Barbieri C. A comparative in vivo ultrasonometric evaluation of normal and delayed fracture healing in sheep tibiae. *Clinics*. 2014;69(9):634–40.
31. Kondo E, Yasuda K, Katsura T, Hayashi R, Kotani Y, Tohyama H. Biomechanical and histological evaluations of the doubled semitendinosus tendon autograft after anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Am J Sports Med*. 2012;40(2):315–24.
32. Fonseca C, Caminal M, Peris D, Barrachina J, Fàbregas PJ, Garcia F, et al. An arthroscopic approach for the treatment of osteochondral focal defects with cell-free and cell-loaded PLGA scaffolds in sheep. *Cytotechnology*. 2014;66(2):345–54.
33. Hillier ML, Bell LS. Differentiating Human Bone from Animal Bone: A Review of Histological Methods. *J Forensic Sci*. 2007;52(2):249–63.
34. Harvey EJ, Giannoudis P V, Martineau P a, Lansdowne JL, Dimitriou R, Moriarty TF, et al. Preclinical animal models in trauma research. *J Orthop Trauma*. 2011;25(8):488–93.
35. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cells Mater*. 2007;13(0):1–10.
36. Smith JO, Tayton ER, Khan F, Aarvold A, Cook RB, Goodship A, et al. Large animal in vivo evaluation of a binary blend polymer scaffold for skeletal tissue-engineering strategies; translational issues. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015.
37. Decker S, Reifenrath J, Omar M, Krettek C, Müller CW. Non-osteotomy and osteotomy large animal fracture models in orthopedic trauma research. *Orthop Rev (Pavia)*. 2014;6(4).
38. Borkowski L, Pawłowska M, Radzki RP, Bieńko M, Polkowska I, Belcarz A, et al. Effect of a carbonated HAP/ $\beta$ -glucan composite bone substitute on healing of drilled bone voids in the proximal tibial metaphysis of rabbits. *Mater Sci Eng C*. 2015;53:60–7.
39. Liebschner MA. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*. 2004;25(9):1697–714.
40. Tatara AM, Shah SR, Livingston CE, Mikos AG. Infected animal models for tissue engineering. *Methods*. Elsevier Inc.; 2015;84:17–24.
41. Recher RR, Kimmel DB, Dempster D, Weinstein RS, Wronski TJ, Burr DB. Issues in modern bone histomorphometry. *Bone*. 2011;49(5):955–64.
42. Kilborn SH, Trudel G, Uthoff H. Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2002;41(5):21–6.

43. Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B*. 2010;16(1):123–45.
44. Biological evaluation of medical devices - Part 6: Test for local effects after implantation. ISO 10993-6:2007(E). ISO; 2007.
45. Cuairán C, Campbell PM, Kontogiorgos E, Taylor RW, Melo AC, Buschang PH. Local application of zoledronate enhances miniscrew implant stability in dogs. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2014;145(6):737–49.
46. Salomó-Coll O, Maté-Sánchez de Val JE, Ramírez-Fernandez MP, Hernández-Alfaro F, Gargallo-Albiol J, Calvo-Guirado JL. Topical applications of vitamin D on implant surface for bone-to-implant contact enhance: a pilot study in dogs part II. *Clin Oral Implants Res*. 2015.
47. Shapiro F, Connolly S, Zurakowski D, Menezes N, Olear E, Jimenez M, et al. Femoral head deformation and repair following induction of ischemic necrosis: a histologic and magnetic resonance imaging study in the piglet. *J Bone Jt Surg*. 2009;91(12):2903.
48. Martin RK, Gillis D, Leiter J, Shantz JS, MacDonald P. A Porcine Knee Model Is Valid for Use in the Evaluation of Arthroscopic Skills: A Pilot Study. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;(123).
49. Leng P, Wang Y-Z, Zhang H-N. Repair of Large Osteochondral Defects With Mix-Mosaicplasty in a Goat Model. *Orthopedics*. 2013;36(3):331–6.
50. Qiu F, Ma JYX, Yang JXQ. Influence of vertebral column distraction on spinal cord volume: an experimental study in a goat model. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2015;135(9):1201–10.
51. Loozen LD, van der Helm YJM, Öner FC, Dhert WJA, Kruyt MC, Alblas J. Bone Morphogenetic Protein-2 Nonviral Gene Therapy in a Goat Iliac Crest Model for Bone Formation. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(9-10):1672–9.
52. Gardel L, Afonso M, Frias C, Gomes M, Reis R. Assessing the repair of critical size bone defects performed in a goat tibia model using tissue-engineered constructs cultured in a bidirectional flow perfusion bioreactor. *J Biomater Appl*. 2014.
53. Soldado F, Aguirre M, Peiró JL, Fontecha CG, Esteves M, Velez R, et al. Fetal surgery of extremity amniotic bands: an experimental model of in utero limb salvage in fetal lamb. *J Pediatr Orthop*. 2009;29(1):98–102.
54. Vélez R, Soldado F, Hernández A, Barber I, Aguirre M. A new preclinical femoral head osteonecrosis model in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2011;131(1):5–9.
55. Hernandez-Fernandez A, Vélez R, Soldado F, Saenz-Ríos JC, Barber I, Aguirre-Canyadell M. Effect of administration of platelet-rich plasma in early phases of distraction osteogenesis: an experimental study in an ovine femur model. *Injury*. 2013;44(7):901–7.

56. Chavassieux P, Pastoureau P, Boivin G, Chapuy MC, Delmas PD, Meunier PJ. Dose effects on ewe bone remodeling of short-term sodium fluoride administration — A histomorphometric and biochemical study. *Bone*. 1991 [cited 2015 Oct 4];12(6):421–7.
57. Den Boer FC, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Van Lingen a., Vink GQM, et al. New segmental long bone defect model in sheep: Quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry. *J Orthop Res*. 1999;17:654–60.
58. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*. 2009;30:2149–63.
59. Pilia M, Guda T, Appleford M. Development of composite scaffolds for load-bearing segmental bone defects. *Biomed Res Int*. 2013;2013:458253.
60. Schmitz J, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986;205:299–308.
61. Gugala Z, Gogolewski S. Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study. *J Orthop Trauma*. 1999;13(3):187–95.
62. Cacchioli A, Spaggiari B, Ravanetti F, Martini FM, Borghetti P, Gabbi C. the Critical Sized Bone Defect: Morphological Study of Bone Healing. *Ann Fac Med Vet di Parma*. 2006;26:97–110.
63. Liu T, Wu G, Gu Z, Wismeijer D, Liu Y. Letter to the Editor. A critical-sized bone defect. *Bone*. 2014;68:163–4.
64. Lindsey RW, Gugala Z, Milne E, Sun M, Gannon FH, Latta LL. The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *J Orthop Res*. 2006;24(7):1438–53.
65. Pneumaticos SG, Triantafyllopoulos GK, Basdra EK, Papavassiliou AG. Segmental bone defects: from cellular and molecular pathways to the development of novel biological treatments. *J Cell Mol Med*. 2010;14(11):2561–9.
66. Stavropoulos A, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D, Klinge B. Pre-clinical in vivo models for the screening of bone biomaterials for oral/craniofacial indications: focus on small-animal models. *Periodontol 2000*. 2015;68(1):55–65.
67. Cheng B-H, Chu T-MG, Chang C, Kang H-Y, Huang K-E. Testosterone Delivered with a Scaffold Is as Effective as Bone Morphologic Protein-2 in Promoting the Repair of Critical-Size Segmental Defect of Femoral Bone in Mice. *PLoS One*. 2013;8(8):e70234.
68. Zwingenberger S, Yao Z, Jacobi A, Vater C, Valladares RD, Li C, et al. Enhancement of BMP-2 induced bone regeneration by SDF-1 $\alpha$  mediated stem cell recruitment. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(3-4):810–8.

69. Lampert FM, Momeni A, Filev F, Torio-padron N, Finkenzeller G, Stark GB, et al. Utilization of a genetically modified muscle flap for local BMP-2 production and its effects on bone healing: a histomorphometric and radiological study in a rat model. 2015;10:55:1–10.
70. Bosemark P, Perdikouri C, Pelkonen M, Isaksson H, Tägil M. The masquelet induced membrane technique with BMP and a synthetic scaffold can heal a rat femoral critical size defect. *J Orthop Res*. 2015;33(4):488–95.
71. Delgado-Ruiz RA, Calvo Guirado JL, Romanos GE. Bone grafting materials in critical defects in rabbit calvariae. A systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Implants Res*. 2015.
72. Oporto GH, Fuentes R, Borie E, de Sol M, Orsi IA, Engelke W. Radiographical and clinical evaluation of critical size defects in rabbit calvaria filled with allograft and autograft: a pilot study. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(7):1669–75.
73. Sciadini MF, Dawson JM, Johnson KD. Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res*. 1997;15:844–57.
74. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80(2):985–96.
75. Hu Y, Zhang C, Zhang S, Xiong Z, Xu J. Development of a porous poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite/collagen scaffold as a BMP delivery system and its use in healing canine segmental bone defect. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67:591–8.
76. Raschke M, Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Flyvbjerg a., Lindner T, et al. Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. *Bone*. 2001;29(4):368–73.
77. Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Alquiza M, Raun K, Kappelgard a., et al. Homologous growth hormone accelerates bone healing - A biomechanical and histological study. *Bone*. 2003;33:628–37.
78. Pek YS, Gao S, Arshad MSM, Leck KJ, Ying JY. Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29:4300–5.
79. Dai KR, Xu XL, Tang TT, Zhu Z a., Yu CF, Lou JR, et al. Repairing of goat tibial bone defects with BMP-2 gene-modified tissue-engineered bone. *Calcif Tissue Int*. 2005;77:55–61.
80. Bi L, Cheng W, Fan H, Pei G. Reconstruction of goat tibial defects using an injectable tricalcium phosphate/chitosan in combination with autologous platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2010;31(12):3201–11.
81. Huang J, Zhang L, Chu B, Peng X, Tang S. Repair of Bone Defect in Caprine Tibia Using a Laminated Scaffold With Bone Marrow Stromal Cells Loaded Poly (L-Lactic Acid)/b-Tricalcium Phosphate. *Artif Organs*. 2011;35(1):49–57.

82. Fricain JC, Schlaubitz S, Le Visage C, Arnault I, Derkaoui SM, Siadous R, et al. A nano-hydroxyapatite - Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2013;34(12):2947–59.
83. van Griensven M. Preclinical testing of drug delivery systems to bone. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015.
84. Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med*. 2001;51(4):292–9.
85. O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;9(1):79–84.
86. ASTM Standard F2721. Standard Guide for Pre-clinical in vivo Evaluation in Critical Size Segmental Bone Defects. 2008.
87. Berner A, Reichert JC, Woodruff MA, Saifzadeh S, Morris AJ, Epari DR, et al. Autologous vs. allogenic mesenchymal progenitor cells for the reconstruction of critical sized segmental tibial bone defects in aged sheep. *Acta Biomater*. 2013;9(8):7874–84.
88. Molina CS, Stinner DJ, Obremskey WT. Treatment of Traumatic Segmental Long-Bone Defects: A Critical Analysis Review. *JBJS Rev*. 2014 [cited 2015 Oct 11];2(4):e1–e1.
89. Domic-Cule I, Pecina M, Jelic M, Jankolija M, Popek I, Grgurevic L, et al. Biological aspects of segmental bone defects management. *Int Orthop*. 2015.
90. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, et al. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord*. 2007;8:72.
91. Gugala Z, Gogolewski S. Healing of critical-size segmental bone defects in the sheep tibiae using bioresorbable polylactide membranes. *Injury*. 2002;33 Suppl 2:B71–6.
92. den Boer FC, Wippermann BW, Blockhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Haarman HJTM. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthop Res*. 2003;21(3):521–8.
93. Meinel L, Zoidis E, Zapf J, Hassa P, Hottiger MO, Auer JA, et al. Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation. *Bone*. 2003;33:660–72.
94. Tyllianakis M, Deligianni D, Panagopoulos A, Pappas M, Sourgiadaki E, Mavrilas D, et al. Biomechanical comparison of callus over a locked intramedullary nail in various segmental bone defects in a sheep model. *Med Sci Monit*. 2007;13(5):BR125–30.
95. Rozen N, Bick T, Bajayo A, Shamian B, Schrift-Tzadok M, Gabet Y, et al. Transplanted blood-derived endothelial progenitor cells (EPC) enhance bridging of sheep tibia critical size defects. *Bone*. 2009;45(5):918–24.

96. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2010;31(13):3572–9.
97. Mastrogiacomo M, Corsi A, Francioso E, Di Comite M, Monetti F, Scaglione S, et al. Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate. *Tissue Eng*. 2006;12(5):1261–73.
98. Hahn JA, Witte TS, Arens D, Pearce A, Pearce S. Double-plating of ovine critical sized defects of the tibia: a low morbidity model enabling continuous in vivo monitoring of bone healing. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12(1):214.
99. Christou C, Oliver RA, Yu Y, Walsh WR. The Masquelet Technique for Membrane Induction and the Healing of Ovine Critical Sized Segmental Defects. *PLoS One*. 2014;9(12):e114122.
100. Field JR, McGee M, Stanley R, Ruthenbeck G, Papadimitrakis T, Zannettino A, et al. The efficacy of allogeneic mesenchymal precursor cells for the repair of an ovine tibial segmental defect. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2011;24(14):113–21.
101. Lohfeld S, Cahill S, Barron V, McHugh P, Dürselen L, Kreja L, et al. Fabrication, mechanical and in vivo performance of polycaprolactone/tricalcium phosphate composite scaffolds. *Acta Biomater*. 2012;8(9):3446–56.
102. Schneiders W, Reinstorf A, Biewener A, Serra A, Grass R, Kinscher M, et al. In vivo effects of modification of hydroxyapatite/collagen composites with and without chondroitin sulphate on bone remodeling in the sheep tibia. *J Orthop Res*. 2009;27(1):15–21.
103. Christou C, Oliver RA, Pelletier MH, Walsh WR. Ovine model for critical-size tibial segmental defects. *Comp Med*. 2014;64(5):377–85.
104. Maissen O, Eckhardt C, Gogolewski S, Glatt M, Arvinte T, Steiner A, et al. Mechanical and radiological assessment of the influence of rhTGFbeta-3 on bone regeneration in a segmental defect in the ovine tibia: pilot study. *J Orthop Res*. 2006;24(8):1670–8.
105. Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials*. 2006;27:1817–23.
106. Reichert JC, Cipitria A, Epari DR, Saifzadeh S, Krishnakanth P, Berner A, et al. A Tissue Engineering Solution for Segmental Defect Regeneration in Load-Bearing Long Bones. *Sci Transl Med*. 2012;4(141):141ra93.
107. Rentsch C, Schneiders W, Hess R, Rentsch B, Bernhardt R, Spekl K, et al. Healing properties of surface-coated polycaprolactone-co-lactide scaffolds: a pilot study in sheep. *J Biomater Appl*. 2014;28:654–66.

108. Bloemers FW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Haarman HJTM. Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003;66(2):526–31.
109. Reichert JC, Epari DR, Wullschleger ME, Saifzadeh S, Steck R, Lienau J, et al. Establishment of a preclinical ovine model for tibial segmental bone defect repair by applying bone tissue engineering strategies. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(1):93–104.
110. Niemeyer P, Schönberger TS, Hahn J, Kasten P, Fellenberg J, Suedkamp N, et al. Xenogenic transplantation of human mesenchymal stem cells in a critical size defect of the sheep tibia for bone regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(1):33–43.
111. Reichert JC, Wullschleger ME, Cipitria A, Lienau J, Cheng TK, Schütz MA, et al. Custom-made composite scaffolds for segmental defect repair in long bones. *Int Orthop.* 2011;35:1229–36.
112. Donati D, Di Bella C, Gozzi E, Lucarelli E, Beccheroni A, Di Maggio N, et al. In vivo study on critical defects using the sheep model. *Chir Organi Mov.* 2005;90(1):31–9.
113. Gao TJ, Lindholm TS, Kommonen B, Ragni P, Paronzini a., Lindholm TC, et al. The use of a coral composite implant containing bone morphogenetic protein to repair a segmental tibial defect in sheep. *Int Orthop.* 1997;21:194–200.
114. Pluhar GE, Turner AS, Pierce AR, Toth CA, Wheeler DL. A comparison of two biomaterial carriers for osteogenic protein-1 (BMP-7) in an ovine critical defect model. *J Bone Joint Surg Br.* 2006;88:960–6.
115. Teixeira CR, Rahal SC, Volpi RS, Taga R, Cestari TM, Granjeiro JM, et al. Tibial segmental bone defect treated with bone plate and cage filled with either xenogeneic composite or autologous cortical bone graft. An experimental study in sheep. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2007;20(4):269–76.
116. Cruz JI. [Anesthesia in experimental animals. Basic principles]. *Rev Esp Anesthesiol Reanim.* 1996;43(3):99–107.
117. Bazin JE, Constantin JM, Gindre G. [Laboratory animal anaesthesia: influence of anaesthetic protocols on experimental models]. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2004;23(8):811–8. 3
118. IASP. Core curriculum for Professional Education in Pain. 3rd ed. Charlton JE, editor. IASP Press; 2005.
119. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eight edit. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: The National Academies Press; 2011.
120. Obernier JA, Baldwin RL. Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals. *ILAR J.* 2006;47(4):364–9.

121. Fernandes MBC, Guimarães JA, Casado P, Cavalcanti A dos, Gonçalves NN, Ambrósio CE, et al. The effect of bone allografts combined with bone marrow stromal cells on the healing of segmental bone defects in a sheep model. *BMC Vet Res*. 2014;10(1):36.
122. Flecknell P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 3rd ed. Academic Press, editor. Elsevier; 2009.
123. Divincenti LJ, Westcott R, Lee C. Sheep (*Ovis aries*) as a Model for Cardiovascular Surgery and Management before, during, and after Cardiopulmonary Bypass. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2014;53(5):439–48.
124. Galatos AD. Anesthesia and Analgesia in Sheep and Goats. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract*. 2011;27(1):47–59.
125. Regueiro-Purriños M, Ajenjo JM, Pérez de Prado A, García-Gómez M, Altónaga JR, Gonzalo-Orden JM, et al. Anestesia en el modelo animal de investigación cardiovascular. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(5):47–56.
126. Hahn JA, Witte TS, Arens D, Pearce A, Pearce S. Double-plating of ovine critical sized defects of the tibia: a low morbidity model enabling continuous in vivo monitoring of bone healing. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12(1):214.
127. Abu-Serriah M, Nolan AM, Dolan S. Pain assessment following experimental maxillofacial surgical procedure in sheep. *Lab Anim*. 2007;41(3):345–52.
128. Funes FJ, Granados MDM, Morgaz J, Navarrete R, Fernández-Sarmiento A, Gómez-Villamandos R, et al. Anaesthetic and cardiorespiratory effects of a constant rate infusion of fentanyl in isoflurane- anaesthetized sheep. *Vet Anaesth Analg*. 2014;42(2):157–64.
129. Dzikiti BT, Stegmann FG, Dzikiti LN, Hellebrekers LJ. Total intravenous anaesthesia (TIVA) with propofol-fentanyl and propofol-midazolam combinations in spontaneously-breathing goats. *Vet Anaesth Analg*. 2010;37(6):519–25.
130. Ahern BJ, Soma LR, Boston RC, Schaer TP. Comparison of the analgesic properties of transdermally administered fentanyl and intramuscularly administered buprenorphine during and following experimental orthopedic surgery in sheep. *Am J Vet Res*. 2009;70(3):418–22.
131. Ahern BJ, Soma LR, Rudy JA, Uboh CE, Schaer TP. Pharmacokinetics of fentanyl administered transdermally and intravenously in sheep. *Am J Vet Res*. 2010;71(10):1127–32.
132. Grond S, Radbruch L, Lehmann KA. Clinical pharmacokinetics of transdermal opioids: focus on transdermal fentanyl. *Clin Pharmacokinet*. 2000;38(1):59–89.
133. Christou C, Oliver RA, Rawlinson J, Walsh WR. Transdermal fentanyl and its use in ovine surgery. *Res Vet Sci*. 2015;100:252–6.
134. Dahners LE, Mullis BH. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on bone formation and soft-tissue healing. *J Am Acad Orthop Surg*. 12(3):139–43.

135. Ho ML, Chang JK, Wang GJ. Antiinflammatory drug effects on bone repair and remodeling in rabbits. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;(313):270–8.
136. Brown KM, Saunders MM, Kirsch T, Donahue HJ, Reid JS. Effect of COX-2-specific inhibition on fracture-healing in the rat femur. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A(1):116–23.
137. Giannoudis PV, MacDonald DA, Matthews SJ, Smith RM, Furlong AJ, De Boer P. Nonunion of the femoral diaphysis. The influence of reaming and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Bone Joint Surg Br.* 2000;82(5):655–8.
138. Ahrens J, Leffler A. [Update on the pharmacology and effects of local anesthetics]. *Anaesthesist.* 2014;63(5):376–86.
139. Leone S, Di Cianni S, Casati A, Fanelli G. Pharmacology, toxicology, and clinical use of new long acting local anesthetics, ropivacaine and levobupivacaine. *Acta Biomed.* 2008 Aug;79(2):92–105.
140. Campoy L, Bezuidenhout AJ, Gleed RD, Martin-Flores M, Raw RM, Santare CL, et al. Ultrasound-guided approach for axillary brachial plexus, femoral nerve, and sciatic nerve blocks in dogs. *Vet Anaesth Analg.* 2010;37(2):144–53.
141. Costa-Farré C, Blanch XS, Cruz JI, Franch J. Ultrasound guidance for the performance of sciatic and saphenous nerve blocks in dogs. *Vet J.* 2011;187(2):221–4.
142. Adami C, Dayer T, Spadavecchia C, Angeli G. Ultrasound-guided pudendal nerve block in cats undergoing perineal urethrostomy: a prospective, randomised, investigator-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Feline Med Surg.* 2014;16(4):340–5.
143. Fonseca C, Server A, Esteves M, Barastegui D, Rosal M, Fontecha CG, et al. An ultrasound-guided technique for axillary brachial plexus nerve block in rabbits. *Lab Anim (NY).* 2015;44(5):179–84.
144. Royal JM, Settle TL, Bodo M, Lombardini E, Kent ML, Upp J, et al. Assessment of postoperative analgesia after application of ultrasound-guided regional anesthesia for surgery in a swine femoral fracture model. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2013;52(3):265–76.
145. Adami C, Bergadano A, Bruckmaier RM, Stoffel MH, Doherr MG, Spadavecchia C. Sciatic-femoral nerve block with bupivacaine in goats undergoing elective stifle arthrotomy. *Vet J.* 2011;188(1):53–7.
146. Estebe JP, Le Corre P, Chevanne F, Cathelineau G, Le Verge R, Ecoffey C. Motor blockade by brachial plexus block in the sheep. *Anesthesiology.* 2000;93(1):291–3.
147. Wagner AE, Mama KR, Ruehlman DL, Pelkey S, Turner AS. Evaluation of effects of sciatic and femoral nerve blocks in sheep undergoing stifle surgery. *Lab Anim (NY).* 2011 Apr;40(4):114–8.

148. Waag S, Stoffel MH, Spadavecchia C, Eichenberger U, Rohrbach H. Ultrasound-guided block of sciatic and femoral nerves: an anatomical study. *Lab Anim.* 2014;48(2):97–104.
149. Compoy L. Fundamentals of Regional Anesthesia using nerve stimulation. Gleed RD LJ, editor. NY: Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Companion Animals; 2005.
150. Echeverry DF, Gil F, Laredo F, Ayala MD, Belda E, Soler M, et al. Ultrasound-guided block of the sciatic and femoral nerves in dogs: A descriptive study. *Vet J.* 2010;186(2):210–5.
151. Marhofer P, Greher M, Kapral S. Ultrasound guidance in regional anaesthesia. *Br J Anaesth.* 2005;94(1):7–17.
152. Liu SS, Ngeow JE, Yadeau JT. Ultrasound-guided regional anesthesia and analgesia: a qualitative systematic review. *Reg Anesth Pain Med.* 2009;34(1):47–59.
153. Sites BD, Brull R. Ultrasound guidance in peripheral regional anesthesia: philosophy, evidence-based medicine, and techniques. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2006;19(6):630–9.
154. Getty R, Sisson S, Grossman JD. Anatomía de los animales domésticos. 5a ed. Masson; 1985.
155. Dyce KM, Sack WO. Anatomía Veterinaria. 4a ed. Manual Moderno; 2012.
156. Popesko P. Atlas de Anatomía Topográfica de Los Animales Domésticos. Tomo III. 2ª edición. Masson; 1998.
157. Capdevila X, Barthelet Y, Biboulet P, Ryckwaert Y, Rubenovitch J, D’Athis F. Effects of perioperative analgesic technique on the surgical outcome and duration of rehabilitation after major knee surgery. *Anesthesiology.* 1999;91(1):8–15.
158. Grossi P, Allegri M. Continuous peripheral nerve blocks: state of the art. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2005;18(5):522–6.
159. Flecknell P. Laboratory Animal Anaesthesia. 3rd ed. Academic Press; 2009.
160. Molony V, Kent J, McKendrick I. Validation of a method for assessment of an acute pain in lambs. *Appl Anim Behav Sci.* 2002;76(3):215–38.
161. Guedes AGP, Pluhar GE, Daubs BM, Rudé EP. Effects of preoperative epidural administration of racemic ketamine for analgesia in sheep undergoing surgery. *Am J Vet Res.* 2006;67(2):222–9.
162. Welsh EM, Gettinby G, Nolan AM. Comparison of a visual analogue scale and a numerical rating scale for assessment of lameness, using sheep as a model. *Am J Vet Res.* 1993;54(6):976–83.
163. Consortium. Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and teaching. Federation of Animal Science Societies, Champaign, IL. 1999.

164. Pillot MH, Gautrais J, Arrufat P, Couzin ID, Bon R, Deneubourg JL. Scalable rules for coherent group motion in a gregarious vertebrate. *PLoS One*. 2011;6(1):11–6.
165. Michelena P, Henric K, Angibault J-M, Gautrais J, Lapeyronie P, Porter RH, et al. An experimental study of social attraction and spacing between the sexes in sheep. *J Exp Biol*. 2005;208(Pt 23):4419–26.
166. Hauschildt V, Gerken M. Individual gregariousness predicts behavioural synchronization in a foraging herbivore , the sheep (*Ovis aries*). *Behav Processes*. Elsevier B.V.; 2015;113:110–2.
167. Animals C on P and D in L, Institute of Laboratory Animal Resources C, on Life Sciences NRC. Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals. Washington, D.C.: NATIONAL ACADEMY PRESS; 1992.
168. Soma LR. Assessment of animal pain in experimental animals. *Lab Anim Sci*. 1987 Jan;37 Spec No:71–4.
  
169. Flecknell P. Analgesia from a veterinary perspective. *Br J Anaesth*. 2008 Jul;101(1):121–4.
170. Rawal N. Current issues in postoperative pain management. *Eur J Anaesthesiol*. 2015.
171. Pavlin DJ, Chen C, Penaloza DA, Polissar NL, Buckley FP. Pain as a factor complicating recovery and discharge after ambulatory surgery. *Anesth Analg*. 2002 Sep;95(3):627–34, table of contents.
172. Ip HYV, Abrishami A, Peng PWH, Wong J, Chung F. Predictors of postoperative pain and analgesic consumption: a qualitative systematic review. *Anesthesiology*. 2009 Sep;111(3):657–77.
173. Abrahams MS, Aziz MF, Fu RF, Horn J-L. Ultrasound guidance compared with electrical neurostimulation for peripheral nerve block: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Anaesth*. 2009 Mar;102(3):408–17.
174. Re M, Blanco-Murcia J, Villaescusa Fernández A, De Gaspar Simón I, Gómez de Segura IA. Ultrasound-guided anaesthetic blockade of the pelvic limb in calves. *Vet J*. 2014 Jun;200(3):434–9.
175. Wilson SH, Auroux A-SM, Eloy JD, Merman RB, Chelly JE. Ropivacaine 0.1% versus 0.2% for continuous lumbar plexus nerve block infusions following total hip arthroplasty: a randomized, double blinded study. *Pain Med*. 2014 Mar;15(3):465–72.
176. Bateson P. Assessment of pain in animals. *Anim Behav*. 1991;42:827–39.
177. Montgomery CA. Oncologic and toxicologic research: alleviation and control of pain and distress in laboratory animals. *Cancer Bull*. 1990;42(4):230–7.
178. Hansen BD. Assessment of pain in dogs: veterinary clinical studies. *ILAR J*. 2003;44(3):197–205.



**ANEXOS**



## Anexo I – Registro bloqueo nervioso periférico (Respuesta sensitiva)

### ANESTESIA REGIONAL - BLOQUEO NERVIOS CIÁTICO Y FEMORAL



ESTUDIO / CEEA: Critical Size Defect - CEEA

ID ANIMAL :                      PESO (KG):                      FECHA:

Hora sedación:

Bloqueo nervio ciático

Bloqueo nervio femoral

Sonda:

Sonda:

Aguja:

Aguja:

Hora inicio técnica:

Hora inicio técnica:

Hora final técnica:

Hora final técnica:

Fármaco (concentración y volumen):

Fármaco (concentración y volumen):

Anestesista:

Anestesista:

HORA					
FASE					
RESPUESTA MOTORA PATA BLOQUEO					
RESPUESTA MOTORA PATA CONTRALATERAL					
INCIDENCIAS					
OBSERVACIONES					

(-) RESPUESTA NEGATIVA - SIN RESPUESTA AL ESTIMULO

(+) RESPUESTA POSITIVA - CON RESPUESTA AL ESTIMULO

**Anexo I – Registro bloqueo nervioso periférico**  
(Respuesta motora)

RESPUESTA SENSITIVA

ID ANIMAL :

HORA					
FASE					
RESPUESTA SENSITIVA PATA BLOQUEO					
RESPUESTA SENSITIVA PATA CONTRALATERAL					
Observación respuesta estímulo 1. Cara lateral 2. Cara medial	1				
					
	2				
ASPECTO GENERAL DEL ANIMAL					
INCIDENCIAS					
OBSERVACIONES					

(-) RESPUESTA NEGATIVA - SIN RESPUESTA AL ESTIMULO

(+) RESPUESTA POSITIVA - CON RESPUESTA AL ESTIMULO

**Anexo II – Fichas de anestesia**  
(Parte I)

Estudio / CEEA: Critical Size Defect

Grupo:

Fecha:

Identificación animal:

Peso:

Hora inicio preparación cirugía:

Hora inicio cirugía (piel):

Hora final cirugía:

Cirujanos:

Circulantes:

Premedicación (hora y fármacos):

Inducción (hora y fármacos):

Hora mantenimiento:

Tubo endotraqueal:

Muestra de sangre:

Anestesista:

Realización técnica del bloqueo:

Tetraciclina 20mg/kg:

Antibiótico (Cefazolina - IV):

Antibiótico (Duphamox - IM):

Analgesia (Rimadyl / Nolotil / Morfina):

Analgesia (parche fentanilo):

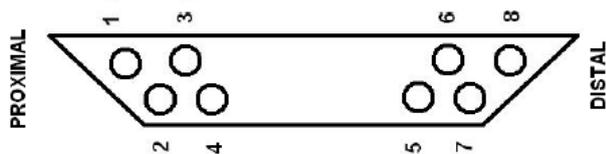
Final ventilación mecánica:

Extubación:

Postoperatorio corralina:



**SISTEMA FIJACIÓN**



**MEDIDA TORNILLOS UTILIZADOS**

- |    |    |
|----|----|
| 1. | 5. |
| 2. | 6. |
| 3. | 7. |
| 4. | 8. |

OBSERVACIONES / INCIDENCIAS:

**Anexo II – Fichas de anestesia**  
(Parte II)

Estudio / CEEA: Critical Size Defect

Grupo: Control / MSC-AL / MSC-AU



Fecha:

Identificación animal:

Fases										FASES
Información adicional										1. Basal
HORA / ANESTESIA										2. Inicio cirugía (piel)
ET ISO										3. Exposición tibia y retirada periostio
FI ISO										4. Brocado
FI O2										5. Levantar placa para osteotomía
Bolus Propofol (ml)										6. Fijación placa
FC										7. Aplicación producto
PAI (PAS/PAD/ PAM)										8. Cierre por planos
Sa O2										9. Vendaje solo con algodón
ET CO2										10. Rx control - final
Temperatura (°C)										11. Vendaje final
Fluidoterapia (ml/h)										
VTE/ VT/ PEEP										
FR										

## Anexo II – Fichas de anestesia (Parte III)

Postoperatorio medicamentos

## SEGUIMIENTO POSTOPERATORIO INMEDIATO OVEJA



Estudio / CEEA :

ID ANIMAL:

FECHA:

POSTOPERATORIO QUIRÓFANO (después extubación)

Hora que el animal aguanta la cabeza:

Hora que el animal intenta levantarse (comentario: tranquilo / agitado):

Comentarios:

POSTOPERATORIO CORRALINA

Hora que el animal se pone de pie:

Apoyo de la pata intervenida:

Hora que muestra interés por la comida:

Hora que muestra interés por el agua:

Comentarios:

	Jueves (tarde)	Viernes (mañana)	Viernes (tarde)	Sábado (mañana)	Sábado (tarde)	Domingo
FECHA / RESPONSABLE	DÍA:	DÍA:	DÍA:	DÍA:	DÍA:	DÍA:
ANALGESIA						
ANTIBIOTICO						
TEMPERATURA CORPORAL (°C)						
OBSERVACIÓN						

## Anexo III – Registro control de peso corporal

I  
ESTUDIO / CEEA:

IDENTIFICACIÓN ANIMAL:  
FECHA ENTRADA ANIMAL:

FECHA CONFIRMACIÓN CIERRE FISIARIO - CONTROL RADIOGRAFICO / COMENTARIOS:  
FECHA CONFIRMACIÓN NO GESTACIÓN - CONTROL ECOGRAFICO / COMENTARIOS:



CONTROL DEL PESO - en los días: entrada del animal, aclimatación del yeso, cirugía, después cada martes y viernes.

FECHA / RESPONSABLE							
PESO							
OBSERVACIÓN							

FECHA / RESPONSABLE							
PESO							
OBSERVACIÓN							

FECHA / RESPONSABLE							
PESO							
OBSERVACIÓN							

FECHA / RESPONSABLE							
PESO							
OBSERVACIÓN							

FECHA / RESPONSABLE							
PESO							
OBSERVACIÓN							