

TESIS DOCTORAL

**Osteogénesis por distracción con
mantenimiento de la actividad
motriz:**

**Estudio histológico de la estructura
del callo y el *Docking Site***



ESCUELA SUPERIOR DE INGENIEROS

Esperanza Macarena López Pliego

Sevilla 2015

Hermann Hesse dijo:

“Para que pueda surgir lo posible es preciso intentar una y otra vez lo imposible”

Esta tesis está dedicada a todos aquellos que me empujaron a intentarlo

“Lo importante en Ciencia no es tanto obtener nuevos hechos como descubrir nuevas formas de pensar en ellos” (William Laurence Bragg)

ESCUELA DE INGENIEROS
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



JAIME DOMÍNGUEZ ABASCAL, CATEDRÁTICO DE INGENIERIA POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, MARIA ESTHER REINA ROMO, DOCTORA EN INGENIERÍA DE LA ESCUELA SUPERIOR DE INGENIEROS DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y MIGUEL ÁNGEL GIRÁLDEZ SÁNCHEZ DOCTOR EN MEDICINA

DECLARAN:

Que la presente tesis, titulada **“OSTEOGÉNESIS POR DISTRACCIÓN CON MANTENIMIENTO DE LA ACTIVIDAD MOTRIZ: ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA ESTRUCTURA DEL CALLO Y EL *DOCKING SITE*”**, ha sido elaborada por **ESPERANZA MACARENA LÓPEZ PLIEGO** bajo su dirección. Asimismo, dicha tesis reúne todos los requisitos pertinentes para su presentación y lectura, a fin de optar al grado de DOCTOR por la Universidad de Sevilla.

Para que así conste, firmamos el presente en Sevilla a 15 de Octubre de 2015.

Dr. Jaime Domínguez Abascal

Dra. M^a Esther Reina Romo

Dr. Miguel Ángel Giráldez Sánchez

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	ii
INTRODUCCIÓN	2
1. Introducción	2
2. Tejidos conectivos	2
2.1 Tejido óseo	2
2.1.1. Composición y funciones	2
2.1.2. Anatomía y estructura del hueso	6
2.2 Tejido cartilaginoso. Tipos de cartílago. El cartílago de crecimiento	9
2.3 Tejido conectivo denso o fibroso	12
3. Proceso de osificación. Osteogénesis y remodelación	15
4. Estudio histológico del tejido óseo	20
5. Fisiología del callo de fractura/distracción	25
6. Defectos óseos segmentarios	31
6.1 Definición	31
6.2 Opciones terapéuticas	32
6.2.1 Injertos vascularizados	33
6.2.2 Pseudomembranas bioactivas: Técnica de Masquelet y de la malla cilíndrica	34
6.2.3 Osteogénesis por distracción	35
7. Estado del arte de la distracción ósea	37
7.1 Evolución de la técnica quirúrgica de la osteogénesis por distracción	37
7.2 Evolución de la experimentación en la osteogénesis por distracción	49
Callo de distracción	49
Docking Site	54
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	58
1. Hipótesis	58
2. Objetivos	58

2.1 Objetivo General _____	58
2.2 Objetivos específicos _____	58
MATERIAL _____	60
1. Sujetos del estudio _____	60
2. Modelo y diseño del distractor óseo _____	61
3. Útil guía del sistema de corte _____	63
4. Útil director de pines y agujas _____	63
DISEÑO Y METODOLOGÍA _____	67
1. Contexto de la investigación _____	67
2. Desarrollo del procedimiento quirúrgico _____	67
3. Protocolo de ensayo _____	68
4. Preparación y adiestramiento de los animales _____	68
5. Protocolo operatorio _____	69
5.1 Proceso anestésico y colocación del animal _____	69
5.2 Marcaje de la vía de abordaje, niveles de las osteotomías y apertura de la herida _____	70
5.3 Colocación de la pata en el útil guía de pines _____	72
5.4 Procedimiento de inserción de los pines y agujas _____	73
5.5 Montaje del distractor _____	76
5.6 Fase de latencia _____	79
5.7 Fase de transporte _____	80
5.8 Fase de consolidación _____	80
5.9 Fase de remodelación _____	80
5.10 Sacrificio de los animales _____	81
5.12 Pruebas de imagen _____	82
5.13 Estudios anatomopatológicos _____	82
5.13.1 Procesamiento macroscópico _____	83
5.13.2 Estudio histopatológico _____	87
5.13.3 Estudio inmunohistoquímico _____	89
5.13.4 Desarrollo del Estudio histomorfométrico _____	93

5.14 Variables del estudio	98
RESULTADOS	101
1. Callo de transporte	101
1.1 Pruebas de Imagen	101
Estudios Radiográficos	101
Tomografía Axial Computarizada (TAC)	104
1.2 Estudio histomorfométrico	105
Descripción macroscópica de las piezas	105
Contajes tisulares	106
Estudio al microscopio óptico	108
1.3 Estudios inmunohistoquímicos	116
Colágenos tipo I y II	116
Anti Factor VIII	117
2. Docking Site	118
2.1 Pruebas de imagen	118
Estudios radiográficos	118
Tomografía Axial Computarizada (TAC)	119
2.2 Estudio histomorfométrico	120
Descripción macroscópica de las piezas	120
Contajes tisulares	121
Estudio al microscopio óptico	123
2.3 Estudios inmunohistoquímicos	124
Colágenos tipo I y II	124
Anti Factor VIII	125
DISCUSIÓN	128
1. Callo de transporte	129
1.1 Estudio histomorfométrico	129
Contajes tisulares	129
Tipos de osificación	132
Contajes celulares y estudio de las trabéculas óseas	136
1.2 Estudios inmunohistoquímicos	138

Colágenos I y II	138
Anti-factor VIII	140
2. Docking Site	143
2.1 Estudio histomorfométrico	143
Contajes tisulares	143
Tipos de Osificación	145
2.2 Estudios inmunohistoquímicos	147
Colágenos I y II	147
Anti-factor VIII	148
3. Limitaciones	149
CONCLUSIONES	152
BIBLIOGRAFÍA	154

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis, Jaime, Esther y Miguel por sus consejos, su disponibilidad, su apoyo y su inagotable paciencia, sin la cual hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

Al Ingeniero Juan Mora, por ser mi compañero de batallas durante estos cuatro años y medio, llegando a ser mi amigo. Por compartir mis dudas e inquietudes, y por incontables horas de carretera y madrugones. Gracias por permitirme trabajar contigo y mostrarme no solo tu calidad profesional, sino personal.

A todo el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de Córdoba, especialmente a los Profesores Juan Morgaz Rodríguez y Juan Manuel Domínguez Pérez. Gracias por adaptaros a todas las propuestas hechas, recibirme siempre con una sonrisa y aconsejarme cada vez que lo necesitaba. Sin vosotros todo hubiera sido más difícil.

Al Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Facultad de Veterinaria de Córdoba por su colaboración en este proyecto. Así mismo, a los Dres. José Pérez y Rafael Zafra, por su ayuda, comprensión y apoyo. Gracias por responder a todas mis dudas y peticiones independientemente de fechas y horarios.

A la Escuela Superior de Ingenieros de Sevilla, por poner a nuestra disposición sus instalaciones en todo momento.

A Andrés y Pilar, por su apoyo incondicional, ofreciéndose a ayudar en todo lo posible, aunque fuera solo escuchándome cuando lo necesitaba.

A mi amigo y compañero Raúl Moreno, por sacrificar su tiempo libre para que yo dispusiera de él a lo largo de incontables guardias en el hospital. Sin tu ayuda nunca hubiera terminado.

A mis padres, por soportar mil quejas y llantos estos cuatro años y medio. Espero un día poder devolveros todo lo que me habéis dado.

A Manuel Almagro, por su comprensión, insistiéndome en continuar incluso en los momentos más difíciles. Gracias por creer en mí.

Y por último, al Dr. Miguel Ángel Giráldez Sánchez. Hace casi cinco años me metiste en este lio, y aunque a veces he querido matarte por ello, siempre me aconsejaste bien y me mostraste el mejor camino a seguir. Gracias por ser mi guía. Por detenerme cuando debías y por empujarme cuando tenía miedo de seguir adelante. Gracias por ser mi amigo. Nadie podría haberlo hecho mejor.

A todos, muchísimas gracias.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

La osteogénesis por distracción o distracción ósea consiste en la generación de hueso endógeno a través de la expansión esquelética, así como de las partes blandas circundantes, lo cual permite salvar defectos óseos de cuantía variable. El nuevo hueso se regenera entre dos extremos óseos, los cuales se separan gradual y lentamente tras la realización de una osteotomía. Incluye procedimientos como los alargamientos óseos, la distracción fisaria y el transporte óseo.

Éste último consiste en la movilización longitudinal y progresiva de un segmento libre de hueso vivo, ocupando la zona de pérdida de sustancia ósea con nuevo hueso que se formará de manera continua mientras dure dicha movilización, y que por tanto estará constituido de distintos tipos de tejidos en diferentes fases de desarrollo en función del momento de estudio.

A lo largo de este capítulo se expondrán los distintos constituyentes del tejido regenerado durante la distracción (óseo, conectivo y cartilaginoso), así como el papel que juega cada uno en las distintas fases de formación, sus métodos de estudio y su evolución histórica, desde su descubrimiento a la actualidad.

2. Tejidos conectivos

2.1 Tejido óseo

2.1.1. Composición y funciones

Los huesos, junto con el cartílago, forman el aparato óseo o esqueleto. En el organismo existen 206 huesos, los cuales están formados por un tejido conjuntivo con gran actividad y dinamismo, en el que coexisten distintos tipos celulares diferenciados funcionalmente.

Las principales funciones del esqueleto son⁽¹⁾:

- Función protectora de órganos y sistemas.

- Función mecánica y de sostén (huesos de las extremidades inferiores, pelvis y columna vertebral).
- Función dinámica, actuando como puntos de apoyo sobre los que traccionan los elementos músculo-tendinosos.
- Función de almacenamiento de minerales, actuando como reguladores de la calcemia.
- Función hematopoyética (continente de la médula ósea).
- Función reguladora de la respuesta inmune.

Los huesos constituyen verdaderos órganos, experimentando cambios tisulares continuos, y un proceso de formación y destrucción constante, conocido como “remodelación ósea”.

El tejido fundamental del hueso es el tejido óseo, consistente en un tejido conjuntivo con una particular dureza debido a que en su seno se produce un proceso de mineralización. Contiene elementos celulares y un componente extracelular, o matriz, que a su vez, se divide en una fracción orgánica y otra mineral^(2,3).

- ***Fracción orgánica***

La fracción orgánica corresponde al 30% del peso del hueso seco, y en ella quedan integrados los elementos celulares (2%) y la sustancia intercelular (98%).

Entre los tipos celulares se establecen⁽¹⁻⁶⁾:

- *Células osteoprogenitoras*, que derivan de las células madre mesenquimáticas de la médula ósea y tienen potencial de diferenciación a tipos celulares diferentes (adipocitos, fibroblastos, osteoblastos, condrocitos y células musculares). El factor fundamental que desencadena la diferenciación de las células osteoprogenitoras es el factor fijador central alfa 1 (CBFA1). Estas células se hallan en las superficies externa e interna de los huesos, y en los vasos que irrigan el tejido óseo. Estas células comprenden (1) las células periósticas que forman la capa más interna del periostio y (2) las células endósticas que tapizan las cavidades medulares, los conductos de Havers y los de Volkman.

Son aplanadas y con núcleo alargado. Su estimulación las transforma en una célula secretora más activa, el osteoblasto.

- *Osteoblastos*, o células formadoras de hueso. Se originan de una célula madre mesenquimal bajo la influencia de factores de crecimiento. Esta célula se conoce como preosteoblasto, y se localiza en las superficies perióstica y endóstica del hueso. También pueden derivar de la línea estromal del sistema reticuloendotelial. Secreta tanto colágeno tipo I (que supone el 90% de las proteínas óseas) como proteínas de la matriz ósea, que constituyen la matriz no mineralizada inicial, llamada osteoide. El osteoblasto también tiene a su cargo la calcificación de la matriz, proceso que inicia mediante la secreción de las vesículas matriciales, que tienen gran contenido en fosfatasa alcalina. Son células voluminosas, con núcleo grande y muy activas, que se sitúan sobre la superficie del hueso que van formando. Su aspecto es piriforme o rectangular con su eje mayor en disposición perpendicular a la sustancia osteoide que producen, y su distribución monoestratificada en la superficie donde se está formando tejido óseo. Presentan prolongaciones que están comunicadas con las de otros osteoblastos y con las de los osteocitos por medio de nexos. En contraste con los osteoblastos secretores que se ven donde hay depósito activo de matriz, los inactivos son células aplanadas o adelgazadas que revisten la superficie ósea. Los osteoblastos responden a estímulos mecánicos para mediar los cambios en el crecimiento y el remodelado de los huesos. A medida que se deposita la matriz osteoide, el osteoblasto va quedando rodeado por ella. Cuando termina, queda incluido por completo en el osteoide y se convierte en osteocito.
- *Células de revestimiento óseo*. Derivan de los osteoblastos y tapizan el tejido óseo que no se está remodelando. Son células aplanadas. Las que tapizan las superficies externas del hueso se denominan células periósticas y las que tapizan la interna, células endósticas. También se cree que intervienen en el mantenimiento y nutrición de los osteocitos incluidos en la matriz ósea, al presentar prolongaciones que se extienden dentro de los canalículos de la matriz ósea contigua y comunicarse con los osteocitos.
- *Osteoclastos*, encargados de la resorción ósea, que guarda el equilibrio con la formación ósea que llevan a cabo los osteoblastos. Derivan del mismo precursor hematopoyético que monocitos y macrófagos, tras la fusión de células

hematopoyéticas mononucleares bajo el efecto de citoquinas múltiples (TNF, IL, factor estimulante de colonias de monocitos, etc.). Son células muy voluminosas, con abundantes núcleos (3-20) y morfología redondeada, y protoplasma rico en fosfatasa ácida. Los osteoclastos de formación reciente sufren un proceso de activación para convertirse en células capaces de llevar a cabo la resorción ósea. Se sitúan a lo largo del tejido óseo que van a destruir, horadando cavidades en él que reciben el nombre de lagunas de Howship. La superficie del osteoclasto que queda enfrentada a estas cavidades presenta un borde erizado, denominado ribete en cepillo. Dicho ribete traduce la actividad de la célula, y su función es la de ampliar la superficie de contacto con el hueso a destruir por medio de microvellosidades a través de las cuales se produce la exocitosis de enzimas líticas y protones. Intervienen en la homeostasis de la calcemia, y su función está regulada por muchos factores, sobre todo hormonales. Cuando el osteoclasto completa su función, desaparece por apoptosis.

- *Osteocitos*, son las células maduras del tejido óseo y derivan de los osteoblastos, por transformación de aquellos que quedan incluidos en la matriz calcificada tras el proceso de mineralización, y que es responsable de mantener la matriz ósea. El 90% de las células del hueso maduro son osteocitos, pero solo el 15% de los osteoblastos se transformarán en ellos. Una de sus funciones es la mecanotransducción, en la cual la célula responde a fuerzas mecánicas aplicadas al hueso. Los osteocitos pueden sintetizar matriz nueva y también reabsorberla, al menos en un grado limitado. Estos procesos contribuyen en un grado importante a la homeostasis del calcio en sangre. Son aracneiformes, y lanzan prolongaciones que los mantienen en contacto por medio de “nexos” con los osteocitos vecinos, células de revestimiento y osteoblastos. Ocupan cavidades que les sirven de lecho, y que se denominan “osteoplastos” o “conductos calcóforos”. Cuando el hueso se necrosa, estas células desaparecen y dichas lagunas aparecen vacías. La muerte de los osteocitos por traumatismo, envejecimiento celular o apoptosis da como resultado la resorción ósea.

El componente intercelular constituye el 95% de la fracción orgánica. En su mayor parte está constituido por colágeno dispuesto en forma de fibras y por un 5-10% de proteínas no colágenas. Es la estructura proteica más importante del hueso, y se corresponde con colágeno tipo I en forma de triple hélice. Proporcionan al hueso una gran resistencia a la tracción.

Entre las proteínas no colágenas destacan la osteocalcina (que puede utilizarse como marcador de la actividad osteoblástica) y los “factores de crecimiento” (1% del total de proteínas no colágenas), que actúan como reguladores del metabolismo de las células óseas. Se desconoce el número de factores de crecimiento que actúan sobre cada una de las fases de la osificación, pero se han encontrado múltiples aplicaciones clínicas de los mismos en la actualidad, como aceleración de la consolidación o como tratamiento de la pseudoartrosis.

- ***Fracción inorgánica***

Representa el 70% del peso seco, y va desarrollándose como consecuencia del proceso de mineralización de la matriz. En los osteoblastos se concentra calcio y fósforo, que precipita en su interior, y lo eliminan para formar sales óseas y empezar así la formación de cristales. La mayor parte del componente mineral es similar al mineral natural hidroxiapatita. Se dispone en forma de cristales, y están compuestos por fosfato tricálcico en un 80%, un 10% de carbonato cálcico y numerosas impurezas. Estos cristales se disponen orientados en la misma dirección que las fibras colágenas. La unión del colágeno con la hidroxiapatita es la que confiere al hueso sus propiedades mecánicas, resultando altamente resistente.

2.1.2. Anatomía y estructura del hueso

En los huesos largos (fémur, tibia, etc.) se distinguen dos extremos o epífisis una parte central o diáfisis, y una zona entre los dos segmentos anteriores conocida como metáfisis^(2, 4-7). Su interior está constituido por la cavidad medular ocupada por la médula ósea o hematopoyética.

Envolviendo al hueso aparece una capa de tejido conectivo, el periostio, que se encuentra sobre la superficie externa de la cortical, anclándose a la misma mediante las

fibras de Sharpey. En él se distinguen dos capas: una externa, rica en fibro-colágenos y de escasa actividad, y una interna, en contacto directo con la cortical, rica en osteoblastos y muy activa, que se denomina cambium (muy desarrollada en huesos jóvenes). Su grosor y adherencia al hueso va disminuyendo desde los primeros años de vida hasta la edad adulta. Tiene un importante papel en el proceso de consolidación y distracción osteogénica^(8, 9), y reacciona de forma muy marcada en la infancia ante cualquier agresión (tumoral, infecciosa, etc.), y en menor grado durante la madurez.

La superficie interna cortical está tapizada por el endostio, que es más delgado y menos activo que el periostio. Reviste todas las superficies internas, incluyendo los espacios medulares y conductos vasculares, albergando células osteogénicas. Se continúa con la capa interna del periostio en los orificios de desembocadura de los vasos que perforan al hueso.

En cuanto a la vascularización, en los huesos hay que distinguir un sistema aferente o arterial, y otro eferente o de drenaje venoso. En los huesos largos se pueden diferenciar 4 vías en el sistema arterial: (1) sistema principal o nutricio, (2) perióstico, (3) metafisario y (4) epifisario. También existe una red a nivel del endostio de menor entidad. Las arterias periósticas riegan una tercera parte de la cortical, proviniendo el riego de los dos tercios restantes de ramas de las arterias ascendentes y descendentes del sistema principal, que terminan contactando con las anteriores. El sistema metafisario proviene de las arterias musculares vecinas y de las anastomosis vasculares de las articulaciones adyacentes. El sistema epifisario conduce sangre desde los sistemas arteriales periarticulares.

En la estructura macroscópica del hueso, se distinguen una zona más dura, compacta y superficial, que corresponde a la llamada cortical, y otra más interna, que se denomina esponjosa o trabecular (Fig.1). La función cortical es básicamente mecánica y la esponjosa, tanto metabólica como mecánica.

La cortical está compuesta por una serie de láminas óseas dispuestas de manera concéntrica^(2, 4-6). Cada uno de estos sistemas se denomina osteona o sistema haversiano, siendo la unidad funcional fundamental del hueso. En el centro de cada osteona se dispone el conducto de Havers, por el que discurren vasos y nervios y se une a los conductos vecinos mediante los canales de Volkman. Entre las osteonas se disponen

sistemas laminares intersticiales y rodeando por fuera a todas las osteonas se sitúan las láminas circunferenciales externas. Sobre las láminas de los sistemas osteónicos se disponen los osteocitos. Dicho hueso cortical constituye el 80% del esqueleto adulto.

El hueso esponjoso está formado por trabéculas óseas, que se disponen formando una red tridimensional en forma de malla^(2, 4-6). Se observa principalmente en las regiones metafiso-epifisarias de los huesos largos, en el interior de los cortos y en los cuerpos vertebrales. En los espacios entre las trabéculas se dispone médula ósea y grasa en distintas proporciones en función de la edad. El hueso esponjoso tiene un área de superficie 20 veces mayor por unidad de volumen que el cortical, una actividad 8 veces superior que la de este último, y responde con más rapidez que el cortical a los cambios provocados por las cargas mecánicas.

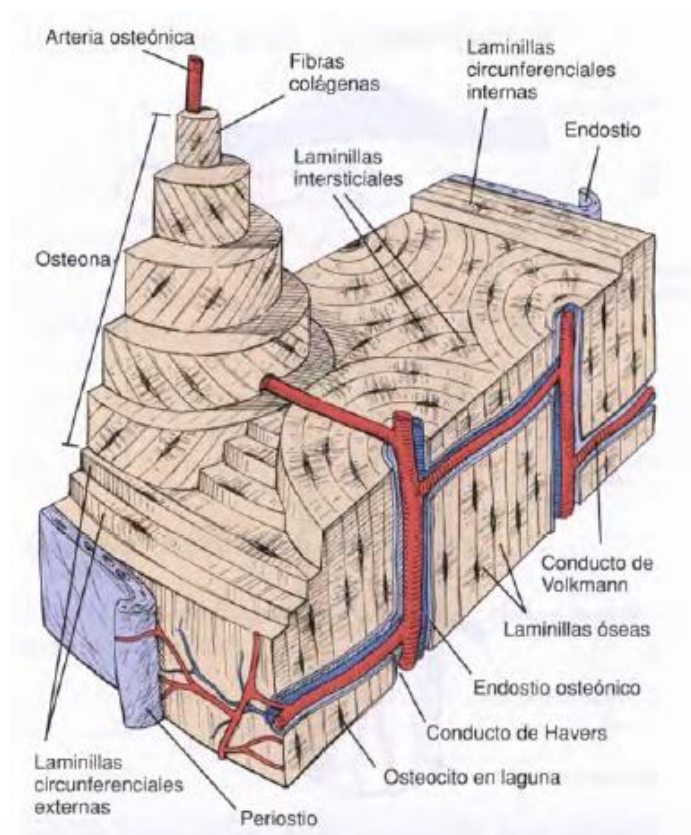


Fig.1: Diagrama tridimensional de la estructura de un bloque de hueso compacto extraído de la diáfisis de un hueso largo ⁽⁴⁾.

Desde el punto de vista microscópico se diferencian el hueso inmaduro o *Woven Bone* y el hueso maduro o laminar.

El *Woven Bone* aparece cuando los osteoblastos producen matriz osteoide muy rápidamente, como durante la vida fetal o en el caso de la vida adulta, durante la reparación de las fracturas. Se caracteriza porque las fibras de colágeno que lo forman no se encuentran orientadas siguiendo una dirección concreta. Es más flexible que el hueso maduro, presenta mayor cantidad de osteocitos por unidad de volumen y el índice de recambio celular es mayor que en el hueso maduro.

El hueso maduro aparece como resultado de la remodelación del *Woven Bone*. Es más fuerte que éste y las fibras de colágeno que lo constituyen aparecen orientadas siguiendo ejes de fuerza.

2.2 Tejido cartilaginoso. Tipos de cartílago. El cartílago de crecimiento

Los extremos epifisarios de los huesos se encuentran tapizados de tejido cartilaginoso. Se distinguen 3 tipos de este tejido, dependiendo de su composición, y con distintas localizaciones^(2, 4, 6, 7):

- *Cartílago hialino*, característico por presentar una matriz amorfa homogénea. En toda la matriz hay espacios llamados lagunas o condroplastos, que contienen a las células cartilaginosas o condrocitos. Entre sus funciones, encontramos la de proveer una superficie de fricción baja, participa en la lubricación de las articulaciones sinoviales y distribuye las fuerzas aplicadas al hueso subyacente. La matriz del cartílago hialino es producida por los condrocitos y contiene tres tipos fundamentales de moléculas: (1) Colágeno, sobre todo tipo II, y en menor cuantía, tipo IX, XI, X y VI, (2) Proteoglicanos (hialurano, condroitín sulfato y queratán sulfato) y (3) Glucoproteínas no colágenas o multiadhesivas. La matriz del cartílago hialino está muy hidratada, lo que contribuye a la capacidad del cartílago para soportar pesos. El remodelado de la misma actúa como transductor de señales para que los condrocitos incluidos en ella dirijan su actividad sintética a los tipos adecuados de moléculas nuevas. Los condrocitos son las células especializadas que mantienen y producen la matriz extracelular. Pueden aparecer solos o en cúmulos llamados grupos isogénicos, lo cual indica que acaban de dividirse. Conforme sintetizan matriz, se van rodeando de la misma y se dispersan. Son células grandes, con citoplasma de aspecto variable

según el grado de actividad de la célula. Además, el cartílago hialino forma el molde para el esqueleto en desarrollo del feto. Rodeando al cartílago hialino encontramos un tejido conjuntivo adherido con firmeza, el pericondrio, compuesto por células que no se distinguen de los fibroblastos y que funciona como fuente de células cartilaginosas. Cuando está activo, se presenta dividido en una capa interna activa celular y una externa fibrosa. El cartílago hialino de las superficies articulares no tiene pericondrio. Cuando el cartílago hialino se calcifica es reemplazado por tejido óseo. Al calcificarse la matriz los condrocitos no pueden realizar el intercambio de sustancias y terminan muriendo, sustituyéndose el cartílago entonces por tejido óseo. Se da en 3 situaciones bien definidas:

- Calcificación de la porción del cartílago articular en contacto con tejido óseo pero no la superficial.
- Durante la osificación endocondral en el periodo de crecimiento de una persona.
- En el adulto como parte normal del proceso de envejecimiento.

Sin embargo, aún no queda claro que un proceso similar sea el que ocurre durante la osificación en la distracción ósea.

- *Cartílago fibroso*, compuesto por condrocitos y tejido conjuntivo denso, con abundancia de fibras de colágeno tipo I y matriz similar al cartílago hialino. Se localiza en los discos intervertebrales, sínfisis pubiana, meniscos y complejo fibrocartilaginoso triangular de la muñeca.
- *Cartílago elástico*, caracterizado por fibras elásticas y láminas interconectadas de material elástico, además de material de la matriz similar al cartílago hialino. Se localiza en el pabellón auricular, glotis y trompa de Eustaquio.

El cartílago tiene una capacidad limitada de reparación, incluso ante lesiones leves. Esta falta de curación es consecuencia de su avascularidad, de la inmovilidad y de la falta de proliferación de los condrocitos maduros. La reparación suele consistir en generar tejido conjuntivo denso. No obstante, en adultos es habitual que se formen vasos sanguíneos nuevos en el lugar de la lesión durante el proceso de curación, lo que dará lugar al desarrollo de tejido óseo en lugar de una verdadera reparación.

El cartílago de crecimiento o fisis tiene como función intervenir en el crecimiento de los huesos; en el caso de los largos, en longitud. Se sitúa a nivel de los extremos proximal y distal de éstos, actuando de frontera entre epífisis y diáfisis, y mantiene su actividad durante el tiempo que dura el desarrollo de los huesos, por lo que desaparece cuando cesa el crecimiento del esqueleto.

En su estructura se diferencian 5 capas (Fig.2)^(1, 2, 4, 6, 7, 10): (1) la capa germinal o de reserva (que actúa como almacén, y no muestra proliferación celular ni producción activa de matriz), (2) la capa proliferativa (compuesta por condrocitos de mayor tamaño formando columnas paralelas, que sintetizan activamente colágeno), (3) la capa hipertrófica (donde las células aumentan de tamaño y muestran una actividad metabólica importante), (4) la capa de calcificación (donde las células hipertróficas comienzan a degenerarse y la matriz se calcifica; luego el cartílago calcificado sirve como almacén sobre el que se deposita tejido óseo nuevo), y (5) la capa de resorción (donde el cartílago calcificado está en contacto directo con el tejido conjuntivo de la cavidad medular, invadiéndolo junto con vasos sanguíneos de pequeño calibre, ocupando el espacio de los condrocitos agónicos, adquiriendo un aspecto de puntas de lanza en los cortes histológicos longitudinales).

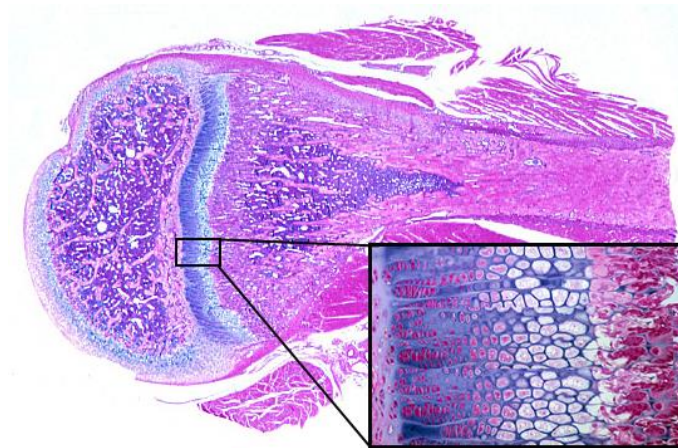


Fig.2: Muestra de cartílago de crecimiento. Se pueden identificar de izquierda a derecha las 5 capas que lo componen: de reserva, proliferación, hipertrófica, calcificación y resorción. Tinción: hematoxilina-eosina, x 80 y x 140 (Extraída el 13/01/2014 de http://medsci.indiana.edu/histo/docs/lab2_8.htm copyright 2006)⁽¹¹⁾.

2.3 Tejido conectivo denso o fibroso

El tejido conjuntivo está compuesto por células y una matriz extracelular que contiene fibras, sustancia fundamental y líquido hístico. Las funciones de los diversos tejidos conjuntivos reflejan los tipos celulares y fibras que contiene, y el carácter de la sustancia fundamental y la matriz extracelular.

Bajo el nombre de tejido conjuntivo se incluye una gran variedad de tejido con propiedades funcionales diferentes, pero con ciertas características comunes que permiten agruparlos⁽⁴⁾. Un ejemplo del mismo sería el tejido óseo, en el cual sus fibras están organizadas con una conformación específica y se calcifican para conseguir la dureza que lo caracteriza.

Dentro de los tejidos conjuntivos del adulto encontramos dos subtipos generales:

- El tejido conjuntivo laxo, también llamado tejido areolar.
- El tejido conjuntivo denso o fibroso, que puede subclasificarse en función de la disposición de sus fibras en tejido conjuntivo denso no modelado y tejido conjuntivo denso modelado.

El tejido conjuntivo denso no modelado o irregular contiene sobre todo fibras colágenas. Las células son escasas y siendo la principal el fibroblasto. También existe una cantidad escasa de sustancia fundamental. Lo habitual es que las fibras estén dispuestas orientadas en diversas direcciones para que resistan las fuerzas tensoras que actúan sobre órganos y estructuras (por ejemplo, los órganos huecos).

El tejido conjuntivo denso modelado o regular es el principal componente de tendones, ligamentos y aponeurosis. Al igual que en el no modelado, las fibras son la característica prominente y hay muy poca sustancia fundamental. Sin embargo, en este caso, las fibras se hayan dispuestas en haces paralelos, minimizando el espacio entre ellas para ofrecer la resistencia máxima. Las células que las mantienen están comprimidas y alineadas entre los haces de fibras.

Las fibras del tejido conjuntivo están presentes en cantidades variables según las necesidades estructurales y la función del tejido donde se ubiquen. Existen 3 tipos, todas producidas por los fibroblastos: fibras colágenas, reticulares y elásticas.

- *Las fibras colágenas* son flexibles y tienen una gran resistencia tensora. Son estructuras onduladas, de espesor variable y longitud indeterminada. Al estudiarlas con la microscopía electrónica de transmisión, aparecen como haces de subunidades filamentosas, llamadas fibrillas colágenas. Dentro de una fibra estas fibrillas tienen un grosor uniforme. Sin embargo, en diferentes sitios y etapas del desarrollo, las fibrillas varían de tamaño. Así, mientras en tejidos inmaduros no suelen medir más de 15-20 nm, en tejidos sometidos a tensión considerable, las fibrillas pueden llegar a medir 300 nm de diámetro. Las fibrillas colágenas, además exhiben un patrón de bandas transversales con una periodicidad de 68 nm, reflejo de su estructura en subunidades y, específicamente del tamaño, la forma y la disposición de las moléculas de colágeno que forman la fibrilla. Las moléculas de colágeno tienen cabeza y cola, que se alinean con las de otras moléculas en hileras que se superponen, con brechas entre las moléculas de cada hilera, y un desfase de un cuarto de molécula entre hileras contiguas. La resistencia de la fibrilla es consecuencia de los enlaces covalentes que hay entre las moléculas de colágeno de hileras y no de las uniones cabeza con cola entre las moléculas de una hilera. Además, cada molécula de colágeno individual está formada por tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas α , cuyo tamaño varía entre 600 y 3000 aminoácidos, y que se enroscan entre sí para formar una triple hélice dextrógira. Existen al menos 42 tipos de cadenas α codificadas por genes diferentes. Según las combinaciones entre ellas, dan lugar a un tipo u otro de colágeno, pudiéndose categorizar hasta la actualidad 27 tipos diferentes.
- *Las fibras reticulares*, que proveen un armazón de sostén para los constituyentes celulares de diversos tejidos y órganos. Están compuestas por colágeno tipo III, y exhiben un patrón de bandas transversales con una periodicidad de 68 nm. Sin embargo, su diámetro es reducido y no se organizan para formar fibras gruesas, sino en redes o mallas, que establecen el límite del tejido epitelial, al igual que rodean adipocitos, vasos sanguíneos de pequeño calibre, nervios y células musculares. Son abundantes sobre todo en las primeras etapas de curación de las heridas y de la formación del tejido cicatricial.
- *Las fibras elásticas* son más delgadas que las de colágeno, y se organizan en un modelo ramificado para formar una red tridimensional. Se entremezclan con

fibras de colágeno para limitar la distensibilidad de los tejidos e impedir el desgarro por estiramiento excesivo.

Rodeando a las células del tejido conjuntivo encontramos la matriz extracelular, la cual contiene las fibras descritas anteriormente y sostiene a las células que lo componen. Además, contiene proteoglicanos, glucoproteínas multiadhesivas y glucosaminoglucanos, constituyentes estos tres de la sustancia fundamental. Cada célula del tejido conjuntivo secreta una proporción diferente de moléculas de la matriz extracelular que contribuyen a la formación de muchas organizaciones estructurales diferentes, consecuencia de la cual, la matriz posee propiedades mecánicas y bioquímicas características específicas del tejido en el que se encuentra.

La matriz extracelular provee sostén mecánico y estructural al tejido, al igual que fuerza tensora, y actúa como barrera bioquímica y ayuda a regular las funciones metabólicas de las células que rodea.

Las células del tejido conjuntivo pueden ser residentes (fijas, se mueven poco) o errantes (libres). Entre las fijas encontramos: fibroblastos, miofibroblastos, macrófagos, adipocitos, mastocitos y células madre mesenquimáticas. Entre la población libre o transitoria, destacan: linfocitos, plasmocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos.

Los fibroblastos tienen a su cargo, como se ha descrito antes, la síntesis de las fibras colágenas, reticulares y elásticas, y de los carbohidratos complejos de la sustancia fundamental. Están constituidos por un núcleo alargado, y su citoplasma consta de largas prolongaciones que por lo general no se ven, en gran medida, porque se confunden con las fibras de colágena.

Los miofibroblastos son alargadas y fusiformes también, y combinan características de fibroblasto con las de las células musculares lisas.

Los macrófagos son células fagocíticas derivadas de los monocitos, que llegan por el torrente sanguíneo al tejido conjuntivo, donde se diferencian a macrófagos. Son difíciles de identificar en las preparaciones, a menos que estén en plena actividad fagocítica.

Los mastocitos se forman en la médula ósea y migran hacia el tejido conectivo, donde desarrollan los gránulos citoplasmáticos que los caracterizan. Son células grandes con núcleo esférico. Sus gránulos no se observan en las preparaciones a menos que se hayan empleado tinciones especiales para conservarlos, y que al liberarlos dan lugar a reacciones de hipersensibilidad inmediata, alergia y anafilaxia.

Los adipocitos funcionan como reservas de grasa y las células madres mesenquimáticas o pericitos se situarán en la periferia de los vasos sanguíneos.

3. Proceso de osificación. Osteogénesis y remodelación

La osificación es el proceso de formación y desarrollo del hueso. Existen dos vías a través de las cuales el hueso establece dicha acción, que se conocen como **osteogénesis intramembranosa** y **osteogénesis endocondral**. La distinción entre ambas radica en si un modelo cartilaginoso sirve como precursor óseo o si el hueso se forma por un método más simple, sin cartílago precursor^(1, 2, 4, 6, 7).

La *osteogénesis intramembranosa* se produce en un grupo de huesos reducido. En ella, una serie de células mesenquimales influenciadas por factores de crecimiento forman un núcleo de condensación en una zona vascularizada de tejido conjuntivo embrionario, diferenciándose en osteoblastos. Esta osificación se realiza, por tanto, mediante producción directa de hueso sobre la “primitiva maqueta” de tejido conectivo. Algunas de las células mesenquimáticas alargadas y pálidas migran dentro del mesénquima laxo y se acumulan en regiones específicas. Esta condensación celular dentro del tejido mesenquimático es la “membrana” en la que se inicia el proceso. Luego las células mesenquimáticas se diferencian en células osteoprogenitoras que expresan el factor de transcripción CBFA1. A medida que el proceso continúa, el tejido recién organizado aumenta su vascularización y las células mesenquimáticas aumentan de tamaño y se redondean. Se diferencian a osteoblastos diferenciados, que secretan los colágenos, las sialoproteínas óseas, la osteocalcina y los componentes de la matriz ósea (osteóide). A causa del abundante tejido colágeno, la matriz se ve más densa que el mesénquima circundante, en cuyo espacio intercelular sólo aparecen delicadas fibras de tejido conjuntivo. Con el tiempo la matriz se calcifica y las prolongaciones citoplasmáticas de conexión entre las células formadoras de hueso, ahora llamadas osteocitos, quedan encerradas dentro de canalículos. Al mismo tiempo, más células

mesenquimáticas circundantes de la membrana proliferan y dan origen a una población de células osteoprogenitoras. Algunas de las células osteoprogenitoras se adosan a las espículas formadas inicialmente y se transforman en osteoblastos, añadiendo más matriz por este mecanismo llamado “crecimiento por aposición”. Las espículas aumentan de tamaño y se unen formando una red trabecular que adquiere la configuración general del hueso en desarrollo. A causa de su actividad mitótica continua las células osteoprogenitoras mantienen su cantidad y así proveen una fuente constante de osteoblastos para el crecimiento de espículas óseas. Los osteoblastos nuevos, a su vez, depositan más matriz con lo que se forma el hueso inmaduro, caracterizado por tener espacios interconectados que contienen tejido conjuntivo y vasos sanguíneos. El tejido óseo así formado es el llamado hueso de membrana o hueso intramembranoso. Un ejemplo típico de este tipo de osificación es la bóveda craneal.

La *osificación endocondral* sin embargo necesita de una fase cartilaginosa previa. Sobre un molde de tejido conectivo, se acumulan las células mesenquimales, y bajo la influencia de factores de crecimiento fibroblásticos (FGF) y BMP diferentes, las células mesenquimáticas expresan colágeno de tipo II inicialmente, y se van diferenciando en precondroblastos y condroblastos, que segregan matriz cartilaginosa. En el caso del ser humano, a partir de la séptima semana de vida embrionaria, se forma un modelo de cartílago hialino con la forma general del futuro hueso. En el centro de la matriz cartilaginosa formada se establecerá un proceso de osificación que constituirá el “centro de osificación primario”. El aumento de espesor del cartílago se debe en su mayor parte a la adición de matriz cartilaginosa producida por los condroblastos nuevos. Las células del pericondrio del modelo cartilaginoso dejan de producir condroblastos y en su lugar se originan osteoblastos, y el pericondrio pasa a llamarse periostio (puede diferenciarse en él una capa osteógena). Como consecuencia de estas modificaciones se forma una delgada capa de tejido óseo alrededor del modelo cartilaginoso. Este tejido puede denominarse hueso perióstico. En el caso de los huesos largos, alrededor del modelo cartilaginoso en la porción diafisaria, aparece un manguito distintivo de tejido óseo llamado collarete óseo. Con la formación del collarete óseo perióstico los condrocitos presentes en la región media del modelo cartilaginoso se hipertrofian, y la matriz entre ellos se adelgaza. Las células hipertróficas comienzan a sintetizar fosfatasa alcalina y la matriz circundante se calcifica. La calcificación de la matriz impide la

difusión de sustancias nutritivas y causa la muerte de los condrocitos en el molde de cartílago. Además, parte de la matriz se degrada y las lagunas vecinas confluyen formando una cavidad de mayor tamaño. Al mismo tiempo, los vasos sanguíneos se multiplican y penetran a través del collarite óseo para vascularizar la cavidad. Algunas de las células periósticas migran junto con los vasos al interior de la cavidad y se convierten en células osteoprogenitoras. Las células osteoprogenitoras se adosan a las espículas residuales del cartílago calcificado, se convierten en osteoblastos y comienzan a producir osteoide. El hueso así formado se denomina *endocondral*. Tras el nacimiento, los extremos de los huesos largos son invadidos por la red vascular periarticular, que dan lugar al inicio de la formación de los “centros de osificación secundarios”.

Posteriormente, se produce el **remodelado óseo**^(4, 12, 13), a través del cual los huesos se mantienen en constante dinamismo, y adquieren su morfología final. Mediante el mismo, el hueso viejo es sustituido por hueso nuevo, proceso que se realiza por una acción coordinada entre osteoblastos y osteoclastos. Este recambio mantiene la resistencia biomecánica, y evita un acúmulo excesivo de osteocitos muertos, que condicionarían una excesiva fragilidad ósea y, por tanto, la aparición de fracturas.

El proceso comienza cuando acuden al foco los precursores de los osteoclastos (fase de activación) que al transformarse en osteoclastos maduros comienzan a resorber hueso (fase de resorción), labrando una cavidad tuneliforme en el hueso cortical (cono de apertura) o lacunar en el trabecular (laguna de Howship), que tras un periodo de inactividad (fase de inversión), será rellenada por el nuevo tejido formado por los osteoblastos. Inicialmente los osteoblastos forman la matriz orgánica (osteoide), que se mineraliza unos 15 días después (fase de formación).

La remodelación se lleva a cabo en las superficies óseas, fundamentalmente en la endóstica. Normalmente, el 75% de la superficie del hueso trabecular y alrededor del 95% del cortical se encuentran en reposo. La diferencia entre la cantidad de hueso que se destruye y la que se forma en cada una de las unidades de remodelación se conoce como balance óseo. El volumen de hueso renovado por unidad de tiempo, se conoce como recambio óseo (*turnover*).

En el ciclo de remodelación se distinguen cuatro fases: activación, resorción, inversión y formación^(1, 12, 14, 15).

- La *activación* comienza con el reclutamiento de los pre-osteoclastos, que proliferan, se diferencian y se fusionan, para formar los osteoclastos maduros. El fenómeno de activación es consecuencia de la intervención de una serie de “señales” no bien conocidas, entre las que se han asociado cambios de las fuerzas mecánicas locales, la situación endocrinológica del individuo, el ambiente paracrino de la zona de remodelado y, la estructura ósea, consecuencia del envejecimiento o del sufrimiento de un daño. Durante la fase de *resorción*, los osteoblastos de revestimiento se retraen dejando huecos a través de los cuales pasan los osteoclastos. Tras establecer contacto con la matriz ósea, los osteoclastos se fijan al hueso gracias a la afinidad de una integrina presente en la superficie de los osteoclastos (la $\alpha v \beta 3$) por determinadas proteínas de la matriz ósea (vitronectina, fibronectina). Tal unión se sigue de la activación de los osteoclastos y adoptarán la típica configuración con el borde rugoso o “en cepillo”, y un anillo rico en filamentos de actina que rodea a la zona rugosa, y que al unirse a la matriz, sella el espacio que queda entre ambas, aislándolo del microambiente óseo. Tras fijarse a las superficies óseas, los osteoclastos maduros comienzan a resorber hueso. El mecanismo principal de disolución del componente mineral está mediado por la secreción de hidrogeniones (H^+) a la zona sellada a través de un mecanismo de transporte activo ATPasa-dependiente. Los H^+ proceden de la transformación previa de CO_2 y H_2O en CO_3H_2 , gracias a la acción de la anhidrasa carbónica, enzima presente en los osteoclastos. La secreción de H^+ facilita la disolución del cristal de hidroxiapatita y, además, crea las condiciones de pH idóneas (pH: 4,5) para que actúen las enzimas lisosomales que disuelven la matriz orgánica. Tras finalizar su actuación, los osteoclastos desaparecen por apoptosis. Una vez finalizado el fenómeno de resorción, la superficie ósea queda libre de células, excepto por la presencia de unos pocos fagocitos mononucleares que, además de limpiar la cavidad, tiene la función de formar la línea sobre la que se depositará el hueso nuevo.
- Durante *la fase de inversión* reclutan osteoblastos, los pre-osteoblastos llegan al hueso, proliferan y se diferencian a osteoblastos maduros, llenando con nuevo tejido óseo el hueco labrado por los osteoclastos. Hasta un 20% de hueso se está

remodelando permanentemente a lo largo de un ciclo de actividad, que tiene una duración total de 3 a 6 meses.

- En la fase de *formación* los osteoblastos sintetizan y depositan la matriz osteoide que posteriormente se mineralizará. Se considera que aproximadamente la mitad de los osteoblastos formadores de hueso mueren por apoptosis. La otra mitad, o bien se transforma en osteoblastos de superficie (células de recubrimiento), a medida que forman hueso, quedan enterrados en él, transformándose en osteocitos.

El remodelado está controlado por factores sistémicos (hormonales) y locales (factores de crecimiento). Estos factores sólo se conocen parcialmente, pero parece que también está relacionado con factores físicos (estímulos mecánicos), ya que la falta de actividad física condiciona una pérdida de masa ósea⁽¹⁴⁾. Entre los factores hormonales está claramente establecido el papel de la PTH, que aumenta el recambio óseo, con un balance final ligeramente negativo cuando se produce de forma continua; sin embargo, su producción, de forma intermitente, da lugar a un balance positivo en cuanto a formación ósea. Otro factor hormonal son los esteroides, que actúan directamente sobre los osteoblastos y disminuyen su actividad, llegando a inhibir la síntesis de algunos componentes de la matriz ósea, y favoreciendo la degradación del colágeno ya formado.

Los factores locales son los que determinan en qué punto exacto del esqueleto se llevará a cabo la remodelación. Son producidos por células óseas, células sanguíneas (monocitos y linfocitos) y células de la médula ósea. La producción de estos factores puede verse regulada por hormonas sistémicas. Un ejemplo es el de la relación de los estrógenos con la IL-1, IL-6, y el TNF-a, a los que inhibe, y el TGF-b, al que estimula. El papel sobre la remodelación de dichos factores se establece del siguiente modo⁽¹²⁾:

Factores que favorecen la resorción ósea: prostaglandinas (PGE 2), Leucotrienos, Interleuquinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, IL-17), factores de necrosis tumoral (TNF-a, TNF-b), factores estimulantes de colonias (GM-CSF, M-CSF) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF).

Factores que favorecen la formación ósea: IL-4. Factor transformante beta (TGF-b), proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), factor de crecimiento fibroblástico

(FGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), interferón ganma (IFN-g) y factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1, IGF-2).

4. Estudio histológico del tejido óseo

El examen histológico del tejido es esencial como herramienta de investigación^(4, 7, 10, 16). La histología ósea ha contribuido al entendimiento de la funcionalidad y patogénesis del hueso en diversas situaciones.

No obstante, la evaluación histológica del hueso se ha visto limitada históricamente debido a las dificultades técnicas existentes. Antes de 1.960, los patólogos examinaban el hueso esporádicamente en comparación con el resto de los tejidos. Cuando se realizaba existía un grave inconveniente, ya que, el primer paso para la preparación del tejido tras su fijación era la descalcificación por medio de soluciones ácidas. El fin de dicho proceso era obtener un tejido lo suficientemente blando para que, después de ser incluido en parafina, pudiera ser cortado de manera rutinaria⁽¹⁶⁾. Además, debido a la resistente naturaleza del tejido óseo era difícil preparar secciones delgadas, de suficiente buena calidad para mantener las relaciones tisulares. Esto dificultaba el rigor en el estudio microanatómico de las estructuras óseas, y hacía prácticamente imposible apreciar los procesos dinámicos que de manera continua se producen in vivo, y por ende, su medición.

Las etapas en el proceso de preparación de muestras histológicas de tejido óseo son las siguientes:

- **Decalcificación**: El hueso debe ser disecado y cortado a un tamaño susceptible para la decalcificación. Algunos decalcificadores pueden producir artefactos que alteran las reacciones de coloración o disminuyen los detalles morfológicos de los tejidos blandos. Los decalcificadores de mayor uso son: a) ácidos, b) agentes quelantes, c) resinas de intercambio iónico y d) métodos electrolíticos. El ácido nítrico y el ácido clorhídrico pueden ser utilizados en forma efectiva en soluciones acuosas al 5%. El método más común y sencillo de descalcificación es sumergir el espécimen en líquido decalcificador y mantenerlo hasta que la desmineralización sea completa⁽¹⁰⁾. Normalmente la descalcificación se realiza a una temperatura ambiente de 20 a 25 °C con mayor temperatura (más de 60°C), los tiempos de decalcificación decrecen

marcadamente, pero no deben excederse de 50°C. El uso incontrolado de calor con una solución ácida puede causar quemaduras, maceración y finalmente completa digestión del espécimen, por lo que esta práctica no es recomendable.

- Inclusión: Posteriormente la muestra se coloca en el medio de inclusión, generalmente parafina, con el fin de poder realizar los cortes histológicos que posteriormente serán teñidos. La parafina tiene la cualidad de ser lo suficientemente flexible para facilitar el corte y manejo de las secciones histológicas.
- Corte: Para ello se emplea un micrótopo, el cual ha de ser lo suficientemente potente para el tamaño de la muestra⁽¹⁶⁾. La velocidad de corte no debe ser demasiado elevada, el ángulo de corte debe ser apropiado para evitar distorsiones y fragmentaciones de la muestra, y el grosor de la misma no debe ser excesivamente pequeño (para evitar compresión excesiva de la cuchilla), ni muy grueso (para evitar fracturas de la muestra), por lo que el grosor estándar suele ser de 2-3 µm.
- Deshidratación de las muestras: Posteriormente las muestras serán deshidratadas, extrayendo la parafina mediante un solvente adecuado, y teñidas.
- Extracción del solvente: El solvente también debe extraerse previo a la tinción, para lo cual se usan soluciones con concentraciones decrecientes de alcohol, hasta un medio acuoso, por lo que el proceso será inverso a la deshidratación⁽¹⁷⁾.
- Tinción: La tinción empleada debe de ser lo suficientemente fiable para diferenciar los distintos tipos celulares implicados y las distintas áreas del tejido óseo. La hematoxilina y la eosina son los colorantes de uso más frecuente en la histología^(4, 7, 10, 16). Desde el punto de vista estructural, la hematoxilina no es un colorante básico, pero tiene propiedades tintoriales muy semejantes a las de las anilinas básicas. Los componentes del tejido que se tiñen con hematoxilina exhiben basofilia. Las reacciones de los componentes celulares con los colorantes ácidos, como la eosina, no son tan específicas como con los colorantes básicos. Debido a ello, los colorantes ácidos se utilizan combinados a veces para teñir en forma selectiva distintos componentes de los tejidos, como en el caso de los tricrómicos.

En el caso del estudio histológico del hueso (con sus distintos componentes óseo, cartilaginoso y fibroso) las tinciones más empleadas y sus características tintoriales son^(4, 17):

- Hematoxilina- eosina: la hematoxilina tiñe los núcleos celulares de azul, mientras que, la eosina tiñe los citoplasmas y fibras de colágeno de rosa (Fig. 3).

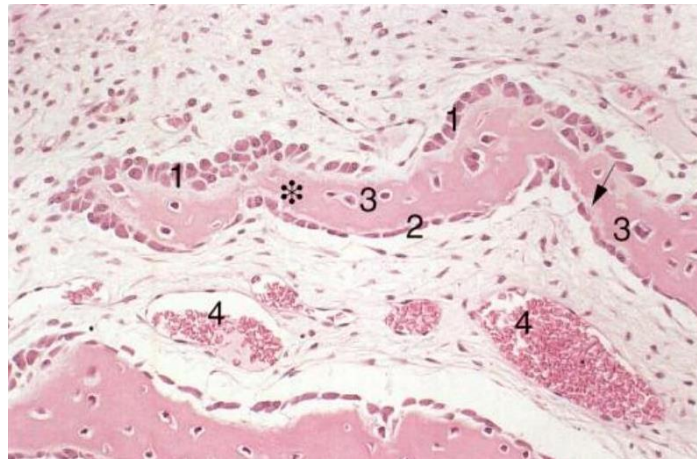


Fig. 3: Células óseas en fases tempranas de la osificación intramembranosa. Trabécula ósea (*) con osteoblastos activos (1) y poco activos (2). Osteocitos (3). Vasos venosos (4). Flecha indica reborde ⁽⁷⁾.

Tinción: hematoxilina-eosina, x 250.

- Azul de Toluidina: tiñe tanto núcleos, como citoplasmas y fibras colágenas de distintas tonalidades de azul. Los gránulos de los mastocitos aparecen de color púrpura.
- Tricrómico de Masson: específico para tejido cartilaginoso. Tiñe los núcleos celulares de negro, los citoplasmas de rosa y las fibras colágenas de azul (Fig. 4).

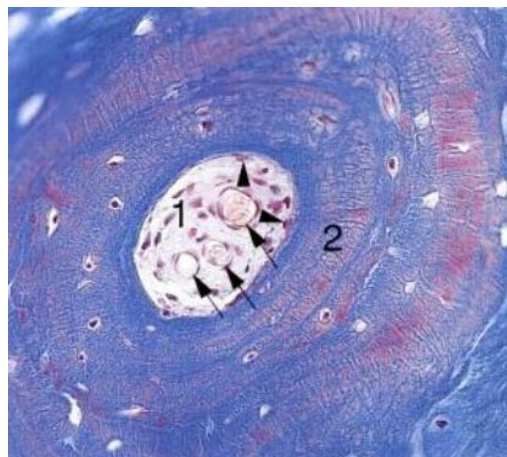


Fig. 4: Osteona en cuyo interior se observan (flechas) vasos sanguíneos y células de revestimiento aplanadas ⁽⁷⁾. Tinción: tricrómico de Masson, x 450.

- Tricrómico de Mallory: los núcleos aparecen rojos, los citoplasmas rosados y el colágeno de color azul intenso.
- Azul de Azán (azocarmín y azul de anilina) resalta fundamentalmente las fibras de tejido conjuntivo colágeno y reticular, así como el mucus, en distintas tonalidades de azul.

Las secciones de hueso pueden evaluarse cualitativa o cuantitativamente. La interpretación cualitativa, por un experimentado patólogo, era considerada normalmente suficiente para el diagnóstico de rutina y clasificación de ciertas enfermedades óseas, como la osteoporosis⁽¹⁶⁾. Sin embargo, la existencia de mínimos cambios en la estructura ósea debidos a cambios cuantitativos del metabolismo óseo hace necesario emplear otro tipo de técnicas más objetivas.

Todos los métodos de evaluación histológica cuantitativa dependen del uso de técnicas de muestreo imparcial, basados en los principios de probabilidad geométrica, utilizando imágenes bidimensionales para estudiar estructuras tridimensionales.

Como método cuantitativo aparece la **histomorfometría**⁽³⁾. La histomorfometría ósea consiste en la medición de los parámetros que reflejan la estructura, la microarquitectura y la remodelación del hueso. Es el único método con el que puede estudiarse el tejido óseo a nivel de la unidad estructural elemental, es decir, al de organización de dicho tejido. El empleo de éste método de evaluación proporcionará datos objetivos de parámetros estáticos y dinámicos de la estructura ósea. El análisis cuantitativo mide los parámetros estructurales (volumen trabecular óseo, grosor de la cortical), la microarquitectura (grosor y número de trabéculas, distancia intertrabecular) y los parámetros que reflejan la conectividad ósea.

En la histomorfometría ósea se han empleado dos tipos de procedimientos

- a. El muestreo aleatorio por medio de rejillas o retículas microscópicas : También llamadas técnicas manuales, emplean micrómetros y rejillas integradas en los oculares del microscopio, que son proyectadas sobre la estructura histológica a evaluar, contando el número de intersecciones o número de puntos o líneas de la retícula que se superponen o cortan la

estructura a medir. Estos métodos son los más económicos, pero también los más lentos.

- b. El trazado de estructuras tisulares completas, mediante el uso de dispositivos informáticos de digitalización computadorizada, de manera semiautomática o automática.
 - Los métodos semiautomáticos precisan un equipo más sofisticado, generalmente integrado por un microscopio, un tablero digitalizador, un cursor y un ordenador con el programa informático para histomorfometría. El investigador selecciona y traza todas las estructuras histológicas a medir.
 - Los métodos automáticos usan analizadores de imagen, que proyectando la imagen sobre un monitor, analizan un elevado número de puntos de acuerdo con una escala de grises

Todas estas mediciones se realizan en los sucesivos campos microscópicos.

Para localizar enzimas específicas de ciertos tipos celulares o tejidos en los cortes histológicos se emplea la **histoquímica**. Se usa un reactivo de captura, que puede ser un colorante, para detectar no al enzima propiamente dicho, sino a los productos de degradación del mismo. Como variante aparece la **inmunohistoquímica**, que se basa en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo. En el laboratorio se conjugarán anticuerpos específicos contra el antígeno que se quiera detectar mediante colorantes fluorescentes. Al entrar en contacto el anticuerpo con el antígeno en las células y tejidos, reaccionará y emitirá una luz fluorescente que puede examinarse y fotografiarse con un microscopio de fluorescencia.

En el caso del tejido óseo se empleará para determinar los distintos tipos de colágeno presentes en las muestras histológicas, los cuales están relacionados con el tipo de osificación subyacente, así como el endotelio vascular si se quiere estudiar la vascularización.

5. Fisiología del callo de fractura/distracción

La fractura se define como la discontinuidad del hueso, ya sea consecuencia de golpes, fuerzas o tracciones cuya intensidad superen la elasticidad del hueso^(1, 13). La evolución natural de dicho proceso es hacia la formación de un callo óseo si las condiciones del entorno son adecuadas. Dicho proceso consta de varias fases^(1, 4):

- i) *Fase de impacto*: Primeras 72 h tras la lesión. La consolidación espontánea se inicia con la formación de un hematoma en el lugar de la fractura por el sangrado de los vasos periósticos y de la médula ósea. La necrosis y hemorragia que se producen liberan factores que iniciarán y regularán todo el proceso de activación y que comprenderá tres fases:
 - Migración de células mesenquimales atraídas por factores quimiotácticos.
 - Proliferación celular como respuesta a factores mitogénicos.
 - Diferenciación celular regulada por factores inductores.
- ii) *Fase inflamatoria*: Se inicia inmediatamente después de producirse la fractura y se mantiene durante alrededor de dos semanas. Aparece un acumulo de líquido en el espacio intersticial por vasodilatación y aumenta la permeabilidad capilar en respuesta a factores como histamina, serotonina, etc. Localmente se concentran leucocitos y polimorfonucleares, especialmente neutrófilos, a los que se unen progresivamente células de la serie mononuclear-fagocítica. Todas las células inflamatorias, como las plaquetas del hematoma fractuario, liberan factores locales que desencadenan la proliferación, emigración y diferenciación de células mesenquimales y la aparición de brotes vasculares que invadirán el foco. Entre el 3° y 21° días hay un aumento del flujo sanguíneo local. La regularización del proceso de consolidación va a depender en parte de la electronegatividad y la relativa falta de oxígeno. La fagocitosis activa de los macrófagos absorbe los productos de la necrosis local durante estos días, y el hematoma se convierte en tejido de granulación a medida que proliferan

fibroblastos, que producirán mayoritariamente colágeno tipo I y III, osteoblastos y nuevos capilares, que generan la base de una nueva sustancia ósea denominada osteoide.

iii) *Fase de formación del callo primario o fibrocartilaginoso*: A partir del tercer día, y hasta las 3 semanas el coágulo se transformará en el callo blando. Está constituido por vasos sanguíneos, cartílago, tejido fibroso conectivo, tejido óseo inmaduro (*Woven Bone*) y osteoide. Hay proliferación y diferenciación celular con un aumento de proliferación vascular. La proliferación se pone en marcha donde se encuentra el periostio, endostio y tejidos circundantes vasculares, comienzan a aparecer osteoblastos, osteoclastos y condroblastos (Fig. 5). Los osteoblastos y condroblastos forman una amalgama celular responsable del callo blando, en el que predomina el colágeno tipo II. La fractura se acompaña de la interrupción del periostio en las dos capas que lo componen (capa fibrosa externa y capa fibrosa interna o cambium). Las células del cambium proliferan y se diferencian formando un collarete alrededor de cada extremo fractuario, hasta que llegan a unirse, formando el callo periférico perióstico. En términos generales, cuando la oxigenación del foco es buena, la diferenciación de las células del cambium se produce en sentido osteoblástico (sintetizan material osteoide, y suponen el primer paso de un proceso de osificación desmógena directa), y si es hipóxico se hace en sentido condroblástico (sintetizan sustancia intercelular amorfa). La interrupción del endostio y de la medular también producirá una diferenciación celular, formando el callo medular o endóstico, y sufrirá una diferenciación osteoblástica. Todo esto se ve acompañado por la generación de focos de angiogénesis que establecerán un nuevo sistema de perfusión. El tejido de granulación que se ha formado se transformará a tejido fibroso por los fibroblastos, y aparecerán áreas de osificación endocondral, sobre todo en la periferia del callo. La cantidad de tejido cartilaginoso variará, y se relaciona con regiones con bajo aporte de oxígeno.

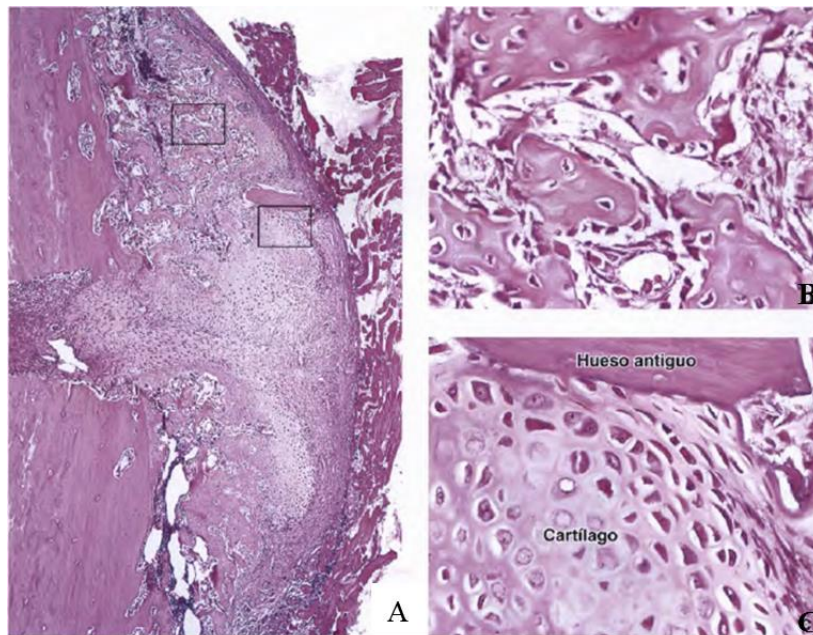


Fig. 5: Microfotografía de un hueso largo fracturado en proceso de reparación a las 3 semanas de evolución. (A) Callo fibrocartilaginoso, cubierto en zona derecha de la imagen por periostio. Se observan abundantes osteoblastos. El proceso de osificación será endocondral, x35. (B) Osteoblastos recubriendo las trabéculas óseas, x 300. (C) Fragmento de hueso antiguo contiguo al cartílago ⁽⁴⁾, x 300. Tinción: hematoxilina-eosina.

- iv) *Fase de formación del callo duro*: Se produce al mineralizarse el callo blando, y variará dependiendo del tejido subyacente. En el callo de fractura normal, el tejido fibrocartilaginoso del callo blando será invadido por osteoblastos, que formarán el callo duro debido a la calcificación progresiva del cartílago, hasta los 3-4 meses. Mientras que el tejido osteoide neoformado se mineralizará directamente por el depósito de cristales de hidroxapatita, el tejido cartilaginoso seguirá un proceso de osificación endocondral similar al que siguen los moldes cartilaginosos del feto. El tejido óseo resultante será de tipo fibrilar y predominará el colágeno tipo I. Tiene lugar entre las 3 semanas y los 6 meses tras la fractura.
- v) *Fase de remodelación*: Durante este periodo el *Woven Bone*, es sustituido por hueso maduro y la medular ósea reconstruida. El exceso de tejido óseo es reabsorbido en el estadio final de la curación ósea y la unión es completa. Durará entre meses y años, hasta que *Woven Bone* se transforme en laminar trabecular en las zonas metafiso-epifisarias y Haversiano en la cortical

diafisaria. En esta fase desaparece la electronegatividad, se normaliza la tensión de oxígeno y la cavidad medular, ocupada por el tejido neoformado, es vaciada y ocupada por médula ósea. Esta fase conducirá a una reorganización interna del callo. El hueso responde a sus características de carga de acuerdo a la ley de Wolf durante la fase de remodelación.

Este proceso de curación natural de las fracturas puede alterarse cuando se modifican de cualquier modo los factores que influyen sobre el foco o las características electromecánicas del medio fractuario. Así, se hablará de “retardo de la consolidación” cuando la fractura no consolida en el periodo de tiempo normal esperado para el tipo y localización de la fractura⁽¹⁸⁾, a pesar de existir evidencias clínicas y radiológicas de que el proceso de reparación no ha cesado. A veces el proceso de consolidación cesa, y la fractura no consolida nunca, llegando incluso a formar una falsa articulación o “pseudoartrosis”, apareciendo una capa fibrocartilaginosa con una cobertura sinovial.

Durante la distracción osteogénica sin embargo, todo este proceso de reparación ósea queda interrumpido por la aplicación de las fuerzas de tracción, que darán lugar a cambios a distintos niveles. La osteotomía genera daño en todas las estructuras (periostio, endostio, tejido óseo y médula ósea), lo cual altera parcialmente la vascularización y la biomecánica del callo se ve modificada de forma progresiva. Al igual que en el caso del callo fractuario fisiológico, se liberarán factores de crecimiento y citoquinas, que actuarán sobre las células multipotenciales, provenientes sobre todo, de periostio y endostio, y también en parte de la medular. En este proceso, el periostio aparece como una de las fuentes principales de células multipotenciales, lo que explica que los daños extensos al mismo resulten en una respuesta osteogénica más débil⁽¹⁹⁻²²⁾.

Este modelo de osteogénesis por distracción consta de varias fases en su desarrollo^(23, 24):

- *Fase de latencia*: Se corresponde con el periodo de tiempo posterior a la realización de la osteotomía, y hasta el inicio de la aplicación de las fuerzas de tracción y consecuente activación del distractor. Es variable, pero generalmente oscila entre 5 y 7 días. La secuencia de acontecimientos durante este periodo es similar a la vista durante el proceso reparativo de toda fractura⁽²⁵⁾. Debido a la disrupción vascular, aparece un hematoma, que posteriormente formará un

coágulo, y en los extremos óseos separados se desarrollarán áreas de necrosis. Se estimula la proliferación celular y comienza la restauración de la red vascular. Todos estos eventos se corresponden con el periodo inflamatorio de la curación de las fracturas.

- *Fase de distracción*: Su duración difiere en función del tamaño del defecto a solventar. La velocidad de distracción óptima, se ha establecido en 1 mm/día^(20, 21, 26-29), aunque existen múltiples estudios sobre la influencia del ritmo de distracción en el resultado final^(21, 30-33). Durante esta fase el efecto estimulante de la tensión, activa los tejidos conectivos implicados en el callo óseo: se incrementa la angiogénesis, con aumento del aporte de oxígeno, e incrementa la proliferación de los fibroblastos y su actividad sintética. Al comienzo de la distracción las fuerzas ejercidas dan lugar a alteraciones fenotípicas en los fibroblastos, los cuales hipertrofian sus filamentos intermedios, y se orientan, junto con el colágeno que secretan, paralelos al vector de distracción entre los dos segmentos osteotomizados. Entre el tercer y séptimo día de distracción, los capilares comienzan a formar una nueva red, no solo hacia el interior del callo, sino también hacia las medulares de los segmentos óseos adyacentes. Los nuevos vasos también crecen siguiendo el vector de distracción, y a velocidades mayores que en el desarrollo del callo fractuario normal. A través de estos nuevos vasos, el callo óseo se verá invadido por distintos tipos celulares (fibroblastos, osteoblastos, condroblastos...). Una vez alcanzada la segunda semana de distracción comienza a aparecer tejido óseo trabecular, debido a la aposición de osteoide generado por los osteoblastos que se sitúan entre las fibras de colágeno, y que darán lugar a la formación de las espículas óseas, que invadirán el callo desde la periferia al centro. Todo ello hace que el callo de distracción tenga una conformación específica, con una zona poco mineralizada y radiolúcida en el centro del gap, donde la influencia de las fuerzas de tensión son máximas, y donde encontraremos las fibras colágenas junto con los fibroblastos hipertróficos orientados paralelamente a las fuerzas de tracción, junto con células mesenquimáticas indiferenciadas en la matriz. Los extremos del callo óseo estarán formando nuevo hueso mientras dure el proceso de distracción de los segmentos, actuando como zona de crecimiento. La distribución zonal se mantendrá hasta el final del periodo de distracción.

- *Fase de consolidación*: Representa el tiempo necesario para la mineralización completa del callo óseo, y ocupa el periodo de tiempo tras finalizar la distracción. La interzona fibrosa se osificará gradualmente, y todo el *Woven Bone* será sustituido por tejido óseo maduro (Fig.6). Durante esta fase se sigue manteniendo el distractor. A mayor longitud transportada, más largo será el periodo de consolidación, estableciéndose los máximos en alrededor de un mes por cada centímetro distraído.
- *Fase de remodelación*: Una vez retirado el distractor tendrá lugar el periodo de remodelación. En dicho periodo la estructura histológica del callo irá modificándose hasta alcanzar la conformación del hueso maduro normal. Puede durar años.

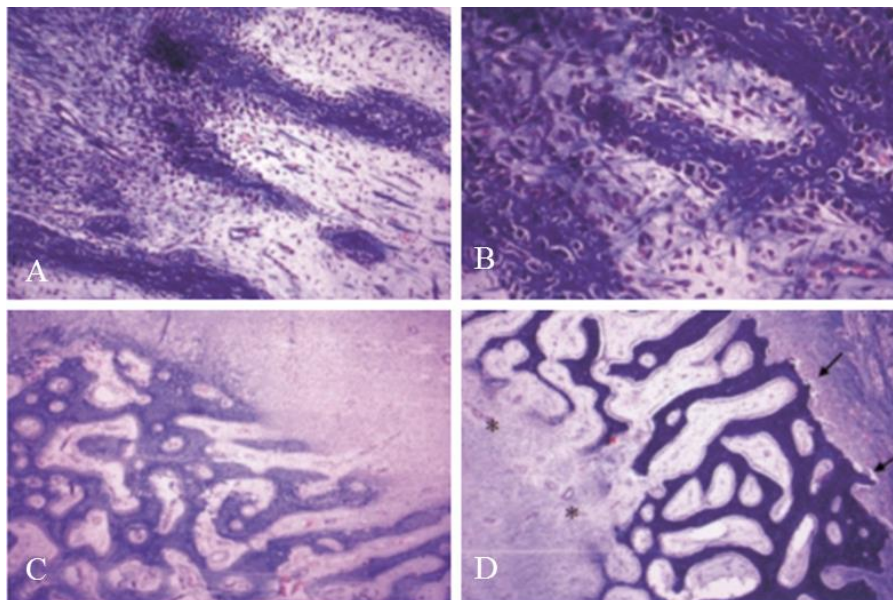


Fig. 6: Osificación intramembranosa. (A) Células mesenquimales en tejido fibroso, x 40. (B) Misma imagen a más aumento, x 100. (C) Invasión vascular del frente de osificación, x 40. (D) Trabéculas óseas en el frente de osificación y reabsorción de las mismas (flecha)⁽²⁹⁾, x 40. Tinción: tricrómico de Masson.

Existe discusión sobre el tipo de osificación (endocondral frente a intramembranosa) que se produce en el callo de la distracción ósea^(8, 30-32, 34-37). Del mismo modo que en el callo fisiológico, factores como la calidad del aporte vascular^(20, 22, 38) o, el tipo y forma de carga transmitido⁽³⁹⁻⁴³⁾, pueden alterar el patrón de osificación. La vascularización local puede determinar la diferenciación de las células

multipotenciales⁽⁴⁴⁾, ya que, niveles bajos de oxígeno en el tejido favorecerán la diferenciación hacia condroblastos, resultando en osificación endocondral.

Aunque se conoce que es importante controlar ciertos factores para que la distracción ósea pueda llevarse a cabo con éxito⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾, la gran variabilidad en cuanto a tipos de animales empleados^(8, 21, 46, 48-53), región anatómica estudiada^(9, 30, 42, 54), sistemas de fijación^(51, 55, 56), ritmos de distracción^(20, 30-32, 57) o incluso el tamaño del segmento a transportar⁽⁵⁸⁾, hace que no existan un consenso claro en cuanto a las características anatomopatológicas del callo en la osteogénesis por distracción.

Durante el desarrollo normal del callo de fractura tendrá especial interés el mantener un grado de estabilización del mismo que permita la carga temprana. La respuesta a la carga es una de las características más importantes del hueso⁽⁵⁹⁾. En función de la tensión ejercida, se inducirá la resorción o formación de nuevo hueso. Las células responsables de este fenómeno en el hueso sano son los osteocitos, los cuales transmitirán las señales desde la matriz ósea a la superficie del hueso. Durante este mismo periodo, en la osteogénesis por distracción, al separarse los extremos óseos, se favorece la formación de hueso, lo que da lugar a las diferencias morfológicas con el callo óseo fractuario. En lugar de osificarse simultáneamente todas las áreas como en el callo normal, la osificación del tejido conectivo aparecerá en distintas fases del proceso osteogénico en las distintas zonas del callo.

Al igual que en el caso del callo fractuario, son múltiples los factores que pueden repercutir sobre el proceso de la osteogénesis por distracción, como el ritmo de distracción, el tipo de osteotomía o la rigidez del sistema, lo cual ha sido motivo de diversos estudios^(20, 21, 30-33, 45-48, 51, 55, 56, 58).

6. Defectos óseos segmentarios

6.1 Definición

La curación ósea y la reconstrucción tras lesiones traumáticas o atraumáticas involucran una cascada celular, humoral y de eventos mecánicos que culminan con el restablecimiento de la integridad ósea. Cuando estas lesiones consisten en defectos segmentarios de huesos largos, ya sean de la extremidad superior o inferior, son

necesarias diversas consideraciones dependiendo de la causa, el tamaño del defecto y las comorbilidades asociadas del paciente.

Se definen como “defectos segmentarios críticos” aquellos que por su tamaño no curarán espontáneamente a lo largo de la vida del individuo⁽⁶⁰⁾.

Alternativamente, se definen los “defectos óseos segmentarios” como aquellos cuya longitud excede de 2-2,5 veces el diámetro del hueso afecto. Sin embargo, no es sólo la longitud del defecto lo que lo caracteriza como crítico, sino múltiples variables, entre las que se encuentran la localización, la asociación a problemas de partes blandas y biomecánicos de la extremidad afectada, la edad y las comorbilidades asociadas del paciente que puedan afectar a la curación de la lesión. Todos estos factores impiden la creación de una clasificación general para grandes defectos óseos, comparable con las existentes para las fracturas, por ejemplo. Además, la complejidad asociada a la existencia o no de comorbilidades (defecto de partes blandas, infección, etc.) y la variedad de causas existentes, no han permitido que se establezca una sola técnica quirúrgica como tratamiento de elección.

Los defectos óseos segmentarios y de partes blandas se presentan en la actualidad como secuela de procesos de múltiples etiologías. La reconstrucción de los mismos sigue siendo un problema de difícil solución, y uno de los principales retos a los que se enfrenta el Cirujano Ortopeda, debido al gran índice de fracasos asociados a su tratamiento quirúrgico y a su alto coste.

La mayor incidencia de traumatismos de alta energía y de cirugías de revisión protésica, las resecciones óseas extensas por causa tumoral o infecciosa, sumadas a una población cada vez más exigente, han hecho necesario el desarrollo de técnicas quirúrgicas cuyos resultados impliquen una restitución lo más anatómica y funcional posible.

6.2 Opciones terapéuticas

En el tratamiento de dicha patología se establecen técnicas que emplean el uso de alo o autoinjertos, estructurales y/o esponjosos, vascularizados o libres, y la distracción ósea. El empleo de una u otra técnica dependerá, no sólo del tamaño del defecto a

restituir, sino también de las características del paciente, que será candidato a una u otra técnica en función de su patología de base, edad, etc.

Dependiendo del tamaño del defecto, se determina que pérdidas menores a 3 cm de longitud con adecuada cobertura de partes blandas, pueden ser tratadas exitosamente mediante aloinjertos, autoinjertos no vascularizados o sustitutivos óseos⁽⁶⁰⁾. Para pérdidas mayores de 4-5 cm es necesario optar por técnicas más complejas.

Entre las opciones terapéuticas se encuentran el empleo de injertos vascularizados, las técnicas basadas en la generación de pseudomembranas bioactivas y la distracción ósea.

6.2.1 Injertos vascularizados

Varias son las zonas donantes descritas que pueden utilizarse como injerto óseo vascularizado, tales como el peroné, las costillas o la cresta iliaca⁽⁶¹⁾. Además, tienen la ventaja de que al mismo tiempo pueden extraerse con las paletas cutáneas acompañantes que sirven de testigo de su perfusión sanguínea, o incluso con componentes musculares (dorsal ancho y serrato anterior en el caso de las costillas) que permiten cubrir amplios defectos de partes blandas o rellenar grandes oquedades en la misma cirugía.

Aunque su uso está ampliamente extendido para grandes defectos segmentarios, también estarían indicados en el caso de defectos pequeños que requieren aporte sanguíneo para su curación^(62, 63).

El peroné vascularizado está aceptado como el injerto óseo vascularizado más adecuado para la reconstrucción de defectos óseos segmentarios de los huesos largos^(64, 65). Supone un aporte de hueso largo cortical de alta densidad, que puede dar cobertura a defectos mayores de 25 cm, con un buen pedículo vascular y con una mínima morbilidad en la zona donante^(64, 65). Entre sus indicaciones están: los defectos menores de 6 cm que precisan de aporte vascular, defectos mayores de 20 cm, defectos derivados de osteomielitis crónicas o de resecciones tumorales.

Por su morfología recta, es ideal para reconstrucción de defectos del miembro superior. Además, puede plegarse sobre sí mismo conservando el pedículo vascular

funcionante, por lo que puede usarse para cobertura de defectos en regiones metafisarias.

Entre los inconvenientes de esta técnica están la necesidad de gran experiencia en microcirugía para su realización, los largos tiempos quirúrgicos y la gran exposición del campo quirúrgico necesarias. Además, están implícitos los riesgos de fallo de la anastomosis vascular, que el injerto no se hipertrofie lo suficiente para soportar el peso durante la carga (sobre todo cuando se usa en el miembro inferior), y que en caso de fracaso quedan comprometidas tanto la zona receptora como la donante.

En función de la localización y el tipo de defecto, puede realizarse de forma simple, en combinación con aloinjerto o plegándolo sobre sí mismo como doble-barrell (sobre todo indicado en el caso de defectos femorales)⁽⁶⁶⁾.

Cuando no es posible utilizar el injerto de peroné, se adquiere como alternativa de la cresta iliaca y/o de las costillas. La cresta iliaca posee indicaciones más limitadas que el peroné vascularizado, al no ser recta, sino curva, y no poder cubrir defectos de tamaños mayores de 10-12 cm. En el caso de las costillas, tienen además la curvatura más marcada y mayor limitación de tamaño que la cresta iliaca. Dada su morfología no podrán usarse para reconstrucción de grandes defectos en el miembro superior, pero sin embargo, ambos injertos se han usado con éxito en cirugía reconstructiva del miembro inferior a lo largo de años.

6.2.2 Pseudomembranas bioactivas: Técnica de Masquelet y de la malla cilíndrica

Como alternativa a otras técnicas reconstructivas más complejas, surgen las pseudomembranas bioactivas. Dos son las técnicas más empleadas en la actualidad basándose en ellas: la técnica de Masquelet y la técnica de la malla cilíndrica.

La técnica de Masquelet permite la reconstrucción de amplios defectos diafisarios y metafisarios, y consta de dos estadios^(67, 68). El primero consiste en rellenar el defecto óseo con un espaciador de cemento de metilmetacrilato, el cuál inducirá al organismo a la creación de una pseudomembrana sinovial a su alrededor que aísla la zona receptora (de forma similar a la reacción tisular a un cuerpo extraño). El segundo tiempo se

realiza al menos dos meses después. Durante el mismo se procede a la retirada del espaciador y relleno de la cavidad con autoinjerto de esponjosa. La pseudomembrana inducida por el espaciador previene la reabsorción del injerto y favorece su vascularización y su corticalización. En caso de ser necesaria la cobertura de partes blandas con un colgajo, se hace durante la primera cirugía.

La primera función del espaciador es mecánica, previniendo la ocupación de la zona receptora por tejido fibroso. La segunda es biológica, por la inducción de la membrana circundante que proveerá una fuente de irrigación y aislará el injerto de manera que no se reabsorba.

Por otro lado, la técnica de la malla cilíndrica fue descrita en el año 2000 por Cobos y cols⁽⁶⁹⁾. Consiste en el empleo de una malla cilíndrica fabricada con materiales biodegradables poliláctidos o con titanio. La malla se coloca rodeando el defecto, y queda anclada a ambos lados (proximal y distal) del defecto. Luego se rellena con aloinjerto esponjoso, bien solo o en combinación con matriz ósea desmineralizada. Frente al Masquelet presenta la ventaja de poder resolver el defecto en solo una intervención, pero es más cara desde el punto de vista económico y precisa de alguna otra técnica añadida de fijación para estabilizar la interfase hueso-malla.

6.2.3 Osteogénesis por distracción

Cuando el defecto es grande, y la irrigación del miembro depende únicamente de una arteria, existe un elevado riesgo de isquemia de dicha extremidad al usar un injerto vascularizado, ya que, aunque pudiera solucionar defectos de gran cuantía, su fracaso supondría la pérdida del miembro en cuestión. La osteogénesis por distracción aparece como un procedimiento quirúrgico ampliamente extendido en la actualidad, como técnica de cirugía reconstructiva, en casos de deformidades esqueléticas o pérdidas óseas segmentarias^(47, 53, 54), consiguiendo la expansión esquelética, así como de las partes blandas circundantes.

Se basa en el principio de que la tracción gradual sobre el tejido vivo estimula y mantiene activo el crecimiento óseo. Además, el hueso osteotomizado y sometido a tracción lenta se vuelve metabólicamente más activo.

La gran contribución de *Ilizarov* a esta técnica consiste en haber determinado las circunstancias bajo las cuales se obtiene el éxito y en el descubrimiento de 2 fenómenos fisiológicos conocidos como principios de Ilizarov^(20, 21):

1. La tracción gradual crea un estrés que puede estimular o mantener la regeneración de los tejidos vivos.
2. La forma y volumen de huesos y articulaciones depende de una interacción entre la carga mecánica y el aporte sanguíneo.

La base de la osteogénesis por distracción la constituyen los alargamientos óseos, donde se somete a tracción gradual un hueso osteotomizado previamente, para aumentar su longitud al producirse la osificación en la zona de distracción. Esta técnica fue desarrollada inicialmente con la finalidad de solucionar las disimetrías entre extremidades y más tarde se añadieron otras indicaciones.

Posteriormente, basándose en los principios de la osteogénesis por distracción, se desarrollaron técnicas de transporte óseo, el cual consiste en la movilización progresiva de un segmento libre de hueso vivo, de forma longitudinal a través de una pérdida de sustancia ósea, mientras se va produciendo una osificación espontánea, progresiva, y de excelente calidad biológica en la zona de distracción⁽⁶⁰⁾. La zona neoformada constituirá el “*callo óseo*” o “*regenerate*”, mientras que la zona de contacto del segmento móvil transportado con el distal en la zona de unión recibe el nombre de “*Docking Site*”. Entre sus ventajas sobre otros métodos de tratamiento convencionales se incluyen la habilidad de reducir el tamaño del defecto de los tejidos blandos, ya que son movilizados con el segmento a transportar, la mínima lesión de los mismos durante el procedimiento, y que puede realizarse en varias direcciones (transversal y longitudinal). En caso de requerir injerto adicional, la cantidad de piel necesaria es considerablemente menor, por lo que disminuye la comorbilidad de la zona donante. Además, permite restaurar la longitud exacta de la extremidad, y que la zona regenerada tenga una anchura normal, reduciendo potencialmente el riesgo de fracturas tardías.

Se encuentra indicado para defectos entre 3 y 12 cm, ya que tamaños mayores suponen periodos muy prolongados de mantenimiento del sistema de fijación.

7. Estado del arte de la distracción ósea

7.1 Evolución de la técnica quirúrgica de la osteogénesis por distracción

El desarrollo de las técnicas de alargamiento de miembros y transporte óseo posee una trayectoria histórica extensa^(26, 70, 71). Los logros y avances necesarios para obtener las secuencias de tratamiento tal y como se conocen hoy día han conllevado un histórico elevado coste en complicaciones y morbilidades de los pacientes.

La evidencia más antigua de empleo de la Osteogénesis por distracción se remonta a Hipócrates (460-377 a.c.), quien realizaba tracción de los huesos largos mediante correas de caucho. Posteriormente, no aparecen más datos de intentos de alargamiento óseo hasta el siglo 19, cuando los cirujanos se debatían por tratar las secuelas de heridas de guerra, pseudoartrosis o fracturas mal consolidadas de fémur, y deformidades secundarias a la poliomielitis. Inicialmente, se intentaron alargamientos en un tiempo por parte de pioneros como Von Langenbeck (1869), Hopkins y Penrose (1889), y Von Eiselberg (1897)⁽⁷¹⁾.

Sin embargo, el alargamiento óseo tal y como se conoce en la actualidad, no se inicia hasta principios del siglo XX, con los trabajos del italiano Alessandro Codivilla (fig. 6) en Bolonia⁽⁷²⁾. Llegó a publicar 124 artículos, en 25 idiomas, mostrando las nuevas opciones de tratamiento de múltiples patologías, incluyendo secuelas de polio, pie zambo, escoliosis, y luxaciones congénitas de cadera⁽⁷²⁾. Su primer trabajo sobre el empleo de un fijador externo y la tracción para el alargamiento aparece en la literatura italiana en 1903⁽⁷³⁾, y en la inglesa en 1905⁽⁷⁴⁾. En ellos, Codivilla reconoce que previamente otros habían intentado el alargamiento de miembros sin éxito, según él, debido a que sus técnicas eran ampliamente empíricas y sin mucha evidencia que las avalara.



Fig. 7: Alessandro Codivilla.

Inicialmente, presentó dos técnicas diferentes⁽⁷⁴⁾. Para los defectos más pequeños, recomendaba el alargamiento agudo forzado bajo medicación narcótica. Para mayores alargamientos proponía la técnica que denominó “extensión continua”⁽⁷²⁻⁷⁴⁾. Dicha técnica consistía en realizar un alargamiento femoral mediante una osteotomía oblicua diafisaria con escoplo, con posterior distracción moderada, tan intensa como permitieran las partes blandas; posteriormente, mantenía la elongación con una tracción transesquelética calcánea (25-30 kg) y un yeso rodeando el tórax, la pelvis y la pierna (incorporando el pin calcáneo). Si el alargamiento era insuficiente, cortaba el yeso a nivel de la osteotomía y añadía más peso (nunca más de 25-30 kg por etapa). Con esta técnica podía obtener el alargamiento deseado en unos 20 días, e incluso podía continuarlo hasta 30-35 días sin complicaciones (fig.7). En su trabajo de 1905⁽⁷⁴⁾ presentó los resultados de 26 pacientes, con acortamientos secundarios a varias causas, y consiguiendo alargamientos entre 3-8 cm. Dicho procedimiento presentó múltiples complicaciones, entre las que se encontraban lesiones nerviosas, complicaciones cutáneas y estados convulsivos incontrolables.

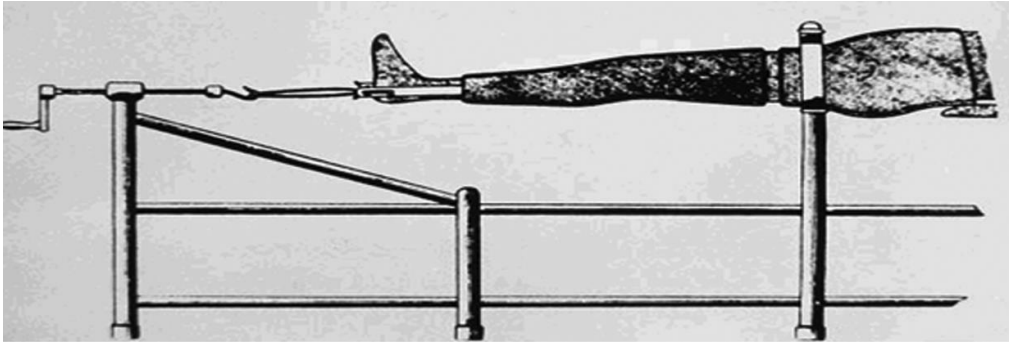


Fig. 8: Representación esquemática de la técnica de "Extensión continua" de Codivilla⁽²⁶⁾.

En 1908, Magnuson realizó sus primeros estudios experimentales en Chicago^(53, 75). Utilizó un modelo animal en perros, para demostrar que era posible un alargamiento de 5-7,5 cm en un solo tiempo, sin dañar las partes blandas. Además, separaba longitudinalmente el periostio, minimizando el daño a dicha capa y al endostio. Llegó a realizar 14 alargamientos con esta técnica en humanos, describiendo varias complicaciones, incluyendo shock pre y postquirúrgico en todos los pacientes, e incluso la muerte de uno de ellos en la mesa de operaciones⁽⁷⁵⁾.

Con el paso de los años, múltiples cirujanos buscaron la forma de avanzar mejorando la técnica de Codivilla. Freiberg (Cincinnati 1911), recomendó dividir el alargamiento en varias sesiones para salvar el problema de las partes blandas⁽⁵³⁾. En 1913, Ombredanne⁽⁷⁶⁾ modificó la técnica, recomendando una osteotomía oblicua y tracción lenta gradual. Usando esta técnica conseguía alargamientos hasta de 4 cm, pero frecuentemente se infectaban, desembocando en una osteomielitis, por lo que la técnica se abandonó pronto.

Taylor en 1916, presentó los resultados de 10 años de experiencia en alargamientos en la Sociedad Americana de Ortopedia. Su técnica^(71, 77) consistía en la colocación de un yeso, realización de una osteotomía en la mitad de la extremidad, y distracción en función de la tolerabilidad del paciente durante los siguientes 10 días. Concluyó que el dolor y las complicaciones, eran desproporcionados a los resultados obtenidos en cuanto al alargamiento, por lo que propuso como buena alternativa, el acortamiento del miembro contralateral.

En 1912, Victorio Putti sucedió a Codivilla como director del Instituto Rizzoli en Bolonia, y continuó los trabajos de éste. Insistió en la necesidad de hacer una

osteotomía con un mínimo trauma, y un alargamiento gradual y controlado⁽⁷⁸⁾. Para ello, diseñó un dispositivo formado por 2 agujas —una insertada en la región subtrocantérea y otra en los cóndilos— y una barra conectora para la distracción de segmentos óseos, que permitía controlar las fuerzas de tracción aplicadas (fig. 8). El aparato producía distracción continua por 30 días. Consiguió alargamientos hasta de 8 cm. Sin embargo, no proporcionaba una adecuada estabilidad al no controlar bien las desviaciones axiales a pesar de las modificaciones realizadas. Putty abandonó esta técnica⁽⁷¹⁾, y comenzó a utilizar cuerdas de piano para los alargamientos, que se conectaban a un sistema de distracción que se fijaba a la cama del paciente. Sin embargo, no fue el primero en emplear dicha técnica, Klapp, pupilo de August Bier, durante la guerra de los Balcanes, fue el precursor de la misma^(27, 71).

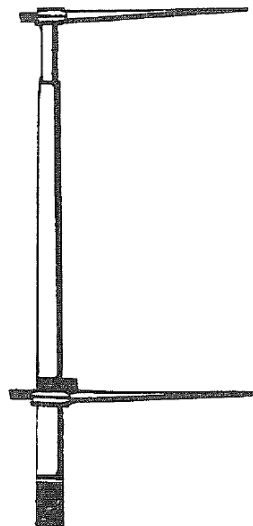


Fig.9: Representación esquemática del sistema de Putti para distracción ósea⁽⁷¹⁾.

En 1905, August Bier proclamó el potencial osteogénico del hematoma fractuario, siendo el pionero en hablar de tener un tiempo de latencia previo a la distracción⁽¹⁹⁾. Defendió que el hematoma fractuario podía equivaler a un factor suplementario para la consolidación del hueso fracturado y que la razón del retraso en la formación del callo era la evacuación del hematoma, por lo que se frenaba el sangrado, lo cual era sustancial para la formación de nuevo hueso y tejido conectivo. No obstante, falló en reconocer el potencial formador óseo del periostio y del endostio y la importancia de preservar su irrigación. Esperaba unos pocos días antes de comenzar la distracción para explotar el estímulo del hematoma fractuario y la tracción ejercida sobre el hueso.

Una vez Putty presentó sus trabajos en 1921, Abbott y Crego modificaron la técnica en San Luis, en 1924^(26, 71). Desarrollaron un fijador monolateral⁽⁷⁹⁾, con pines proximales y distales a la osteotomía, que atravesaban el grosor completo de la tibia, y con una serie de varillas roscadas, a las que se conectaban los cables, resultando en un montaje estable (fig.9). Distraían intraoperatoriamente 1-2 cm y tras un periodo de latencia de 7-10 días, comenzaban con distracción gradual de 1-3 cm diarios.

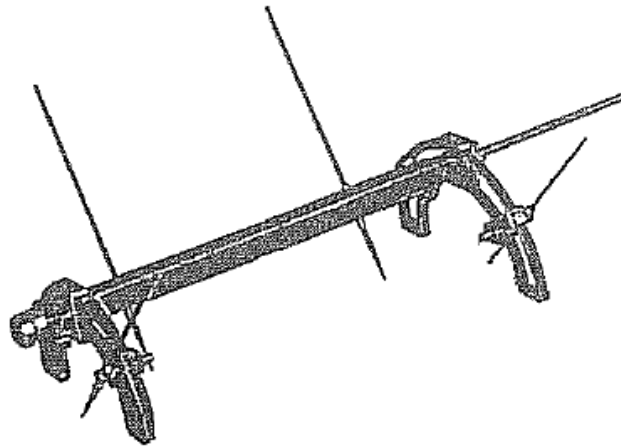


Fig. 10: Sistema de distracción diseñado por Abbot⁽⁷¹⁾.

Sobre los años 30, llevaron a cabo la cirugía en 73 pacientes, obteniendo múltiples complicaciones⁽⁸⁰⁾, entre las que se encontraban, deformidades en equino-valgo, luxación tibio-peronea, contracturas en flexión de la rodilla, limitación de la movilidad de la cadera, recurvatum o procurvatum de los segmentos tibiales distraídos, debilidad muscular, parálisis nerviosas, infecciones, etc. Para salvar estas complicaciones, Abbot modificó su técnica⁽⁸⁰⁾. Intentó solventar los problemas con la resistencia de las partes blandas con una disección extensa de la fascia, periostio y membrana interósea. Todos los músculos insertados proximalmente en la tibia, se desinsertaban subperióticamente. Dos semanas tras la realización de la osteotomía, en una segunda intervención, comenzaba el alargamiento.

Esta técnica se hizo muy popular en Estados Unidos, y fue adoptada por múltiples cirujanos⁽⁷¹⁾. Sin embargo, no estaba exenta de complicaciones, y su uso indiscriminado llevó a Abbot a escribir⁽⁸⁰⁾ que esta técnica sólo debía llevarse a cabo por cirujanos experimentados y cualificados, defendiendo el acortamiento del miembro contralateral para los cirujanos menos expertos. En 1932, Haboush y Finkelstein, trabajando en

Nueva York publicaron un gran número de complicaciones derivadas del empleo de la técnica de Abbot⁽⁸¹⁾. Determinaban que la extensa disección de los tejidos no solo no prevenía la deformidad del pie, sino que podía producir infecciones y pérdidas del tejido regenerado.

White⁽⁸²⁾ en 1930, usó clavos de Steinmann incorporados en un yeso circular. Posteriormente, dividía la escayola y fijaba dos barras para distraer a lo largo de las mismas. Con esta técnica, conseguía un alargamiento de 5 cm en 30 días. Esta fue la primera vez que uno de los aparatos usados para distraer era portátil, permitiendo a los pacientes salir de la cama. Anderson⁽⁸³⁾ en la misma década, diseñó un dispositivo con una herradura conformada y un estribo para cada pin, mejorando el control rotacional.

En 1938 Bosworth trabajó mejorando la técnica del alargamiento óseo. Fue el primero en utilizar el término “distracción ósea” y abogó por la rigidez del marco. Sugirió la realización de un alargamiento a doble nivel, ya que según él, al hacer dos osteotomías dividía la fuerza de tracción en diferentes niveles del hueso.

Allan^(84, 85), en Birmingham en 1950 desarrolló su técnica de alargamiento en 105 pacientes. Realizaba una osteotomía con escoplo, aseguraba los fragmentos con agujas de Kirschner en varios planos para controlar los movimientos axiales, y las conectaba con barras roscadas para realizar una distracción controlada. Estableció un régimen de distracción de 1,6 mm al día, que se interrumpía si el paciente refería dolor. No disecaba las partes blandas, pues creía que la distracción lenta y progresiva también favorecería el crecimiento simultáneo del hueso y los tejidos vecinos. Con esta técnica consiguió la consolidación ósea en todos los pacientes.

Mientras estas técnicas se desarrollaban en Estados Unidos, los cirujanos europeos desarrollaban las suyas propias. En 1933, Cochrane^(71, 86) en Edimburgo adoptó la técnica de Abbot y enlazó Norteamérica con Europa. Las diferentes técnicas de alargamiento se fueron desarrollando por separado en diferentes hospitales europeos y americanos debido a la pobre comunicación entre ellos. Además, la falta de comprensión de la base biológica de la osteogénesis por distracción limitó seriamente el avance en este campo⁽⁷¹⁾.

Basándose en las observaciones de Bier de principios de siglo, Glucksman⁽⁸⁷⁾ realizó sus estudios in vitro ya en 1942, y estableció que la tensión promovía la formación de nuevo hueso en los tejidos osteogénicos, y determinó el patrón de la arquitectura ósea. En los años 50 Krompecher⁽⁸⁸⁾ introdujo el principio de “osificación desmoide directa”, para referirse a la formación de nuevo tejido óseo por distracción.

Wagner⁽⁸⁹⁾ en 1963 jugó un papel fundamental en el desarrollo de las técnicas modernas de alargamiento. Su técnica constaba de tres intervenciones: en un primer momento realizaba una osteotomía y colocaba un fijador monolateral que le permitía aplicar distracción. Separaba los dos fragmentos 5 mm, sin periodo de latencia, y distraía entre 1,5 a 3 mm al día. El tejido así obtenido no era de buena calidad, por lo que necesitaba de técnicas adicionales. En un segundo tiempo, añadía injerto y una placa a la zona distraída, y retiraba el fijador externo. Restringía el apoyo. La tercera cirugía era necesaria para retirar la placa (fig.10). El procedimiento era fácil técnicamente y seguía las ideas de la época, por lo que se extendió rápidamente por EEUU y Europa, sobre todo en Alemania⁽⁷¹⁾. Sin embargo, esta técnica no ofrecía mayores ventajas (en cuanto a la movilización temprana del paciente) e ignoraba los principios biológicos de la osteogénesis por distracción.

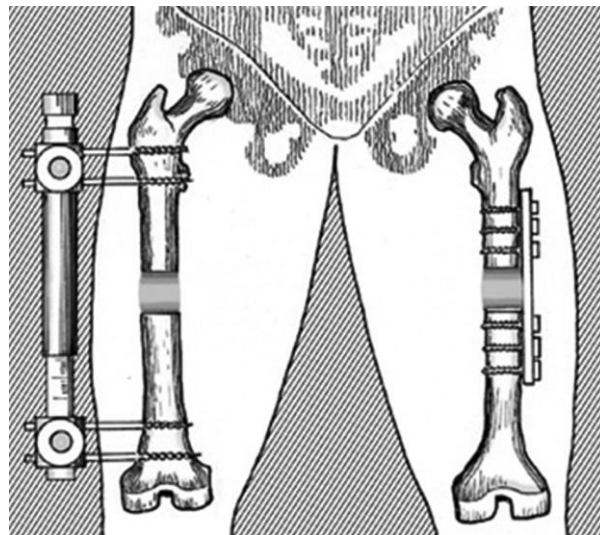


Fig. 11: Representación de la primera fase del sistema de Wagner en el fémur derecho y de la segunda en el izquierdo⁽²⁶⁾.

En paralelo a los trabajos de Wagner, Ilizarov trabajaba en Kurgan, Siberia, durante la guerra de los Balcanes, y comenzó a utilizar la técnica que unificaría al fin

los principios quirúrgicos y biológicos del alargamiento óseo. Diseñó un fijador externo circular que se conectaba al hueso mediante un sistema de agujas transfixiantes tensadas. Los anillos se interconectaban entre sí mediante barras roscadas. Con este sistema conseguía controlar las desviaciones en todos los planos del espacio. La primera vez que lo utilizó fue en 1951, como tratamiento de defectos óseos provocados por la tuberculosis.

Las investigaciones que realizó Gavril A. Ilizarov (fig.11) lo llevaron al planteamiento del principio biológico de tensión-estrés que se basaba en la estimulación de la regeneración y crecimiento de los tejidos durante la distracción. Este principio lo explicó como: “La tracción gradual sobre los tejidos vivos crea un estrés que puede estimular y mantener la regeneración y el crecimiento activo de ciertas estructuras tisulares. Los tejidos sometidos a una tracción lenta y constante son activados metabólicamente, un fenómeno caracterizado por la estimulación de las funciones celulares, tanto proliferativas como sintéticas. Estos procesos regenerativos dependen de una adecuada vascularización y del efecto estimulante del apoyo de peso”.



Fig. 12: G. A. Ilizarov⁽²⁶⁾.

En 1952 ^(77, 90), Ilizarov presentó su fijador circular (fig. 12), y perfeccionó su técnica. En 1954 comenzó a utilizarlo para el tratamiento de pseudoartrosis combinando compresión local y distracción. Tras distraer un segmento, comprimía, lo que favorecía la transformación del tejido cartilaginoso de la interfase en nuevo hueso. En 1956 añadió a sus indicaciones el tratamiento de deformidades de las extremidades.

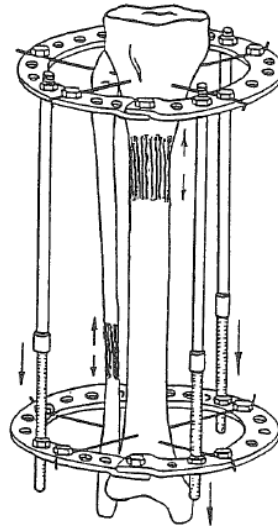


Fig. 13: Representación del fijador diseñado por Ilizarov en 1951 ⁽⁷¹⁾.

En 1969 informó del éxito conseguido al realizar alargamientos sin aporte de injerto. Simplemente usaba el estímulo de la distracción aplicada, unida a una corticotomía “especial” que preservaba la vascularización medular y perióstica. Mantenía un periodo de latencia y distraía a un ritmo no mayor de 1 mm al día.

Por tanto, los principios del tratamiento del Ilizarov fueron⁽²⁶⁾:

- Gran calidad biológica del hueso regenerado debido al empleo de una corticotomía percutánea con mínimo daño al periostio y médula ósea.
- Periodo de latencia postoperatorio.
- Distracción total de 1 mm/día en varios pasos.
- Uso de compresión y distracción permitiendo carga completa de la extremidad.
- Uso de un fijador circular donde los fragmentos se sujetan mediante agujas de Kirschner tensadas, lo que permite al cirujano controlar los fragmentos en todos los planos y corregir deformidades.
- Desarrollo de transportes óseos para defectos del eje del hueso.
- Promover buena nutrición del hueso y la movilidad articular por medio de un sistema que permita la carga completa y la fisioterapia.

Usando esta técnica era capaz de inducir la formación de nuevo hueso en el lugar del alargamiento, y estableció las indicaciones de su sistema de distracción:

- Tratamiento percutáneo de fracturas metafisarias, diafisarias y epifisiolisis.
- Reparación de daños extensos del hueso, nervios, vasos y partes blandas en una sola cirugía y sin necesidad de injerto.
- Engrosamiento óseo.
- Tratamiento percutáneo en un tiempo de la pseudoartrosis traumática o congénita.
- Alargamiento de extremidades o retardos del crecimiento mediante distracción fisaria y otros métodos.
- Corrección de deformidades de huesos largos y articulaciones, incluyendo el pie zambo.
- Eliminación percutánea de contracturas articulares.
- Tratamiento de artrosis mediante osteotomías y reorientación de las superficies articulares.
- Artrodesis percutánea.
- Relleno de quistes óseos solitarios u otras lesiones similares.
- Tratamiento de las pseudoartrosis infectadas favorecida por la influencia de la distracción-compresión.
- Relleno de cavidades osteomielíticas por el engrosamiento gradual de las paredes de la cavidad.
- Alargamiento de muñones amputados.
- Tratamiento de la hipoplasia de mandíbula y condiciones similares.
- Superar enfermedades vasculares oclusivas sin necesidad de bypass.
- Corrección de la acondroplasia y otros dimorfismos.

Aunque inicialmente sólo se utilizó en Rusia, la difusión que se dio a la técnica, unida al gran número de complicaciones asociadas a la de Wagner, hizo que terminara sustituyéndola. Fueron los italianos los que “dieron a conocer” el fijador circular de Ilizarov a principios de los ochenta desplegando un nuevo horizonte en la Ortopedia.

También durante los años 50 aparecen intentos de alargamientos óseos usando implantes intramedulares. Pais⁽⁹¹⁾ fue el primero en llevar a cabo una distracción a

través de un clavo endomedular. Otros como Küntscher y Bertrand usaron los años siguientes clavos intramedulares estrechos, unidos al sistema de Abbot para evitar las desviaciones.

Los alargamientos por medio de distracción fisaria comenzaron con Ring en 1958 y posteriormente fueron retomados por Ilizarov. Posteriormente fueron abandonados temporalmente.

En la década de los 70 y los 80, De Bastiani⁽⁸¹⁾ retomó los trabajos de Ilizarov en Italia, y modificó su técnica, usando un fijador dinámico unilateral. Reconoció que la fijación externa permite la aplicación de cargas controladas en el foco de fractura y utilizó el término de dinamización⁽⁹²⁾.

El mismo Ilizarov, repitió alguno de sus experimentos para determinar la influencia del ritmo de distracción sobre la osificación^(20, 21), llegando a la conclusión de que el ritmo óptimo era de 1 mm/24 h. Velocidades de distracción mayores producían retardo en la osificación, e incluso ausencia de consolidación, y regímenes más lentos, podían provocar consolidaciones tempranas del hueso regenerado.

En Estados Unidos, varios ortopedistas se han dedicado desde los años 70 a la actualidad a desarrollar este tema. Uno de los más relevantes en este campo es Dror Paley⁽²⁸⁾, quien publicó en los 80 los resultados obtenidos tras el tratamiento por medio de un fijador tipo Ilizarov de un grupo de pacientes con pseudoartrosis de tibia, con distintos grados de defecto óseo y deformidad. En su trabajo establece las consideraciones técnicas a tener en cuenta para determinar los niveles de fijación, el montaje del fijador y el nivel de las osteotomías en función del tipo de pseudoartrosis, las cuales clasifica en A (si el defecto óseo es menor de 1 cm) y B (si es mayor de 1 cm). Además, cada grupo se divide en 3 subgrupos: A1 si la pseudoartrosis es móvil, A2.1 si es fija, y A2.2 si es fija y presenta deformidad, B1 cuando presenta sólo el defecto óseo, B2 si presenta pérdida de longitud y B3 cuando se unen defecto óseo y acortamiento asociado.

En su trabajo incluye a 25 pacientes, con una edad media de 34 años, todos con defectos tipo B de diversas etiologías, y con un seguimiento mínimo de 6 meses, y divide sus resultados en funcionales y estado óseo. En 23 casos ambos resultados fueron

buenos o excelentes, en dos pobres y en uno malo. Concluye que se pueden conseguir excelentes resultados en cuanto a recuperación del defecto óseo, pero ello no garantiza un buen resultado funcional, que además se verá influido por el estado vasculonervioso, de partes blandas y de las articulaciones adyacentes al hueso afecto.

En 1988⁽⁹³⁾, en otro de sus trabajos sobre técnicas en alargamientos óseos, Paley hace una revisión de los trabajos más relevantes publicados a cerca de distracción ósea, distracción fisaria y alargamientos en pacientes acondroplásicos. Estableció las que considera mejores estrategias terapéuticas entre las existentes hasta entonces, basándose en principios biológicos y mecánicos.

Es así como Dror Paley con la asistencia de John Herzenberg, publicó en 2002 su libro “Principios de la corrección de deformidades”⁽⁹⁴⁾, que es el referente actual para la cirugía de reconstrucción de las extremidades, donde se fundamentan las bases geométricas para la corrección de deformidades, desarrollando el método para la rotación de la angulación de la deformidad (CORA). El CORA se define como la intersección de los ejes proximal y distal del hueso. Dichos ejes se establecen a partir de unos límites establecidos como proximales y distales para cada hueso, y situados a nivel de las articulaciones adyacentes. Las líneas axiales forman 4 ángulos centrados en el CORA. Estos ángulos se denominan proximal, distal, medial y lateral. El proximal y distal son iguales, así como el medial y lateral entre ellos. Las líneas que dividen cada uno de esos ángulos en dos iguales se denominan bisectores, y suponen la base sobre la cual los autores establecen los niveles y tipos de osteotomía a realizar para corregir la deformidad del miembro en cuestión.

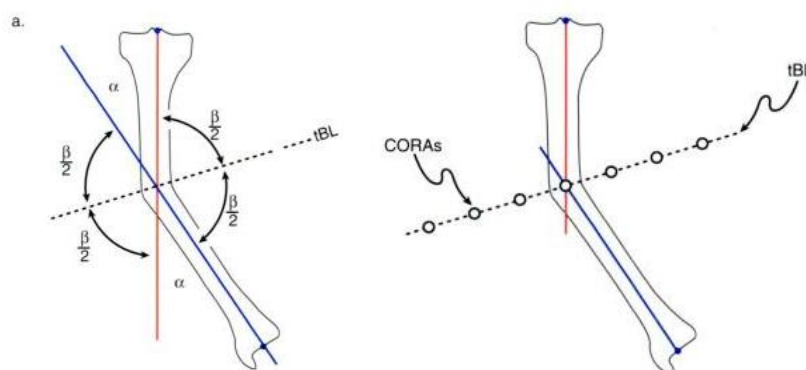


Fig. 14: Representación de la línea bisectriz que divide un ángulo en dos iguales y del CORA como cualquier punto de la línea bisectriz transversa⁽⁹⁴⁾.

7.2 Evolución de la experimentación en la osteogénesis por distracción

Callo de distracción

Conocer la morfología anatomopatológica del nuevo hueso formado durante el proceso de la callostasis y sus diferencias con el callo óseo habitual en la consolidación normal de las fracturas, se hace fundamental para poder entender el proceso de la osteogénesis por distracción, siendo ampliamente estudiado a lo largo de los años.

Desde el comienzo del desarrollo de la técnica se ha insistido en la necesidad de controlar ciertos factores para su éxito⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾, el mantenimiento adecuado del aporte sanguíneo, el establecimiento de la rigidez adecuada del sistema de fijación, el control del periodo de latencia antes de comenzar la distracción, el ritmo de la misma, y/o el control del periodo de consolidación, son prioritarios para favorecer la maduración del nuevo hueso.

El desarrollo y la investigación de estos puntos se han llevado a cabo de forma independiente, en distintos modelos animales y con distintos sistemas de fijación del segmento a transportar. Esto ha provocado grandes controversias en los resultados, ocasionados debido a la variabilidad en la estabilidad de los sistemas de fijación^(51, 55, 56), en los ritmos de distracción^(20, 30-33), en los tipos de osificación observados durante el proceso^(8, 31, 32, 34, 35) o en el tamaño del segmento usado para el transporte⁽⁵⁸⁾.

De Pablos en 1986⁽³¹⁾, en sus estudios en distracción fisaria en ovejas, concluye que a mayor ritmo de distracción, mayores son las diferencias estructurales entre el cartílago de crecimiento del miembro distraído y el control. Además, establece que el tipo de osificación que se produce es de tipo intramembranoso, salvo en la región fisaria, donde es de tipo endocondral. En 1989⁽³⁰⁾ realizó un estudio similar en ovejas, aplicando distintos ritmos de distracción, obteniendo resultados similares a los ya reportados previamente.

Ilizarov, también en la década de los 80, estudió la importancia de múltiples factores empleando perros^(20, 21). El trabajo constó de dos partes. Para la primera⁽²¹⁾ usó 120 perros, clasificados en dos poblaciones en función del tipo de osteotomía tibial (a cielo abierto vs percutánea con osteoclasia final). En todos se aplicó su sistema de

fijación externa circular. Estos dos grupos fueron divididos a su vez en otros 6, en función de la frecuencia de distracción. Llegó a la conclusión de que una frecuencia de distracción diaria de 1 mm/día era lo óptimo, y que la preservación de las estructuras circundantes al hueso, así como la médula ósea en el momento de la osteotomía, eran fundamentales para la osteogénesis. Durante la segunda fase de su estudio⁽²⁰⁾ analizó 480 perros, divididos en 5 grupos, a los que aplicó el sistema circular de fijación externa, pero con grado creciente de rigidez (establecido por el número de agujas de Kirschner y aros empleados) y con distintos grados de daño en la medular ósea. A menor grado de estabilidad del fijador obtuvo mayor índice de falta de osificación. En todos los casos, el nuevo hueso creció paralelo a las fuerzas de tensión (como se ha demostrado posteriormente por otros autores⁽⁹⁵⁾), a partir de células de estirpe fibroblástica que aparecían inicialmente en el centro del callo óseo. Se producían fibras de colágeno sobre las cuales se aponía el osteoide, determinando una osificación membranosa. Las islas de cartílago se deberían a las fuerzas de flexión debido a una fijación inestable. La médula mostró una alta capacidad de osteogénesis, incluso en los casos en que quedó totalmente separada del tejido circundante, lo que demuestra su gran importancia en la neoformación ósea.

Posteriormente, se han desarrollado múltiples estudios intentando determinar el tipo de osificación presente. Así, Kojimoto⁽⁸⁾ en sus pruebas en conejos, hablaba de la existencia de cartílago elongado junto con tejido fibroso en el gap de distracción en estadios iniciales. Dicho tejido posteriormente era sustituido por fibrocartílago, llegando a fusionarse con el mismo en los extremos del gap, y dando lugar a una osificación endocondral. Sin embargo, otros estudios anatomopatológicos^(32, 35) e incluso histomorfométricos⁽³⁴⁾ hablan de la presencia de ambos tipos de osificación.

En 1994, Kallio⁽³⁷⁾ realizó un estudio en ovejas, con un sistema de fijación tipo Ilizarov, obteniendo resultados similares a dicho autor en cuanto al tipo de osificación (intramembranosa en este caso) y a la mineralización de la matriz ósea al analizar las piezas obtenidas aún durante la fase de distracción (a los 3, 5, 7 ó 14 días). Justificaba los resultados tan desiguales a los de Kojimoto⁽⁸⁾ en base a las diferencias en las rigideces de los montajes. En 2003 Fink⁽³⁴⁾ publica sus resultados tras un estudio histomorfométrico de la región endóstica (excluye la perióstica), encontrando solo un 20% de tejido fibroso a los 25 días de consolidación y un 4% de tejido cartilaginoso.

Además, en un segundo grupo estudiado a los 50 días de consolidación, el porcentaje de volumen óseo respecto al total del hueso aumenta, junto con el grosor de las trabéculas óseas, y concluye que la osificación predominante es intramembranosa, si bien, aparecen áreas de osificación endocondral en porcentaje variable y de tejido fibroso, que achaca a la posibilidad de la existencia de micromovimientos en la zona del hueso regenerado por déficit de estabilidad del fijador.

Durante años se ha mantenido el debate sobre el tipo o tipos de osificación presentes al realizar un transporte óseo^(20, 32, 34, 37, 53, 54), y de si ésta varía en función de la realización de osteotomías o corticotomías^(22, 95). Así por ejemplo, Karaharju⁽⁹⁵⁾ concluyó en sus estudios que se producen los mismos mecanismos de osificación cuando la distracción es a través de la placa fisaria que a través de una osteotomía, produciéndose en el primer caso una hipertrofia de toda la placa de crecimiento, y observándose una osificación centrípeta en el caso del hueso osteotomizado. En este segundo caso, a las 4 semanas de distracción, casi todo el *Woven Bone* ha sido sustituido por hueso maduro. Krawczyk⁽²²⁾ estableció que al practicar las osteotomías de forma percutánea, y preservar el periostio, la osificación es más homogénea, rápida y de mayor calidad. Además, en los grupos estudiados a las 5 y en menor cantidad a las 9 semanas de consolidación, se encontraron focos de osificación endocondral, sobre todo en las regiones centrales del callo, mientras que en los grupos de 9 y 14 semanas de evolución, se observó osificación de tipo endomembranosa, sobre todo en la región más cercana al periostio. Claes en 2010⁽⁵⁴⁾, desarrolla un nuevo método de distracción lateral, determinando que al no actuar en estos casos fuerzas de compresión, ni de deformidad inducida por la musculatura, la osificación que se encuentra es puramente intramembranosa

Ha sido discutido el rol de la vascularización proveniente de las estructuras perióseas presentes⁽³⁸⁾ en la importancia de la rigidez del montaje y la distribución de fuerzas a través del mismo, posiblemente debido a la heterogeneidad de los estudios realizados previamente. En 2010 Forriol⁽³⁵⁾ presentó nuevos resultados sobre distracción ósea en 24 ovejas de pequeño tamaño. Les aplicó un sistema de fijación unilateral y las clasificó en tres grupos en función de la velocidad de distracción. Describió la existencia de mayor cantidad de tejido fibroso a mayor velocidad de distracción y una mayor cantidad de tejido cartilaginoso con velocidades intermedias de distracción,

disminuyendo en proporción a medida que avanzaba el periodo de consolidación. Todas las ovejas fueron sacrificadas durante la fase de consolidación y en todas se halló ambos tipos de osificación, endocondral e intramembranosa, en porcentajes diferentes en función del momento del sacrificio.

Durante décadas se ha considerado que la carga mecánica controlada supone un estímulo importante para el desarrollo y maduración del callo óseo en el proceso de consolidación de las fracturas^(41, 43). Apoyándose en estos estudios, se han desarrollado distintos modelos animales para analizar el comportamiento mecánico e histológico del callo en la osteogénesis por distracción en función de la carga. Sin embargo, son muy pocos los trabajos en los que se especifica concretamente el tipo de carga realizada: si se permite la carga de la zona intervenida, si se realiza desde el primer día o, simplemente si dicha carga fue completa. Radomisli et al⁽⁴²⁾ compararon mediante técnicas inmunohistoquímicas dos poblaciones de ratas sometidas a distracción ósea. A la mitad de los especímenes se les permitió la carga y a la otra mitad se le amputó la pata distalmente a la osteotomía para impedir la carga sobre la extremidad. Publicaron un aumento de expresión de colágeno tipo II en el grupo de descarga, mientras que en el grupo que mantenía la carga se producía una elevación de marcadores de formación ósea (osteocalcina y BMP 2/4) y colágeno tipo I.

En el año 2000 Lutz Claes presentó los resultados de sus estudios en cuanto a influencia de la rigidez del fijador sobre la osificación del callo de transporte óseo⁽⁵⁵⁾. Pretendía determinar el efecto de los movimientos axiales interfragmentarios y establecer cuál es el límite óptimo demostrando que la dinamización de fijador con los suficientes movimientos axiales interfragmentarios, favorece la maduración del nuevo callo formado, mientras que grandes movimientos axiales lo inhiben. Para ello usó un fijador circular y realizó un transporte óseo en 32 ovejas adultas. Estudió las diferencias medidas en imágenes de Tomografía Axial Computarizada (TAC) en cuanto a osificación al mantener el fijador estático, o dinamizarlo con distinto rango de movimiento (0,5mm, 1,2 y 3mm). Tras 12 semanas concluyó que cuanto más movimiento se permitía, más se estimulaba el callo en las zonas corticales del defecto, pero menos en el centro, llegando a ausencia de consolidación en el grupo de 3 mm y que la dinamización de la distracción durante la maduración con movilidad inicial axial de 0,5 mm, favorecía la maduración más que la fijaciones estáticas o muy dinámicas.

Más tarde, en 2007 plantea la hipótesis de que la distracción temporal acelera la curación de las fracturas mediante la tensión inducida sobre el foco de fractura⁽⁵¹⁾, en comparación con la fijaciones flexibles sin procedimiento de distracción. Para ello repitió sus estudios en ovejas, generando en este caso un gap de 3 mm intraoperatoriamente. Un grupo siguió el protocolo de distracción de 0,5 mm/12 h durante dos días, y compresión de 1 mm/12h el tercer día, de manera que el gap final era de 3 mm. El segundo grupo quedó con fijación estática. No se encontraron diferencias en cuanto a mineralización en el TAC ni histológicas. Sin embargo, el grupo sometido a distracción presentaba mejor distribución de la rigidez frente a la flexión en el callo. Concluye que la tensión adicional inducida mejora el proceso de curación ósea, lo cual sería útil para su aplicación en el tratamiento de pseudoartrosis y retardos de consolidación.

Posteriormente, se ha intentado determinar^(39, 40) en qué momento dichos cambios biológicos se convierten en diferencias medibles en el callo. En un estudio con similar metodología quirúrgica al previo⁽⁴⁰⁾, se observó, que aunque el callo óseo obtenido del grupo de ratas en descarga era de menor volumen que el de las sometidas a carga, durante las pruebas biomecánicas todos los especímenes de ambos grupos presentaron una fractura transversa en la zona de unión de hueso neoformado y la cortical preexistente. Pudo además observarse, que los huesos de los animales sometidos a cargar eran más fuertes, rígidos, menos dúctiles y duros que los de los animales en descarga, aunque sin diferencias significativas. Sin embargo, el contenido mineral cuantitativo de ambos grupos era el mismo.

El grupo chino de Leung et al⁽³⁹⁾ utilizó animales de mayor tamaño para constatar dichas diferencias. Analizó 2 grupos de 12 cabras, en las que realizó una osteotomía en tibia y aplicó un sistema de fijación externa monopiano a distracción. Al grupo al que se permitía la carga, se le aplicó un manómetro conectado a un sistema informático para registrar la carga transmitida a la pata en estudio. En los estudios radiográficos se constató una mayor anchura del callo de la zona de distracción en dicho grupo respecto al contrario. Anatomopatológicamente se determinó, con diferencias significativas, mayor cantidad de *Woven Bone* y mineralización en el grupo sometido a carga, lo que se interpretó como la existencia de un efecto aditivo entre la distracción y la compresión por la carga. Sólo fue identificada osificación de tipo membranoso. A pesar de todo,

dicho trabajo presenta importantes defectos de validez interna ya que se administró Buprenorfina local en la zona intervenida para evitar el dolor y favorecer que los animales cargaran en el postoperatorio, lo cual podría alterar la carga en condiciones fisiológicas. En adición, la rigidez del sistema monoplano difiere de la biomecánica que aportan los sistemas de fijación circular que se suelen emplear para la distracción desde hace años.

Zimmermann⁽⁹⁾ en 2004, en estudios sobre mandíbulas porcinas, concluye que la dirección de la osificación es perpendicular a la dirección de la osteotomía, paralela a la dirección de las fibras de colágeno y fundamentalmente de tipo perióstica. El número de osteoblastos hallados fue inversamente proporcional a la velocidad de distracción, todo el hueso encontrado fue de tipo *Woven Bone* y no se identificó tejido cartilaginoso. En dicho estudio no hubo fase de latencia previa.

Docking Site

El *Docking Site* no ha sido tema de estudio tan extenso como el callo en la distracción ósea o en el transporte óseo. Sin embargo, en casi todos los trabajos publicados hasta la fecha se ha descrito la existencia de problemas de consolidación del mismo⁽⁹⁶⁻¹⁰¹⁾. Mekhail⁽¹⁰⁰⁾ en 2004, tras revisar a un grupo de pacientes con defecto óseos tibiales reconstruídos mediante transporte óseo, encuentra como complicación más frecuente la ausencia de consolidación del *Docking*, llegando a refracturarse en algunos casos, motivo por el cuál aboga por la protección del mismo tras la retirada del distractor y por el aporte temprano de injerto. En el mismo año, De Coster⁽⁹⁶⁾ también identifica la falta o retardo de consolidación de dicha zona como el principal problema de los pacientes sometidos a transporte óseo.

Giotakis⁽⁹⁷⁾, en su artículo de 2007, ya habla de los problemas referentes a la falta de consolidación del *Docking*, que podrían deberse a la no existencia de la cascada reparativa normal por encontrarse ambos segmentos óseos separados, y/o a la existencia de tejido fibroso interpuesto entre ambos extremos, y hace un repaso por las distintas técnicas empleadas, tanto abiertas como cerradas, para favorecerla. Revisa a 33 pacientes, tratados mediante distintos métodos: acortamiento en fase aguda de la extremidad, aplicación de injerto óseo, desbridamiento del tejido fibroso interpuesto en el lecho y la técnica del “acordeón” (compresión-distracción una vez finalizado el

transporte), concluyendo que la consolidación del *Docking Site* es impredecible, más complicada cuanto más se retarde la aposición de los segmentos óseos, y que no hay una técnica ideal.

Entre los resultados publicados en los últimos años, algunos de los más concluyentes han sido reportados por García⁽³⁶⁾ en 2009. Estudió mediante histomorfometría el callo regenerado y el *Docking Site*, obtenidos tras transportar con un sistema de placas y alambres un segmento de 2,5 cm en ovejas adultas, a las cuales mantenía en descarga tras seccionar el tendón calcáneo. Concluyó que la osificación predominante es intramembranosa en la zona regenerada, mientras que en el *Docking Site* es fundamentalmente de tipo endocondral. Asimismo, describe la distribución de los distintos tipos de tejido en las diferentes áreas estudiadas, observándose cómo a mayor tiempo de consolidación, mientras que el porcentaje de vasos, tejido fibroso y cartílago disminuía progresivamente en las tres zonas a estudio (zona cercana al segmento proximal, zona intermedia y zona distal), el % de tejido óseo aumentaba en las mismas. Al realizar un estudio más pormenorizado, se observó cómo mientras que en la región más proximal el tejido predominante era el fibroso sobre el óseo al inicio del proceso, en la región más distal, los resultados eran opuestos. Por el contrario, en el *Docking Site*, el tejido predominante era el cartilaginoso en fases iniciales, siendo superado por el tejido óseo a mayor tiempo de consolidación. La cantidad de tejido fibroso se mantenía estable a lo largo del proceso.

Lovisetti⁽⁹⁹⁾, en 2011, compara dos cohortes de pacientes, una de ellas tratada mediante compresión simple del *Docking Site* una vez finalizado el transporte y la otra mediante reapertura del foco, desbridamiento y aporte de autoinjerto, consolidando el 100% de los casos, y no encontrando diferencias significativas en los resultados en cuanto al tiempo de aplicación del fijador, las complicaciones ni los resultados funcionales. El mismo autor, en 2013⁽⁹⁸⁾, compara otros 3 grupos de pacientes en los que trata la ausencia de consolidación del *Docking* con compresión, desbridamiento abierto y aporte de autoinjerto, y desbridamiento endoscópico y autoinjerto, no encontrando evidencia en cuanto a la superioridad de una técnica sobre otra. La simple compresión podría generar isquemia del tejido fibroso interpuesto, estimulando al tejido cartilaginoso presente en el *Docking* hacia la osificación. Además es menos costoso y presenta menos complicaciones. Sin embargo, lo impredecible de sus resultados ha

hecho que ante la presencia de una pseudoartrosis se abogue por el desbridamiento más aporte de injerto.

La técnica del desbridamiento artroscópico del *Docking Site* ya fue descrita por Robinson en 2010⁽¹⁰²⁾ concluyendo que se obtenían los mismos buenos resultados que con el desbridamiento abierto pero minimizando las complicaciones. El grupo de Sala⁽¹⁰³⁾ en 2013 realizó un estudio comparativo entre desbridamiento abierto frente a endoscópico, no encontrando diferencias significativas en los resultados o complicaciones entre ambas técnicas, salvo por el mayor coste económico de la técnica endoscópica.

Nagashima⁽¹⁰¹⁾ en 2012 estudia histológicamente el *Docking Site* tras realizar un transporte óseo en mandíbulas de perro, observando que se forman excrecencias óseas cónicas en ambos extremos del mismo, lo que puede impedir la correcta aposición de los extremos. En la mitad de los casos sometidos a transporte óseo describe ausencia de consolidación del *Docking*, donde aparece además tejido fibroso interpuesto.

El estudio anatomopatológico tanto del callo de transporte óseo en todas sus etapas, desde el inicio de la fase de distracción, hasta el final de la consolidación, así como del *Docking Site*, ayudaría a esclarecer las lagunas existentes aún en la actualidad en este campo y que son motivo de discusión científica. La determinación específica de dicho proceso podría ayudar en la creación de modelos mecanobiológicos que permitieran a los profesionales trabajar con herramientas “ex vivo” que ayudarían tanto a la planificación de cualquier actuación sobre dichos defectos, como a la predicción de sus resultados. Del mismo modo, dichos modelos establecerían entornos de simulación que permitirían innumerables ensayos biomecánicos sin los elevados costes, en recursos y en tiempo, derivados de la experimentación animal.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

La osificación del callo obtenido mediante transporte óseo con mantenimiento de la actividad motriz es de tipo mixto.

La ocupación vascular en el callo de transporte óseo varía a lo largo del tiempo cuando se permite la actividad motriz.

La osificación del *Docking Site* es de tipo mixto y más lenta que la del callo de transporte óseo.

La vascularización del *Docking Site* difiere de la del callo de transporte.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar el desarrollo de la estructura histológica y vascular del callo de transporte óseo y el *Docking Site* con sistemas de fijación externa circulares en huesos sometidos a actividad motriz.

2.2 Objetivos específicos

Determinar la estructura histológica y vascular en los diferentes estadios de formación del callo de transporte óseo sometido a actividad motora.

Comparar la estructura histológica y vascular en los diferentes estadios de formación del callo.

Determinar la distribución espacial y temporal de los tipos de osificación presentes y la neovascularización, desde el inicio del proceso de transporte del segmento móvil hasta el final de la fase de consolidación.

Determinar el patrón vascular y de osificación del *Docking Site* y la existencia o no de retardos en la consolidación.

MATERIAL

MATERIAL

1. Sujetos del estudio

10 ovejas de raza merina (Fig. 15).

- Criterios de Inclusión:

- Hembras adultas.
- Edad 3-5 años.
- Peso 37-66 kg.
- Metatarso con longitud superior a 14 cm.
- Diámetro mínimo del hueso en la zona más delgada igual o mayor a 12 mm.

- Criterios de Exclusión:

- Secuelas de lesiones previas en la piel o hueso de la pata a intervenir.
- Malformaciones óseas en la las patas, o que provoquen una marcha alterada del animal.
- Infecciones activas, locales o sistémicas, que puedan complicar el postoperatorio o impedir la adecuada colocación del distractor.
- Intervenciones quirúrgicas previas en el miembro a distraer.

Para la fase experimental se obtuvo la autorización del Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla, que trata de garantizar el respeto a la integridad, dignidad e identidad del ser humano, y asegurar el bienestar de los animales utilizados como modelos experimentales en investigación o en prácticas docentes.



Fig. 15: Animales seleccionados para el estudio.

2. Modelo y diseño del distractor óseo

El distractor empleado es un fijador tipo Ilizarov, con capacidad para mantener la rigidez de la pata del animal a pesar de la discontinuidad derivada de las osteotomías y la osteotomía. Es una optimización del fijador empleado por Claes et al (2000) en sus trabajos experimentales⁽⁵⁵⁾, reduciendo el peso del mismo al máximo, pero manteniendo la capacidad portante. Además se ha instrumentado, disponiendo de zonas en las que se instalan 6 células de carga, que junto con una plataforma permiten medir las fuerzas que en cada momento atraviesan al callo de transporte cuando el animal camina^(104, 105). El diseño ha sido realizado por los ingenieros del Departamento de Ingeniería Mecánica de la Escuela Superior de Ingenieros de Sevilla^(3, 9, 20, 51, 55) (Tabla 1).

Dicho dispositivo está formado por dos aros, que rodean la extremidad, cuatro barras verticales y cuenta con un sistema de deslizamiento que permite realizar el transporte del segmento de metatarsiano seleccionado (Figs. 16 y 17).

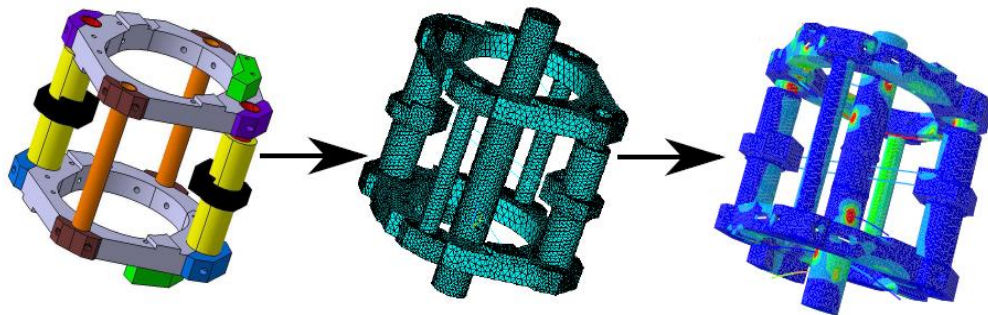


Fig. 16: Diseño del distractor empleado por Claes⁽⁵⁵⁾, tras su optimización en peso y tamaño.

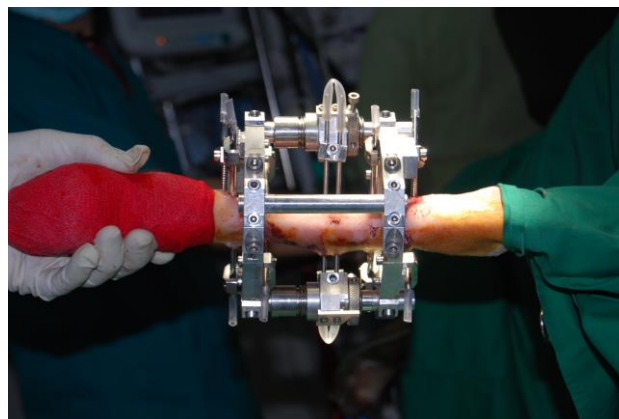


Fig. 17: Resultado final tras la colocación del fijador.

Tabla 1: Materiales y elementos que componen el distractor (int: interno, ext: externo, prox: proximal).

Pieza	Diámetro (mm)	Material
Aro	16 x 105 x 12	Aluminio
Barra fija	Ø 11 x 97	Aluminio
Barra móvil roscada	Ø máximo 20 x 106	Aluminio + Acero Inoxidable
Pin transfixiante distal ext	Ø 4 x 150	Acero Inoxidable
Pin transfixiante distal int	Ø 4 x 150	Acero Inoxidable
Pin transfixiante prox ext	Ø 4 x 150	Acero Inoxidable
Pin transfixiante prox int	Ø 4 x 150	Acero Inoxidable
Agujas transporte	Ø 3 x 100	Acero Inoxidable
Pin unicortical proximal	Ø 4 x 100	Acero Inoxidable
Pin unicortical distal	Ø 4 x 100	Acero Inoxidable
Abrazaderas agujas	17 x 10 x 7	Acero Inoxidable
Tuercas distracción	Ø máximo 20 x 25	Acero Inoxidable
Tornillos control distracción	M4 x 10	Acero Inoxidable
Guía de Sierra		Acero Inoxidable

Los aros sirven de apoyo a los pines que fijan el hueso, a los cuales se unen con bridas metálicas atornilladas. En cada aro se engarzan dos clavos de Schanz transfixiantes formando un ángulo de 30° entre ellos, y otro unicortical. La fijación del segmento a transportar se realiza mediante dos agujas paralelas transfixiantes.

3. Útil guía del sistema de corte

Para asegurar la realización de osteotomías estandarizadas (similares y paralelas en todas las piezas) se ha diseñado una pieza guía para la hoja de sierra, que se engarzaba paralela a las barras, a presión en el aro proximal, y se fija con un tornillo adicional de seguridad (Fig. 18).

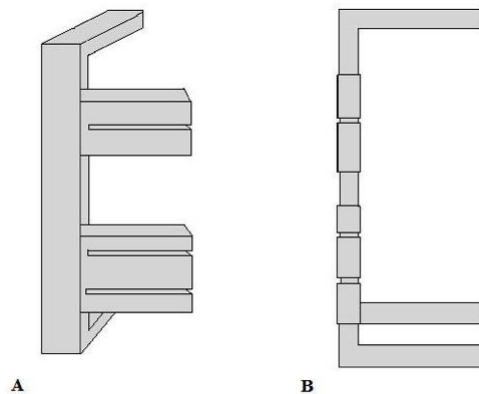


Fig. 18: Esquema del útil guía de la sierra de corte para las osteotomías. A: visión frontal. B: visión lateral.

4. Útil director de pines y agujas

Para evitar alteraciones en la trayectoria de los pines del fijador que pudieran suponer altas sobrecargas en el hueso, se emplea un dispositivo guía, diseñado por el Departamento de Ingeniería Mecánica de la Escuela Superior de Ingenieros de Sevilla, que minimiza la iatrogenia que pudiera generarse al introducir los 6 pines del fijador y las dos agujas de transporte (Fig. 19). Sus componentes se recogen en la tabla 2.



Fig. 19: Visión general del útil guía con una de las patas de prueba.

Tabla 2: Relación de los elementos y materiales que compondrán el útil guía.

Pieza	Diámetro (mm)	Material
Barra directora	Ø 14 x 200	Acero Inoxidable
Guía	30 x 30 x 70	Acero Inoxidable
Patas ajustables	Ø 8 x 110	Acero Inoxidable
Sistema sujeción pata	5 x 170 x 20	Acero Inoxidable
Portamanguitos	25 x 50 x 60	Acero Inoxidable
Sistema sujeción hueso	10 x 10 x 40	Acero Inoxidable
Guía	Ø 8 x 60	Acero Inoxidable
Pin	Ø 4 x 200	Acero Inoxidable
Tuercas	M8	Acero Inoxidable

Dicho dispositivo está compuesto por seis barras paralelas tres a tres, unidas por dos piezas planas exteriores que sirven de eje a dos piezas guía, que se deslizan gracias a casquillos de bronce autolubricados y pueden fijarse en el punto de inserción de los pines.

Las barras de apoyo del sistema son roscadas y permiten regular la altura a la que se trabaja.

A las guías deslizantes se les incorpora un “portaguías” acoplado con 4 tornillos, con la inclinación adecuada para los clavos de Schanz y agujas de Kirschner, diseñado con tres posibilidades de angulación para cada uno y que dispone de orificios para las guías de pretaladro y taladro de los clavos (para minimizar el daño durante la entrada de los mismos).

Para evitar cualquier tipo de movimiento durante la intervención disponemos de un sistema de fijación a la pata compuesto por una guía para clavo de Schanz de 4 mm de diámetro, que fija el segmento que se extirpa al realizar las osteotomías y un tornillo de bloqueo.

DISEÑO Y METODOLOGÍA

DISEÑO Y METODOLOGÍA

1. Contexto de la investigación

Para el desarrollo de los ensayos fue necesaria la coordinación y colaboración interdisciplinar entre traumatólogos, ingenieros y veterinarios, e interinstitucional entre la Escuela Superior de Ingenieros de Sevilla y la Facultad de Veterinaria de Córdoba.

Los animales fueron custodiados y cuidados clínicamente por el Departamento de Cirugía de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba en sus granjas, desde donde fueron trasladados a la Clínica Veterinaria del Campus Universitario Rabanales los 10 días previos a la intervención, para su familiarización con el entorno y el adiestramiento previo. Las intervenciones se efectuaron en el quirófano experimental de dicho centro. Tras la cirugía pasaron a cubículos de cuidado postquirúrgico, hasta el fin de los periodos de distracción-consolidación y su posterior sacrificio.

2. Desarrollo del procedimiento quirúrgico

Para garantizar el éxito de las intervenciones quirúrgicas minimizando el daño a los animales sujetos a experimentación, se hizo fundamental que el equipo médico (tanto los Veterinarios como los Traumatólogos participantes) se familiarizara con el material a utilizar, tanto quirúrgico como los distintos componentes del útil guía y el distractor, y determinaran y conocieran todos los pasos del protocolo a seguir, así como el montaje de las piezas.

Fase 1. Pruebas experimentales en laboratorio.- Para la protocolización del procedimiento y determinación de posibles defectos de diseño se realizó una primera fase de ensayos ex-vivo en el laboratorio de Ingeniería Mecánica de la Universidad de Sevilla.

Las semanas previas a la experimentación en animales vivos, se realizaron ensayos completos con el distractor y todos los útiles con patas de cordero aisladas, adquiridas tras los controles sanitarios reglamentarios (matadero de Sevilla). Dichos especímenes fueron congelados y custodiados en los congeladores del Departamento de Ingeniería Mecánica y de los Materiales en el Edificio de Laboratorios de la Escuela de Ingenieros.

Las patas fueron extraídas del congelador 8 horas antes del experimento para garantizar el estado natural de los tejidos en el momento de iniciarlo.

Fase 2.- Desarrollo del procedimiento “in vivo”.- Para que el proceso de curva de aprendizaje de la cirugía “in vivo” no influyera en los resultados del presente estudio se realizó la intervención de forma repetida en tres animales.

3. Protocolo de ensayo

- Preparación y adiestramiento de los animales.
- Intervención quirúrgica.
- Fase de latencia.
- Fase de transporte.
- Fase de consolidación.
- Fase de remodelación.
- Sacrificio del animal.
- Obtención y conservación de los especímenes.

Los ensayos y las pruebas de imagen se efectuaron en la Clínica Universitaria de Córdoba. Durante estas fases y tras el sacrificio de las ovejas se realizaron las pruebas de imagen necesarias (Radiografías seriadas y TAC) para el control del transporte.

4. Preparación y adiestramiento de los animales

Los animales fueron seleccionados en la granja de origen y trasladados 10 días antes a la Clínica Veterinaria de Córdoba. Una vez allí, quedaron al cuidado de los profesionales de dicha clínica, siendo alimentados y atendidos en todo momento por dicho personal.

Una semana antes de la intervención se realiza el adiestramiento de los animales. Consiste en hacerles caminar con un peso de similar cuantía al distractor en la pata seleccionada (posterior derecha en todos los casos), lo que simula al implante.

5. Protocolo operatorio

5.1 Proceso anestésico y colocación del animal

Para garantizar el ayuno previo a la cirugía y minimizar los problemas de regurgitación y timpanismo en el postoperatorio, se retira el alimento sólido 36 horas antes y el agua a 6 horas de la cirugía.

Una vez en la sala de preanestesia, se inmoviliza al animal, y se canalizaba la vena yugular externa. Como fluidoterapia, se emplea Ringer Lactato a un ritmo de infusión de 10 ml/kg/hora (LR®; BBraun VetCare, Barcelona, España).

Los animales se premedican con dexmedetomidina 4 µg/kg IV (Dexdomitor® 0,5 mg/ml; Orion Pharma, Espoo, Finlandia) y butorfanol 0,3 mg/kg IV (Torbugesic® 1%, Fort Dodge, Girona, España) y se administra una dosis única de cefazolina 20 mg/kg IV (Kurgan® 1gr; Laboratorios Normon, Madrid, España).

Quince minutos después se procede a la inducción anestésica usando propofol 3 mg/kg IV (Propofol-Lipuro® 1%; BBraun VetCare, Barcelona, España) y a la intubación endotraqueal (Fig. 20). La anestesia se mantiene empleando isofluorano a una concentración inspirada de 1,4% - 1,5% (Isoflo®; Esteve, Barcelona, España).

La monitorización anestésica incluía electrocardiografía, pulsioximetría, capnografía / capnometría, presión arterial invasiva (usando la arteria femoral de la extremidad izquierda), temperatura corporal, y análisis de los gases anestésicos.

Para la cirugía los animales se colocan en decúbito lateral derecho, sujetando la pata izquierda con un vendaje, quedando la pata derecha colocada sobre una mesa auxiliar, con la cara interna de la misma expuesta para la inserción de los pines. Se rasura la pata con una esquiladora eléctrica, y se limpia con agua y jabón, aislando la pezuña con una venda autocohesiva.

Para la esterilización se usa Clorhexidina tintada, y el campo quirúrgico aislado del resto con la ayuda de paños estériles.

Todo el procedimiento se llevaba a cabo bajo estrictas medidas de asepsia.



Fig. 20. Imagen de la preparación anestésica de las ovejas.

5.2 Marcaje de la vía de abordaje, niveles de las osteotomías y apertura de la herida

- Primero se mide la distancia total del metatarso, que debe ser mayor o igual a 12 cm (distancia máxima longitudinal entre pines proximales y distales) desde el borde inferior del cóndilo interno proximal, al superior de la tuberosidad interna distal, tomándose estos dos puntos como referencia de los límites extraarticulares de la pata.
- Se marcan los límites superior e inferior del distractor lo más alejados posible de las zonas articulares.
- Se mide el diámetro anteroposterior del hueso a esos niveles, excluyendo la zona posterior, por donde discurren los tendones flexores y uno de los principales vasos arteriales de la pata, y se marca la zona central
- Se dibuja una línea longitudinal y paralela al eje de la pata de 12 cm, que una el punto central proximal con el distal, dividida en 3 segmentos de 4 cm, usando el central como vía de abordaje (Fig. 21)
- Los límites superior e inferior del segmento se corresponden con las osteotomías proximales y distales. Se marca el punto situado a 25 mm de la osteotomía más proximal como nivel para la segunda osteotomía

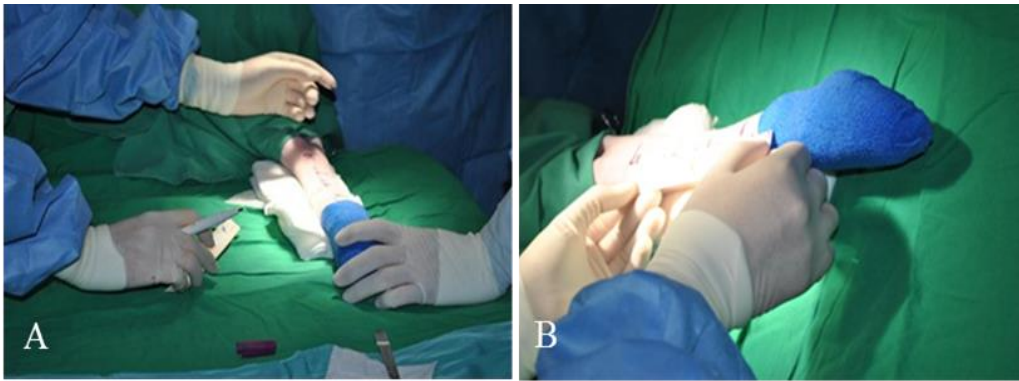


Fig. 21: (A) Marcaje de las regiones proximal y distal y separación en 3 zonas iguales de 4 cm (B) Comprobación con regla.

- El segmento restante entre la segunda osteotomía y la distal de 15 mm, se extirpa al finalizar la cirugía, y se corresponde con la zona ocupada por el pin de fijación de la pata al útil.
- Se realiza la disección por planos con bisturí frío, usando bisturí eléctrico en caso de sangrado profuso y se despegar el hueso de todas las partes blandas en su circunferencia (Fig. 22).



Fig. 22: Aspecto tras despegar las partes blandas. Periostio expuesto.

- Se marca el periostio en los niveles de sección y se arrolla en las zonas de las osteotomías alejándolo de la zona de acción de la sierra.

5.3 Colocación de la pata en el útil guía de pines

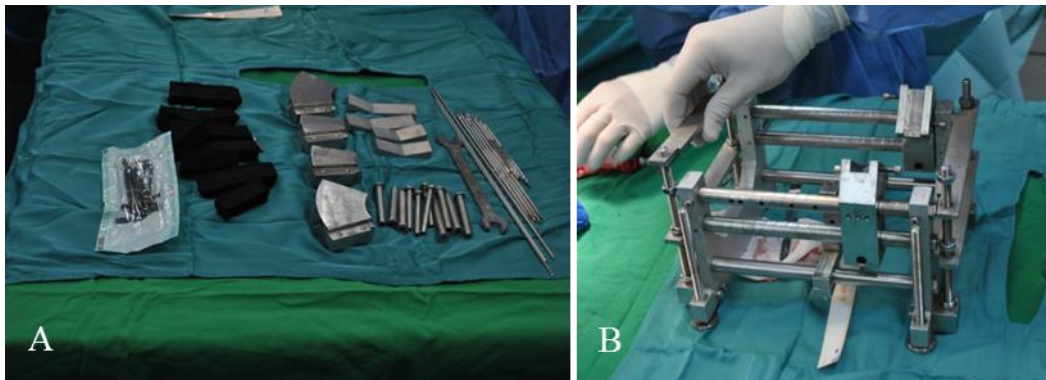


Fig. 23: (A) Componentes del útil esterilizados (B) Útil guía.

Se coloca la pata en la zona central de las placas inferiores proximales y distales, siguiendo las marcas de dirección y se fija con dos placas superiores que sirven de presa. Para evitar zonas de hiperpresión y facilitar la adaptación del dispositivo, se usan esponjas de densidad media adaptadas a una mordaza que se apoya sobre las placas.

El eje de la pata debe quedar en la visión lateral paralela a las tres barras guía y en cuanto altura, entre las barras superior y media (Fig. 24). En la visión superior, debe coincidir con la zona central del útil, que viene marcada por una muesca para introducir una aguja guía.

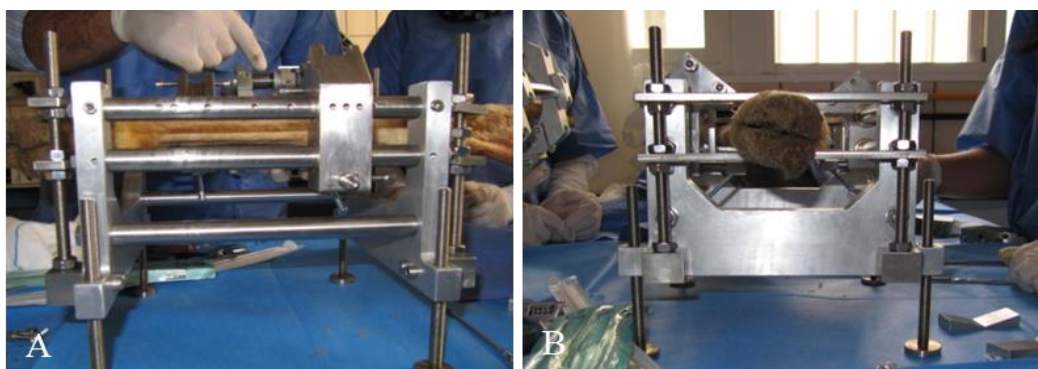


Fig. 24: Visiones laterales de la posición de la pata durante uno de los ensayos *ex vivo*.

Para evitar movimientos durante el resto de la cirugía se coloca el clavo de Schanz de fijación de 4mm, que se introduce por una guía a nivel de la barra central en la cara anterior del útil (Fig. 25). Se introduce la guía de aguja de 3 mm como prebroca.

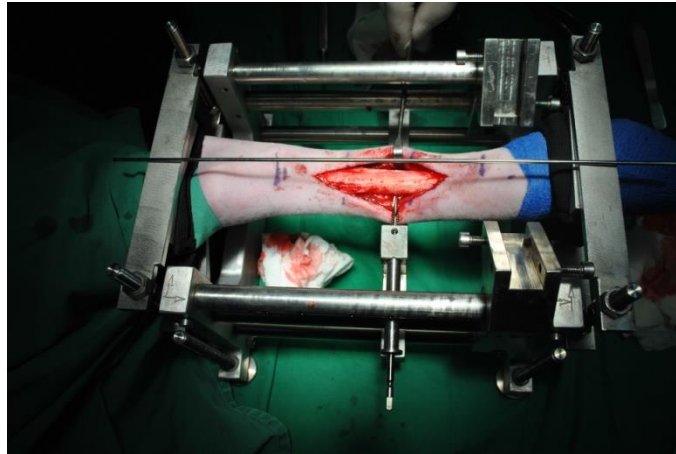


Fig. 25: Colocación del pin de fijación.

Finalmente se corta el pin de fijación por dentro de las barras, para evitar que obstaculice el deslizamiento de las piezas.

5.4 Procedimiento de inserción de los pines y agujas

Se comienza por la región distal, por ser de menor calibre y más difícil evitar la articulación, lo que nos permitía hacer las correcciones desplazando los puntos de entrada cranealmente.

- Se coloca la guía para los clavos en el orificio más distal del útil para el Schanz unicortical (Fig. 26).



Fig. 26: Guía y portamanguitos para pines unicorticales colocada en el orificio distal. Guía para aguja de 3 mm colocada en el orificio central.

- Se inserta el portamanguitos y la guía para la aguja de 3 mm (prebroca).
- Se broca la trayectoria del Schanz unicortical distal previa apertura de la piel.
- Se sustituye la guía de aguja por la de los clavos y se inserta el Schanz de 4 mm monocortical autorroscante.
- Manteniendo todo lo anterior, se coloca y se fija la guía para clavos transfixiantes con el grado de inclinación deseada, comenzando por el orificio central (Fig.27).

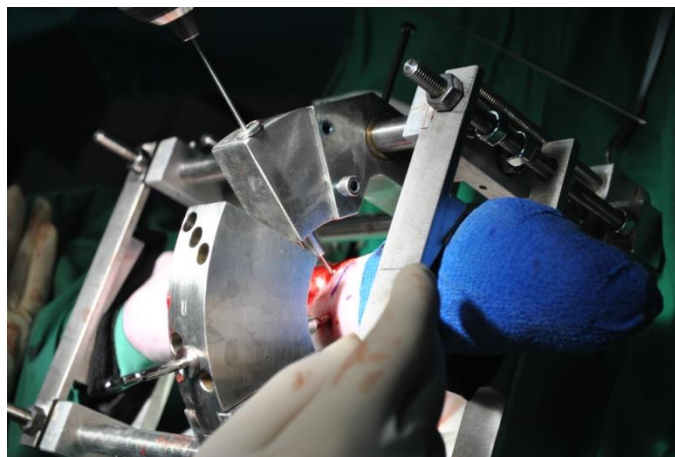


Fig. 27: Se retira la guía, y portaguías para clavos unicorticales y se fija en el orificio marcado para el clavo transfixiante distal.

- Se inserta la guía de la AK de 3 mm, se broca la trayectoria, y tras sustituir la guía, se inserta el segundo Schanz transfixiante (Fig. 28).

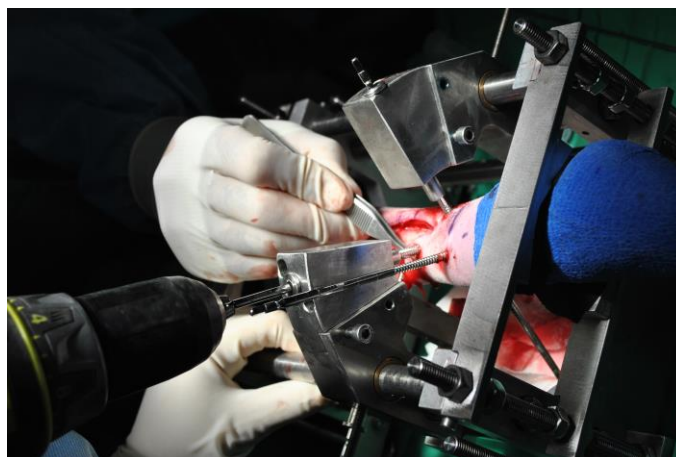


Fig. 28: Inserción del Schanz transfixiante distal previo brocado de la trayectoria.

A continuación, se libera una de las guías, y se repite el proceso a nivel proximal, manteniendo siempre uno de los pines (ya sea proximal o distal) montado sobre su pieza portamanguitos, para evitar desplazamientos indeseados (Fig. 29).

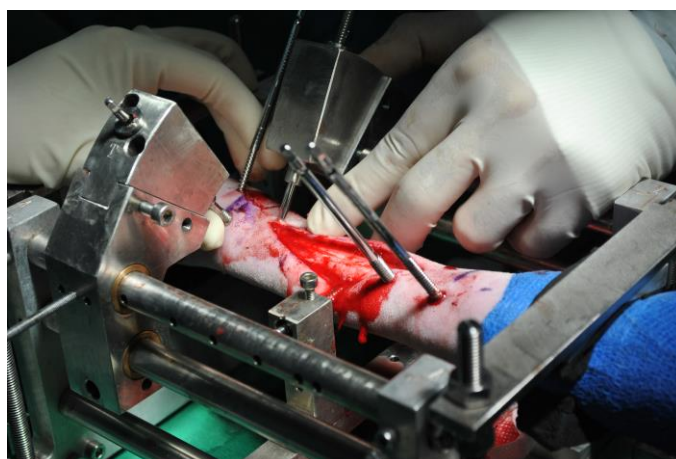


Fig. 29: Brocado del Schanz transfixiante proximal tras liberación de la guía distal.

Una vez insertados los 6 pines se monta sobre una de las guías la pieza portamanguitos para las agujas del transporte, fijándola a la barra como en los casos anteriores.

Se coloca una guía de aguja para AK de 2 mm, y se insertan las dos AK de 3 mm en el segmento a transportar (Fig. 30).

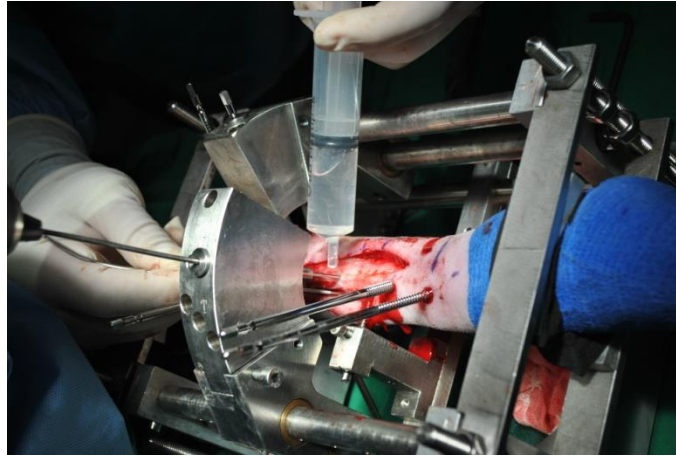


Fig. 30: Brocado e inserción de una de las AK del segmento a transportar.

5.5 Montaje del distractor

Una vez retirado el útil queda el metatarso libre para la colocación del distractor (Fig. 31).



Fig. 31: Imagen final de la pata una vez liberada del útil guía de pines.

Se montan los aros sobre los clavos de Schanz, buscando la orientación adecuada para que cada uno se posicione sobre su abrazadera, las cuales se atornillan provisionalmente (Fig. 32).



Fig. 32: Atornillado provisional de las abrazaderas.

Posteriormente se colocan las 4 barras, teniendo en cuenta que las dos móviles deben estar desbloqueadas y las platinas para las agujas deben estar orientadas y posicionadas a la altura de las AK del transporte.

Se fijan las AK a las platinas con un tornillo de bloqueo y se fija toda la tornillería (Fig. 33).

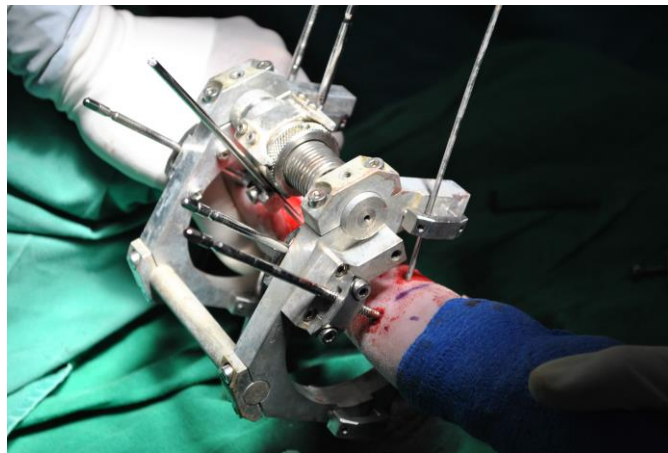


Fig. 33: Colocación de las barras y disposición de la pletina de la barra móvil apoyada sobre las AK del transporte.

Se coloca la guía para la sierra de corte entre los dos aros, fijándola a presión sobre el aro proximal, y procurando que su entrada coincida con la herida inicial (Fig. 34).

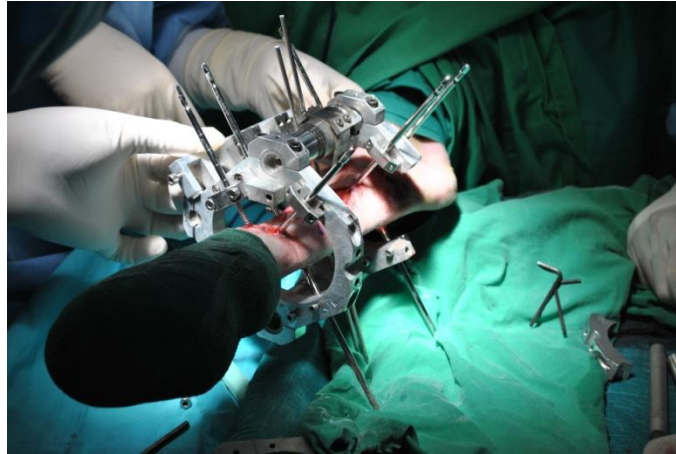


Fig. 34: Colocación de la guía de sierra.

Con la ayuda de separadores tipo Hoffman Müller se protegen las partes blandas y se realizan las tres osteotomías, comenzando por la más proximal (Fig. 35).

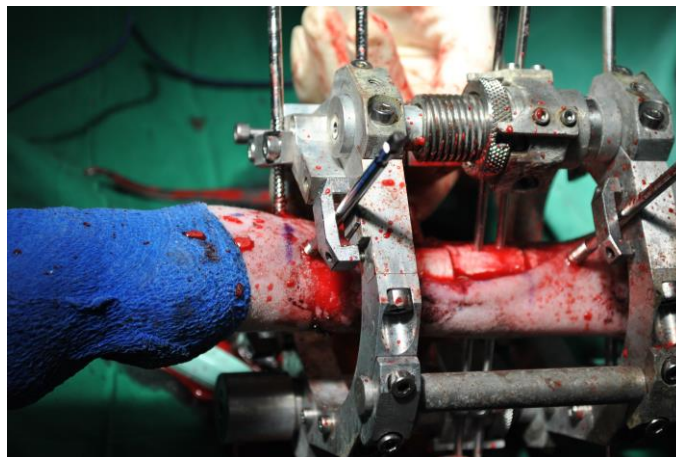


Fig. 35: Aspecto tras la realización de las osteotomías.

Una vez retirado el segmento óseo distal (Fig. 36) se revisa y controla cualquier tipo de sangrado y se comprime el segmento proximal con el resto de metatarso (Fig. 37), para garantizar el contacto óseo que favorece que se inicie el proceso de reparación ósea, y se bloquea el sistema, que se mantendrá así durante la fase de latencia



Fig. 36: Segmento distal extraído.

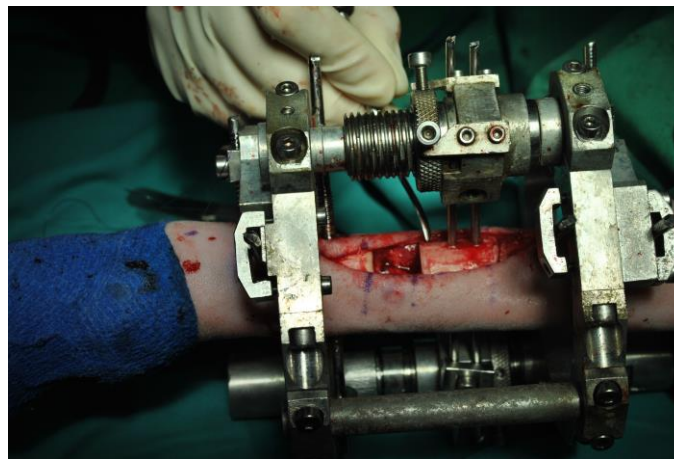


Fig. 37: Aspecto final previo al cierre de la herida y tras dar compresión proximal.

Se limpia la herida con suero fisiológico y se cierra la piel, con puntos sueltos de sutura reabsorbible de larga duración. Se curan las heridas con Povidona Yodada en crema y se cubren las heridas con esponjas estériles y un vendaje elástico aislante, difiriendo las curas cada 48h.

5.6 Fase de latencia

Es el espacio de tiempo durante el cual aún no ha comenzado el transporte del segmento móvil y se están desarrollando los fenómenos normales de formación del callo de fractura en la zona de la osteotomía proximal. Esto da lugar a un callo fractuario que tiene la elasticidad y consistencia necesarias en el momento de iniciar la fase de transporte.

Se mantiene una fase de latencia de 7 días^(26, 47, 48, 106), durante los cuales el animal permanece en relativo reposo, pudiendo andar libremente por el corral junto al resto de animales, estando bajo los cuidados y supervisión del equipo Veterinario de Córdoba, recibiendo la atención médica necesaria en todo momento.

5.7 Fase de transporte

Tras los 7 días de latencia comienza el transporte del segmento móvil. La duración media de esta fase es de 15 días, llevándose a cabo la movilización de proximal a distal del segmento óseo a transportar a un ritmo de 1 mm/día. Para ello se da una vuelta completa a diario a cada una de las tuercas de distracción sobre las barras móviles roscadas.

El control de la ausencia de alteraciones durante la movilización del segmento a transportar se lleva a cabo mediante radiografías seriadas.

5.8 Fase de consolidación

Una vez finalizado el transporte del segmento, comienza la fase de consolidación. El primer día de esta fase se procede a comprimir en la zona de contacto distal o *Docking Site* para asegurar el correcto acoplamiento en dicha zona y favorecer así la unión del segmento transportado con la zona distal del metatarso.

Durante esta fase el animal permanece con el fijador, con las barras móviles bloqueadas en la posición de compresión, y se mantiene así hasta que se obtienen datos con las pruebas de imagen de que el hueso tiene la rigidez suficiente que permita la retirada del distractor.

5.9 Fase de remodelación

Una vez retirado el distractor, durante un año aproximadamente, se produce la fase de remodelación. En dicha fase la estructura histológica del callo se modifica hasta alcanzar la conformación del hueso maduro normal. Sólo 2 animales se extienden hasta esta fase.

5.10 Sacrificio de los animales

Los animales fueron sacrificados empleando el eutanásico T-61® (Embutramida, Ioduro de Mebezonio, y Tetracaína Clorhidrato) por vía intravenosa.

Se estableció el siguiente programa de sacrificios, con la finalidad de poder realizar estudios ex-vivo en las distintas fases evolutivas del proceso, desde las iniciales hasta el final de la remodelación (Tabla 3).

Tabla 3: Planing de trabajo con cada animal.

Días desde la cirugía	Días de latencia	Días de transporte	Días de consolidación	Retirada del distractor
17	8	9	28	
22	7	13	8	
29	7	14	0	
35	7	13	15	
37	7	14	2	
50	7	15		
79	7	16	56	
98	8	15	75	
161	7	15	139	161
525	7	17	Alcanza remodelación	192

5.11 Obtención y conservación de los especímenes

Tras el sacrificio del animal, se procede a la desarticulación proximal del metatarso. Los especímenes se conservan sin quitar el distractor para evitar que las muestras se dañen al retirarlo en los congeladores de la Clínica Veterinaria de Córdoba a -80°C durante 24 horas, tras las cuales se retira el fijador y se realizan el TAC y la

última Rx. Posteriormente se vuelven a conservar en el congelador hasta el momento del estudio anatomopatológico.

5.12 Pruebas de imagen

Objetivos:

- Garantizar la correcta evolución del transporte, y detectar posibles desviaciones axiales durante el proceso de transporte.
- Asegurar la correcta consolidación del *Docking Site*.
- Evaluar el grado de osificación del callo óseo y verificar la regularidad del mismo.

Protocolo radiográfico:

- Radiografías: en los planos anteroposterior y lateral del espacio siguiendo la siguiente secuencia:
 - o Postoperatorio inmediato: con la oveja aún sedada.
 - o Primer día de la fase de transporte (último de latencia)
 - o Último día de la fase de transporte (21º días desde la cirugía).
 - o Tras el transporte se realizan radiografías semanales durante el primer mes de consolidación. Posteriormente cada dos semanas hasta los 100 días postquirúrgicos, momento en el cual se espacian mensualmente.
- Tomografía Axial Computarizada (TAC): Se realizan en todos los casos tras el sacrificio del animal. Valora la disposición de las áreas osificadas, su distribución en los 3 planos del espacio y el grado de consolidación del *Docking Site*. Se obtuvieron reconstrucciones 3D desde las imágenes del TAC usando el software MIMICS® (Materialise, Leuven, Belgium).

5.13 Estudios anatomopatológicos

Para el desarrollo del estudio anatomopatológico se contó con la colaboración y asesoramiento del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada de la Universidad de Córdoba.

Se realiza un estudio descriptivo macroscópico de las piezas, las cuales se dividen posteriormente en dos bloques. Se toman muestras de las zonas de hueso donde no hay callo óseo, utilizándose como tejido óseo control.

Se realizan tinciones de hematoxilina-eosina para estudio del nivel de osificación, y tricrómico de Mason para delimitar el tejido de extirpe cartilaginosa, además de pruebas inmunohistoquímicas para visualizar el endotelio, la vascularización y tipos de colágeno. Se determinan:

- Tipos celulares en el callo de transporte, sus porcentajes y su distribución.
- Tipos de osificación presentes, sus porcentajes y distribución en el callo y en el *Docking Site*.
- Distribución vascular
- Tipos de colágenos presentes, su disposición y porcentajes en el callo óseo (inmunohistoquímica)
- Dirección de las trabéculas óseas y variaciones en el grosor de las mismas en el callo óseo.
- Histomorfometría: porcentajes de vasos, tejido fibroso, cartílago, tejido óseo y tejido necrosado (en cada una de las 3 partes en que se divide el callo óseo para su estudio microscópico).

5.13.1 Procesamiento macroscópico

Se procede a cortar el metatarso siguiendo su eje longitudinal con una sierra similar a la utilizada en el despiece de piezas cárnicas (MAINCA® Modelo BM-2000, Barcelona, España) de forma que se obtienen dos mitades simétricas (Figs. 38A y B).

Una de esas mitades se utiliza para el estudio anatomopatológico. Se identifican los extremos proximal y distal, así como las fijaciones, que se numeran en orden proximal-distal. Se realiza una fotografía de la superficie de corte y se identifican y miden (indicando ancho y alto en centímetros) tanto el callo óseo como el *Docking Site*.

Posteriormente, de nuevo con la sierra se cortan las zonas correspondientes al callo óseo y al *Docking Site*, dejando en ambos extremos (proximal y distal) aproximadamente 0'5 cm de margen que incluyen hueso cortical (Fig. 38B).

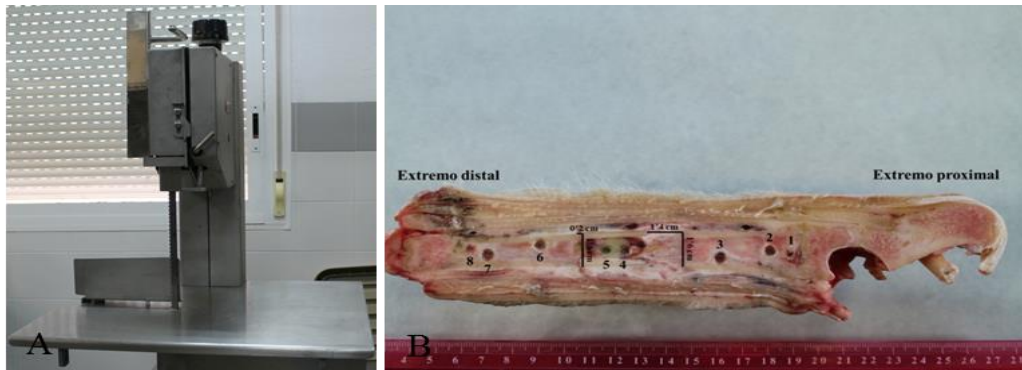


Fig. 38: (A) Sierra usada para cortar las piezas (B) Aspecto de la pata tras la sección longitudinal.

Las muestras se cortan en dos bloques: 1) incluye el callo óseo completo y 2) incluye el *Docking Site* completo. En ambos bloques se identifican los extremos proximal y distal (Fig. 39).

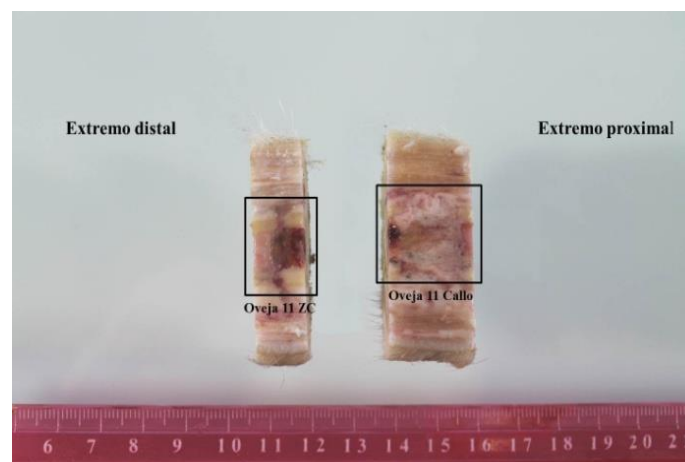


Fig. 39: Bloques incluyendo *Docking Site* y el callo óseo.

Material para preparación y tinción de muestras

- Líquido decalcificador TBD-1[®] (Thermo Scientific, Estados Unidos).
- Procesador automático de tejidos (Leica[®] TP 1020).
- Consola montadora de bloques (Sakura Tissue-Tek[®] TEC[™]).

- Estufa a 37°C.
- Microtomo (Sakura Accu-Cut® SRM™).
- Teñidor automático (Sakura Tissue-Tek® SRM™).
- Cubeta de baño histológico.
- Formol tamponado 10% (Panreac Química, España).
- Alcohol 60°,70°,80°,96° y 100° (Panreac Química, España).
- Xilol puro (Panreac Química, España).
- Parafina con punto de fusión a 58°C (Panreac Química, España).
- Hematoxilina de Harris (Panreac Química, España).
- Eosina (Panreac Química, España).
- Medio de montaje Eukitt® (Panreac Química, España).
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.

Procesado de muestras

Una vez cortados los fragmentos que incluyen tanto el callo óseo como el *Docking Site* se procede a su inmersión en TBD-1 (líquido decalcificante) en diferentes diluciones, debido a que los periodos de consolidación son variables y, por tanto, la consistencia del callo óseo y del fragmento de *Docking Site* son muy distintos. Se utilizan diluciones de TBD-1 en formol tamponado comprendidas entre el 10% y 50%. El tiempo transcurrido desde la inmersión de las muestras en TBD-1 hasta que están listas para poder ser cortadas también es variable debido a las mismas razones expuestas anteriormente, y oscilan desde 3-5 días hasta 3 semanas.

Una vez decalcificadas, se procede al tallado de las muestras, para lo cual se introducen en un procesador automático de tejidos (Fig. 40A), donde son deshidratadas

en gradientes crecientes de alcohol, pasan a xilol y son incluidas finalmente en parafina líquida (Fig. 40B), obteniendo un bloque con unas medidas aproximadas de 2 x 2 cm (Fig. 40C). Sobre estas muestras se realizan cortes histológicos, de 4 μm de grosor, utilizando un micrótopo (Fig. 40D).

Seguidamente, pasan a un baño histológico (37°C) hasta que la muestra está completamente extendida, y se recogen mediante un portaobjetos. Los cortes histológicos se dejan secar en una estufa a 37°C durante 24 h, hasta que están completamente adheridos al portaobjetos.

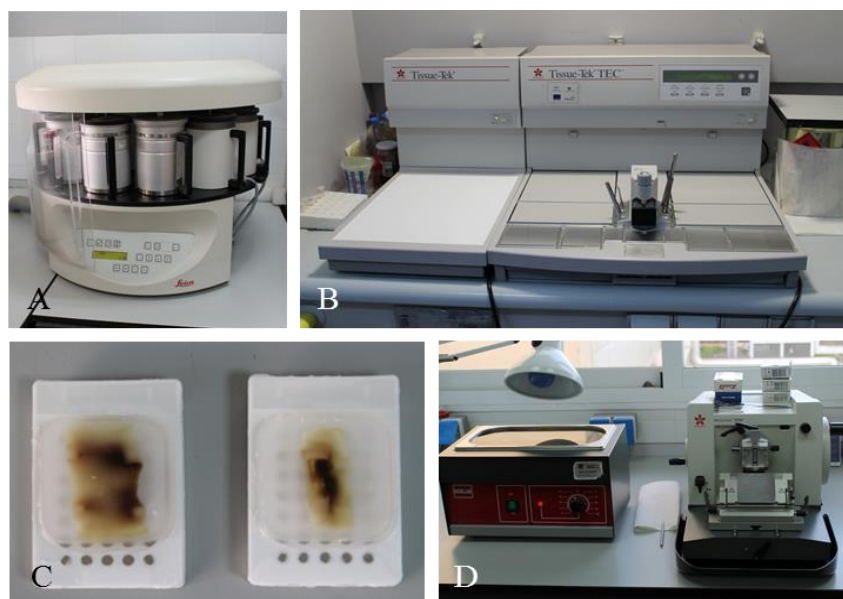


Fig. 40: (A) Procesador automático de tejidos (B) Dispensador de Parafina (C) Bloques parafinados (callo a la izquierda, *Docking Site* a la derecha) (D) Baño histológico y micrótopo.

Las tinciones elegidas para la realización del estudio histológico son la hematoxilina-eosina y el tricrómico de Masson (para estudiar la presencia de tejido conectivo). El protocolo de ambas técnicas se expone más adelante.

El sellado de las muestras se realiza aplicando una gota de medio de montaje (Eukitt®, Panreac) sobre el cubreobjetos y dejando caer cuidadosamente la preparación. Se eliminan las burbujas de aire que puedan quedar y se dejan secar 24 horas antes de examinarlas al microscopio (Fig. 41).

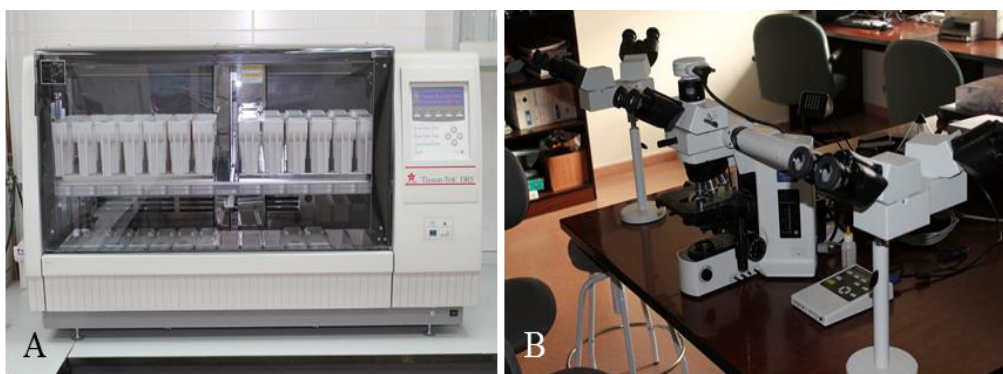


Fig. 41: (A) Teñidor automático (B) Microscopio.

5.13.2 Estudio histopatológico

Las piezas precisan ser sometidas a tinciones histopatológicas para poder ser procesadas mediante técnicas histomorfométricas.

Tinción con hematoxilina eosina:

1. **Desparafinado:** 3 baños en xilol de 10 minutos cada uno.
2. **Inicio de la rehidratación:** dos baños de 5 minutos cada uno en alcohol de 100°.
3. **Finalización de la rehidratación:** baños de 5 minutos cada uno en alcoholes (96° y 70°) y agua destilada.
4. **Tinción con hematoxilina:** inmersión de las muestras en hematoxilina durante 20 minutos.
5. **Lavado:** Se dejan las muestras en agua corriente durante 5 minutos.
6. **Decoloración:** inmersión de las muestras en HCL (3-5 segundos).
7. **Lavado:** de igual forma que el paso 5 pero durante 10 minutos.
8. **Tinción con eosina:** inmersión de las muestras en eosina durante 5 minutos.
9. **Lavado:** Se dejan las muestras en agua corriente hasta que el agua salga limpia.
10. **Deshidratación:** Mediante pases rápidos por gradientes alcohólicos.
11. **Montaje de las preparaciones:** Aplicando una gota de Eukitt® al cubreobjetos y dejando caer suavemente el portaobjetos.

Técnica de tinción tricrómico de Masson:

Se utiliza el kit comercial *Masson Trichrome with aniline blue* (Bio-Optica, Milán, Italia) siguiendo las instrucciones del fabricante:

Usa cuatro colorantes diferentes: hematoxilina férrica de Weigert para los núcleos, Ácido pírico para eritrocitos, una mezcla de colorantes ácidos (ácido fucsina - "ponceau de xylydine ") para el citoplasma y Azul de Anilina para el tejido conectivo. Se siguió la siguiente secuencia:

1. Se coloca la muestra en agua destilada.
2. Se ponen 6 gotas del reactivo A y se añaden 6 gotas del reactivo B: dejar actuar 10 minutos.
3. Sin lavar, se escurre la diapositiva y se pone en la muestra 10 gotas de reactivo C: dejar actuar 4 minutos.
4. Se lava rápidamente (3-4 segundos) en agua destilada y se pone en la sección de tejido 10 gotas de reactivo D: dejar actuar 4 minutos.
5. Se lava en agua destilada y se pone en la sección 10 gotas de reactivo E: dejar actuar 10 minutos.
6. Sin lavar, se escurre y se pone la diapositiva en la sección 10 gotas de reactivo F: dejar actuar 5 minutos.
7. Se lava en agua destilada y se deshidrata rápidamente a través de alcoholes ascendentes, dejar 1 minuto etanol absoluto (el último a usar) . Se aclara en xileno y montar.

Las muestras resultan teñidas como sigue:

- Núcleos y gametos: negro.
- Citoplasma, queratina, fibras musculares, gránulos acidófilos: rojo.
- Colágeno, mucus, gránulos basófilos de la hipófisis: azul.
- Células Delta de la hipófisis: azul.
- Eritrocitos: amarillo.

5.13.3 Estudio inmunohistoquímico

Material empleado

A.- Toma de muestras y realización de cortes histológicos

- Procesador histológico (Leica[®] TP 1020).
- Dispensador de parafina (Sakura Tissue-Tek[®] TECTM).
- Microtomo (Sakura Accu-Cut[®] SRMTM).
- Vectabond (Vector Laboratories, CA, USA).

B.- Buffers o soluciones tampón

1 - Tampón fosfato salino (PBS) 0.01M, pH 7,2

- 1000 ml de agua bidestilada.
- 1,48 gr de fosfato sódico dibásico anhidro.
- 0,43 gr de fosfato potásico monobásico anhidro.
- 7,20 gr de cloruro sódico.

2 - Tampón Tris salino (TBS) pH 7,6

-Solución Tris Madre pH 7,6.

- 500 ml agua bidestilada.
- 60,57 gr Trizma Base (Sigma).
- Se añaden 300-400 ml de ácido clorhídrico 1N (458 ml agua + 42 ml de ácido clorhídrico) hasta conseguir un pH final de 7,6.

-Solución salina fisiológica 0,85%

- 1000 ml de agua bidestilada.

- 8,5 gr cloruro sódico.

-Solución de trabajo

- 100 ml Solución Tris Madre.
- 900 ml Solución salina fisiológica.

C.- Inhibición de la peroxidasa endógena y tratamiento enzimático

-Solución inhibidora de la actividad peroxidasa endógena

- 6 ml peróxido de hidrógeno.
- 194 ml de metanol absoluto.

-Tratamiento enzimático con pronasa al 0,1%

- 0,2 gr de pronasa (Protease, Sigma®).
- 200 ml tampón PBS ph 7,2.

D.- Sueros no inmunes y reactivos específicos

- Suero normal de cabra (SNCa) al 10%.
- Anticuerpos primarios específicos (Tabla 4):

Tabla 4: Autoanticuerpos primarios.

Anticuerpo	Monoclonal/ Policlonal	Tratamiento	Dilución
Factor VIII	Policlonal	Microondas	1:100
Colágeno I	Policlonal	Sin tratamiento	1:50
Colágeno II	Policlonal	Sin tratamiento	1:4000

*Pronasa 0.1% 10 min.; Dako, Glostrup, Dinamarca.

- Anticuerpos secundarios conjugados:
 - Anti-IgG de ratón biotinado desarrollado en cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca), diluido al 1:50.
 - Anti-IgM de ratón biotinado desarrollado en cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca), diluido al 1:50.
 - Anti-IgG de conejo biotinado desarrollado en cabra (Vector, CA, USA), diluido a 1:200.
- Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) (Vector, CA, USA)
 - Diluido al 1:50 en PBS (Esta solución se prepara 30 minutos antes de su uso y se mantiene a temperatura ambiente y en oscuridad).

E.- Solución de revelado

Como solución reveladora en el estudio inmunohistoquímico se utiliza el kit comercial NovaRed® (Vector Laboratories, Burlingame, Estados Unidos). El cromógeno se prepara previamente siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando los reactivos del kit:

- Añadir 3 gotas del **reactivo 1** a 5 ml. de agua destilada.
- Añadir posteriormente 2 gotas del **reactivo 2** y mezclar bien.
- Añadir posteriormente 2 gotas del **reactivo 3** y mezclar bien.
- Añadir posteriormente dos gotas de H₂O₂ y mezclar bien.

Desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas

El procesado de los tejidos es el mismo descrito en el estudio histopatológico. La única diferencia es que, para los cortes obtenidos del baño histológico, se utilizan portaobjetos tratados previamente con Vectabond® (Vector, CA, USA), compuesto que potencia y facilita la adherencia del tejido al portaobjetos, para evitar que el corte

histológico se desprege durante los distintos tratamientos que sufre la muestra, lo cual es frecuente en las muestras que presentan queratina o tejido óseo.

Técnica inmunohistoquímica:

1. **Desparafinado:** 3 baños en xilol de 10 minutos cada uno.
2. **Inicio de la rehidratación:** dos baños de 5 minutos cada uno en alcohol de 100°.
3. **Inhibición de la peroxidasa endógena:** un baño en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos.
4. **Finalización de la rehidratación:** baños de 5 minutos cada uno en alcoholes (96° y 70°) y agua destilada.
5. **Lavado en PBS** durante 5 minutos.
6. **Desenmascaramiento antigénico:** Digestión enzimática con pronasa al 0,1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. **Lavados en PBS:** tres lavados de 10 minutos cada uno (para frenar la digestión enzimática).
8. **Bloqueo de las reacciones inespecíficas:** Se incuba en cámara húmeda con suero normal de cabra al 10% en PBS (30 minutos a temperatura ambiente).
9. **Anticuerpo primario:** Se elimina el exceso de suero normal de cabra y se incuba en cámara húmeda con el anticuerpo primario diluido en PBS y suero normal de cabra al 10% (18 horas a 4°C).
10. **Lavados en PBS:** tres lavados de 10 minutos cada uno.
11. **Anticuerpo secundario biotinado:** Los cortes histológicos se incuban en el anticuerpo secundario diluido en PBS y suero normal de cabra al 10% (30 minutos a temperatura ambiente).
12. **Lavados en PBS:** dos lavados de 5 minutos cada uno.

- 13. Complejo Avidina-Biotina-peroxidasa (ABC):** Incubación con el complejo ABC diluido al 1:50 en PBS (1 hora y en oscuridad).
- 14. Lavados en TBS:** tres lavados de 10 minutos cada uno.
- 15. Revelado:** Se depositan 100 µl de la mezcla del kit comercial Novared[®], sobre el portaobjetos colocado sobre un fondo blanco y se revelan durante 2 minutos.
- 16. Frenado del revelado:** Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- 17. Lavado:** 3 minutos en agua corriente.
- 18. Deshidratación:** Mediante pases rápidos por gradientes alcohólicos.
- 19. Montaje de las preparaciones.** Aplicando una gota de Eukitt[®] al cubreobjetos y dejando caer suavemente el portaobjetos.

5.13.4 Desarrollo del Estudio histomorfométrico

Se lleva a cabo mediante técnicas semiautomáticas, sobre fotografías realizadas con el fotomicroscopio BX51[®], usando la cámara digital acoplada DP20-5E, ambos de la casa comercial Olympus (Japón) y el programa de procesado de imágenes Image J versión Image J 1.47V[®] (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA; Java 1.6.0_20 32 bit)⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾.

Descripción macroscópica de las piezas

El estudio macroscópico consistió en discriminar las áreas correspondientes al callo de transporte y al *Docking Site* en cada pieza, previo al corte de los bloques conteniendo ambas zonas. Se midió la longitud en milímetros correspondiente a cada uno de los callos de transporte y a cada *Docking Site*. Se determinó la correcta alineación del segmento de transporte, y en caso de detectarse traslación del mismo, se cuantificó en milímetros.

Contajes tisulares

Para simplificar el estudio de los porcentajes de tejidos presentes, se realizan mapas óseos sobre las imágenes teñidas con tricrómico de Masson a 10 aumentos de las secciones longitudinales del Callo y el *Docking Site* en su total extensión.

La imagen seleccionada es procesada con el programa Image J[®](108, 109). Una vez delimitada la región de estudio se aumenta el contraste y la nitidez, se seleccionan las zonas a colorear en función del tipo de tejido y se cuantifica el número de píxeles correspondientes a ese tejido en la imagen. Una vez obtenidos los datos, se colorean las áreas seleccionadas.

Una vez coloreada cada zona, la fotografía se convierte en una imagen simplificada, o mapa de colores, otorgados en función del tipo de tejido:

- Tejido óseo trabecular: rojo
- Tejido fibroso: azul
- Tejido óseo cortical: rosa
- Medular ósea: amarillo
- Huecos: blanco

Se realiza para cada tipo de tejido hasta completar la imagen (Fig. 42).

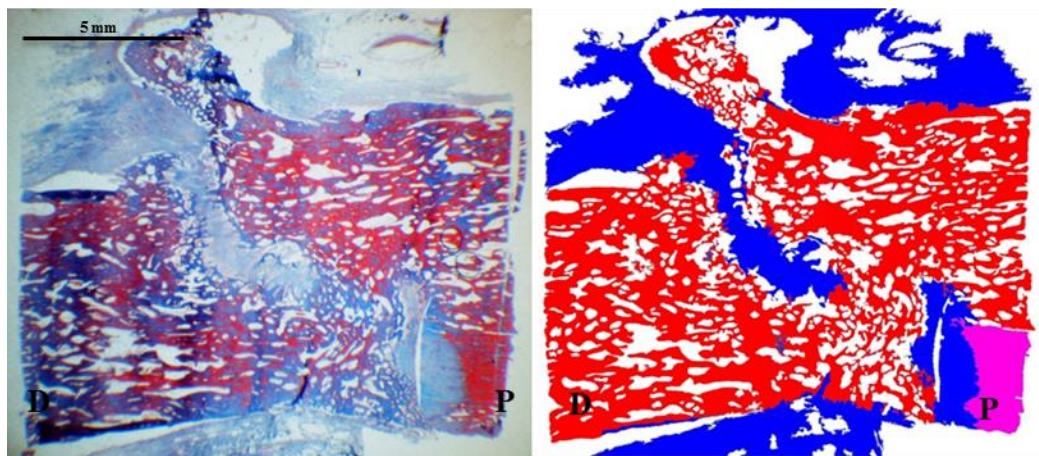


Fig.42: Conversión de imagen del callo en mapa óseo (oveja de 98 días). Izquierda: tricrómico de Masson. Fotografía a 10X de la preparación histológica. Derecha: Resultado final tras procesado (D: extremo distal, P: extremo proximal).

Conocido el número de píxeles correspondientes a tejido fibroso y trabecular, se calcula el porcentaje de área ocupada en la imagen para cada uno de ellos respecto al total (fibroso + trabecular). Las regiones libres de tejido o “huecos”, las ocupadas por médula ósea y las de tejido óseo cortical no se miden ya que no corresponden a tejido neoformado.

El porcentaje de osificación perióstica se calculó, al igual que los porcentajes de tejidos presentes en el callo, sobre imágenes de la totalidad de la extensión longitudinal del mismo. Se establecieron las zonas correspondientes a osificación perióstica y endóstica como indica la figura 43. Conocido por los cálculos previos el total de tejido óseo trabecular neoformado, se podrá determinar qué porcentaje del mismo se forma mediante osificación perióstica o endóstica.

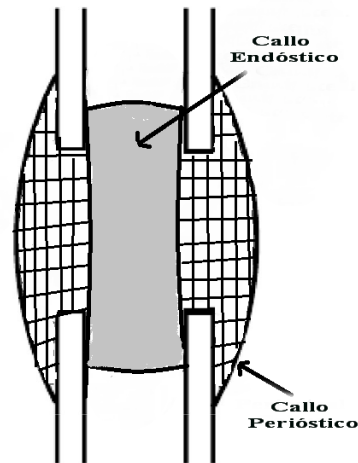


Fig. 43: Representación esquemática de las áreas tomadas como periósticas y endósticas.

Estudio al microscopio óptico

Se realiza sobre las microfotografías correspondientes a los cortes histológicos longitudinales tanto del callo óseo como del *Docking Site*. Para ello, el corte histológico correspondiente al callo óseo (teñido mediante la técnica del tricrómico de Masson), es digitalmente dividido en tres partes iguales (fig. 44):

- 1) Extremo proximal
- 2) Fragmento intermedio
- 3) Extremo distal

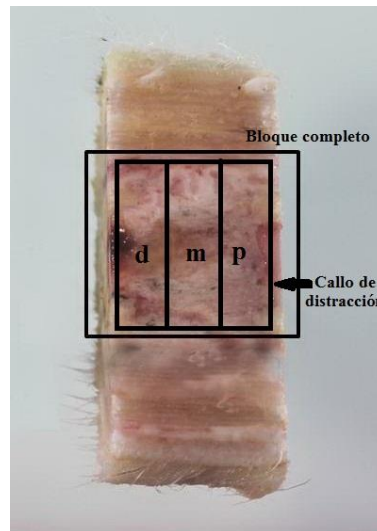


Fig. 44: División virtual en segmentos del callo (p: proximal; m: medio; d: distal).

En el caso del *Docking Site* la muestra se estudió en su globalidad, sin división en segmentos.

En el estudio al microscopio óptico se determinaron los tipos de osificación presentes (intramembranosa vs endocondral), se realizaron contajes celulares y se determinó la evolución de las trabéculas óseas.

- *Tipos de osificación (Intramembranosa vs Endocondral).*

Para el análisis descriptivo de los focos de osificación presentes (tipo intramembranosa o endocondral), cada una de las regiones (proximal, media y distal) se estudiaron a 20X, 40X, 100X y 200X. Su objetivo es describir los focos de osificación existentes, la cantidad de los mismos y su distribución en el callo y el *Docking Site*. Así mismo, en el caso del callo, se describe la evolución del *Woven Bone* a hueso maduro y su distribución.

Para las mediciones en el callo se utilizaron 9 microfotografías tomadas al azar (tres por cada región) del callo y 3 del *Docking Site*.

- *Contajes celulares*

Se contabilizan los osteoblastos y osteoclastos presentes en el callo de transporte. Dada la gran cantidad de osteoblastos y a que aparecen en acúmulos, la medición se

realiza calculando la densidad de osteoblastos presentes por cada $100\mu\text{m}^2$. Para ello se utilizan 9 microfotografías a 20X del callo (3 por cada una de las regiones en la que se divide) y se calcula la media de la densidad de osteoblastos presentes en el mismo a nivel proximal, medio y distal. Para ello se emplea el software Image J[®]. En el caso de los osteoclastos, estos aparecen en cantidad muy escasa, por lo que se contabilizan en las imágenes tomadas a nivel de las regiones proximal, medio y distal por métodos manuales (3 microfotografías a 20X por región como en el caso de los osteoblastos) y se calcula el total y la media presente en el callo de transporte. Ambos resultados se expresan en media \pm desviación estándar (SD).

- *Estudio de las trabéculas óseas.*

Se determinó la evolución de las trabéculas óseas en el callo. Para su estudio la imagen se transforma en modo invertido, apareciendo como los negativos de una fotografía, lo cual clarifica la imagen de las trabéculas óseas. Con el programa Image J[®] se delimitaron dichas trabéculas y se obtuvo el área que representaban, de forma que se pudo analizar el grosor medio de las mismas en cada región del callo (proximal, media y distal). Se utilizaron una media de 20 microfotografías por animal. La evolución del grosor de dichas trabéculas (expresada en μm) en el tiempo se representó como la media de los resultados \pm SD (Tabla 6, Fig. 61).

5.13.5 Evaluación del estudio inmunohistoquímico.

Las mediciones del estudio inmunohistoquímico del callo se llevaron a cabo en las mismas tres regiones indicadas previamente para la histomorfometría (Fig. 44). Se usaron Anti-anticuerpos frente a colágeno tipo I, II y Anti- Factor VIII. Con ello se determina la expresión de Colágeno tipo I, directamente relacionado con la osificación intramembranosa, Colágeno tipo II, expresado por los condrocitos precursores de la osificación endocondral, y la evolución de la vascularización mediante la captación por las paredes de los vasos sanguíneos neoformados del Anti-Factor VIII.

Para sus mediciones se procede de similar manera a la descrita anteriormente para las trabéculas óseas, teniendo en cuenta que en la técnica inmunohistoquímica no hay contratinción con hematoxilina para facilitar la detección de las células inmunoreactivas por el programa informático.

Las áreas inmunoreactivas para colágeno I y II se midieron en 9 microfotografías a 20X (3 por región), equivaliendo cada una a 0,34 mm². Se calculó la relación Colágeno I/Colágeno II. Para las mediciones del Anti-Factor VIII se usaron 3 microfotografías a 20X. Los resultados se expresan como porcentajes de área ocupada por cada uno de los tipos de colágeno y vasos en cada campo de 0,34 mm² estudiado y se presentaron como media \pm SD.

Al igual que en la histomorfometría, el *Docking Site* se estudió al completo, no fue dividido en regiones. Sólo se realizaron mediciones de Anti-Factor VIII usando 3 microfotografías a 20X como en el caso del callo.

5.14 Variables del estudio

Se estudiaron los siguientes parámetros en función de la zona analizada:

- Callo de transporte:
 - Porcentajes de tejido óseo trabecular neoformado y fibroso y descripción de la distribución de los mismos.
 - Porcentajes de osificación perióstica, endóstica y su evolución en el tiempo.
 - Descripción de los tipos de osificación presentes (intramembranosa y endocondral) y evolución del *Woven Bone* a hueso maduro.
 - Densidad de osteoblastos (nº osteoblastos/ 100 μm^2) en función del tiempo.
 - Número total de osteoclastos presentes en el callo.
 - Evolución temporal del grosor de las trabéculas óseas neoformadas.
 - Porcentaje de área ocupada por cada campo de microscopio óptico del callo de los dos tipos principales de colágeno (tipo I y II).
 - Relación Colágeno tipo I/ Colágeno II.
 - Porcentaje de área ocupada por área de microscopio óptico de los vasos neoformados y su distribución temporal.

- *Docking Site:*
 - Porcentajes de tejido óseo neoformado y fibroso y descripción de la distribución de los mismos.
 - Descripción de los tipos de osificación presentes (intramembranosa y endocondral).
 - Porcentaje de área ocupada por vasos neoformados por área de microscopio óptico y su distribución temporal.

RESULTADOS

RESULTADOS

El estudio pudo realizarse en todos los animales sin complicaciones importantes en las heridas quirúrgicas, ni en los puntos de inserción de los pines y agujas. Únicamente la oveja sacrificada a los 35 días presentó un problema local en relación con la herida quirúrgica mostrando un cuadro inflamatorio leve en el postoperatorio inmediato. Dicho cuadro remitió con tratamiento antiinflamatorio oral y curas locales. No mostró signos de sobreinfección. El resto de animales completó el estudio sin incidencias.

1. Callo de transporte

1.1 Pruebas de Imagen

Estudios Radiográficos

Todas las radiografías tomadas en el postoperatorio inmediato mostraron una correcta alineación del segmento a transportar respecto al eje principal del metatarso, tanto en el plano dorsoplantar como en el medio lateral. En todos los casos los pines y agujas aparecieron correctamente posicionados.

Las radiografías tomadas inmediatamente al final de la fase de transporte mostraron buen contacto en la región del *Docking Site*, salvo en la oveja de 29 días (Fig. 45) y la de 37 días en las que se objetivó un leve desplazamiento mediolateral del segmento transportado. En la oveja de 29 días las corticales contactaron en el 50% de su grosor. En la oveja de 37 días la traslación fue de 2 mm, haciendo que en un lateral las corticales proximal y distal contactaran parcialmente y en el opuesto aparecieran adyacentes pero no apuestas.



Fig. 45: Radiografía al final del transporte de la oveja de 29 días. Leve traslación mediolateral del segmento transportado.

Las radiografías tomadas inmediatamente tras el final del transporte muestran la existencia de osificación en toda la longitud del callo, apareciendo áreas más radiopacas a nivel periférico y un área radiolúcida central o gap. Dicho gap fue reduciendo su tamaño gradualmente según se observa en las radiografías tomadas posteriormente. La figura 46 muestra la progresión radiológica completa del animal de mayor duración, en la que puede observarse la progresión del gap central y los cambios de densidad en el callo.

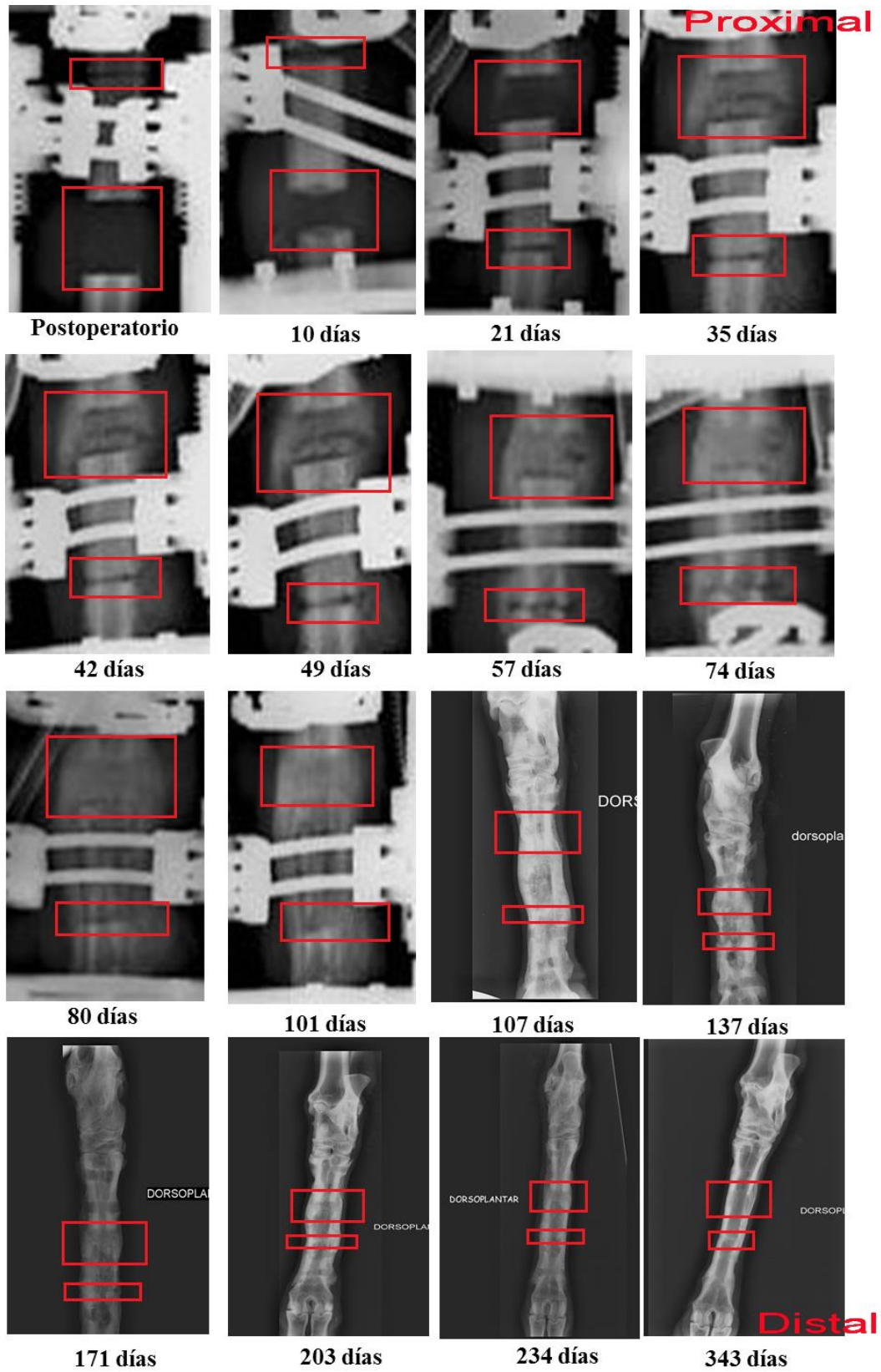


Fig. 46: Progresión radiológica de la oveja de 525 días de evolución. Los rectángulos identifican el callo de distracción (proximal) y *Docking Site* (Distal) en las imágenes de mayor tiempo de evolución.

Tomografía Axial Computarizada (TAC)

Las imágenes de TAC permitieron afinar la extensión de la consolidación gracias a su valoración en 3 planos. En las imágenes coronales y sagitales obtenidas durante la fase de transporte se observó que la formación de nuevo hueso se iniciaba a nivel subperióstico en toda la longitud del callo, siendo más evidente a nivel proximal que distal. Aproximadamente un mes tras la cirugía se observó que todo el callo había sido puenteado por el hueso neoformado y comenzaban a identificarse zonas osificadas a nivel medular, donde aparecía el mismo gap radiolúcido central ya visto en las radiografías.

El callo alcanzó un tamaño máximo sobre los 90-150 días tras la cirugía (Fig. 47).



Fig. 47: Radiografía a los 137 días. Medular canalizada y ligera reducción del diámetro total del callo.

De manera paralela al presente trabajo, se realizó un estudio (no objeto de esta tesis doctoral) consistente en la medición de los volúmenes del callo óseo en cada momento evolutivo en los mismos sujetos⁽¹¹⁰⁾. Una vez alcanzado el máximo volumen sobre los 90-150 días tras la cirugía ($6-10 \text{ cm}^3$), se apreció el inicio de remodelación del callo, siendo prácticamente indistinguible un año tras la cirugía (Fig. 48).

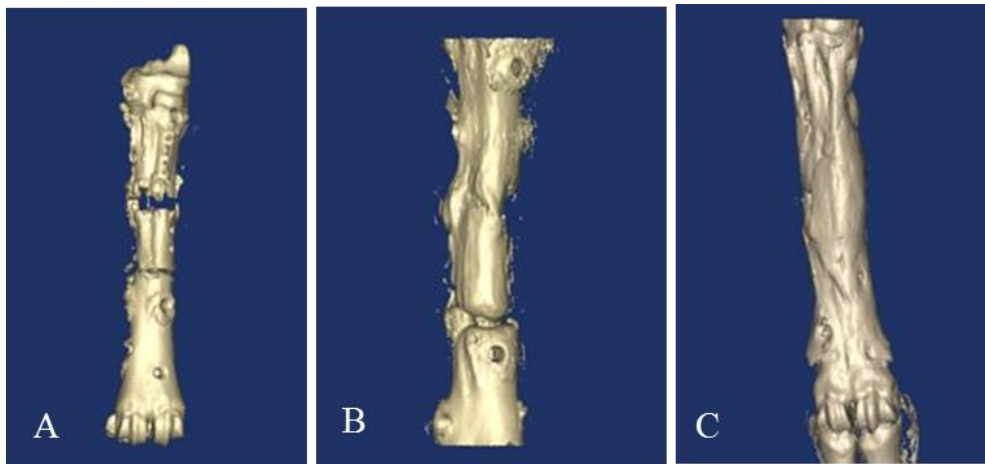


Fig. 48: Reconstrucción TAC 3D de los metatarsianos. Oveja sacrificada a los (A) 22, (B) 98 y (C) 365 días de evolución.

1.2 Estudio histomorfométrico

Descripción macroscópica de las piezas

En la visión macroscópica de las piezas (Fig. 49), los callos mostraron un grosor medio de 11,8 mm. En todos los casos, salvo en dos, se constató alineación correcta. La oveja de 29 días presentó una leve traslación mediolateral, sin repercusión en el contacto distal de las corticales. La oveja de 37 días presentó un desplazamiento mediolateral de 2 mm que originó la ausencia de contacto completo de una de las corticales a nivel distal del segmento transportado.

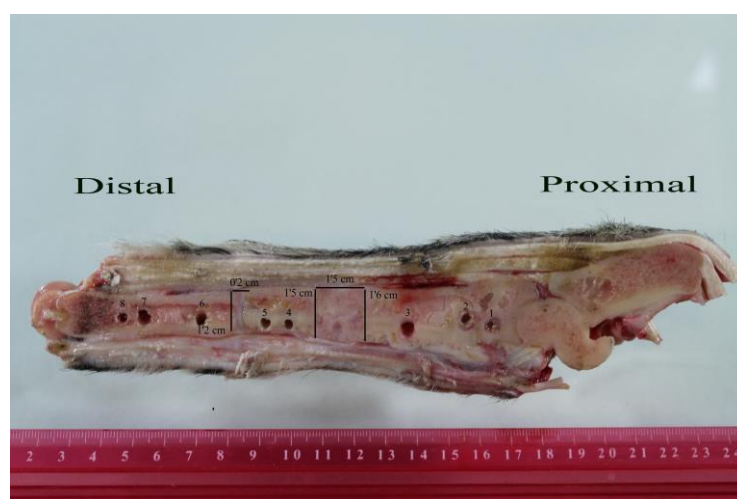


Fig. 49: Imagen macroscópica de la pieza de 79 días, mostrando las áreas delimitadas del *Docking* y del callo.

Contajes tisulares

La figura 50 muestra la progresión en el tiempo de los distintos tejidos en el callo al transformar las microfotografías en mapas (código de colores indicado en el pie de la figura). Dichos mapas nos permiten valorar *de visu* las variaciones en la disposición de los tejidos y el área ocupada por cada uno.

El porcentaje de tejido conectivo fibroso disminuyó durante la fase de consolidación. La cantidad de hueso trabecular neoformado aumentó inversamente al tejido fibroso, llegando a aparecer en cantidades similares a los 75 días desde la cirugía. A los 161 días el hueso trabecular ocupaba el 81% de la superficie total del callo. A los 525 días tras la cirugía sólo se objetivó hueso cortical (Fig. 50):

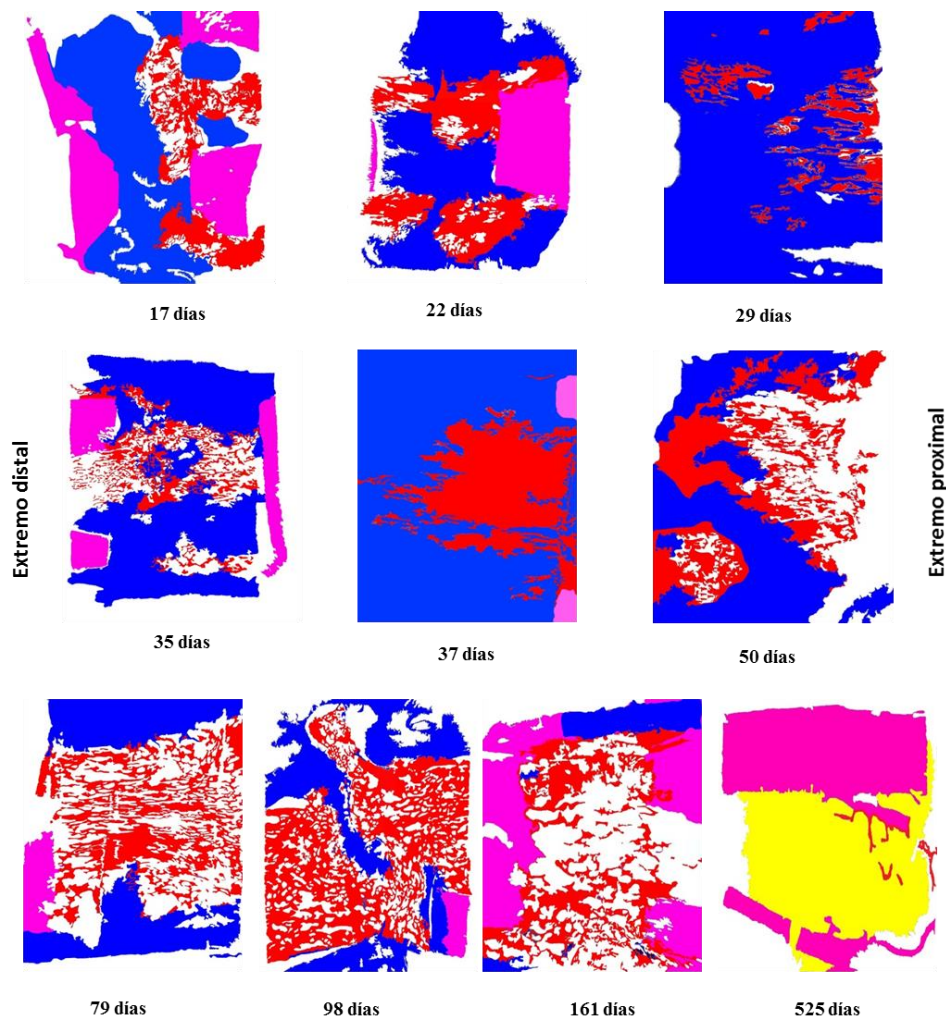


Fig. 50: Mapas óseos tisulares tras procesar las imágenes con software Image J. Rojo: tejido óseo trabecular; Azul: tejido fibroso; Amarillo: Medula ósea; Rosa: Tejido óseo cortical.

No se identificaron áreas de necrosis (no se observaron núcleos picnóticos ni otras características del tejido necrótico). Se hallaron lagunas hemáticas rellenas de fibrina y plasma resultantes de la distracción de los tejidos (son regiones acelulares). Los resultados se muestran en la figura 51.

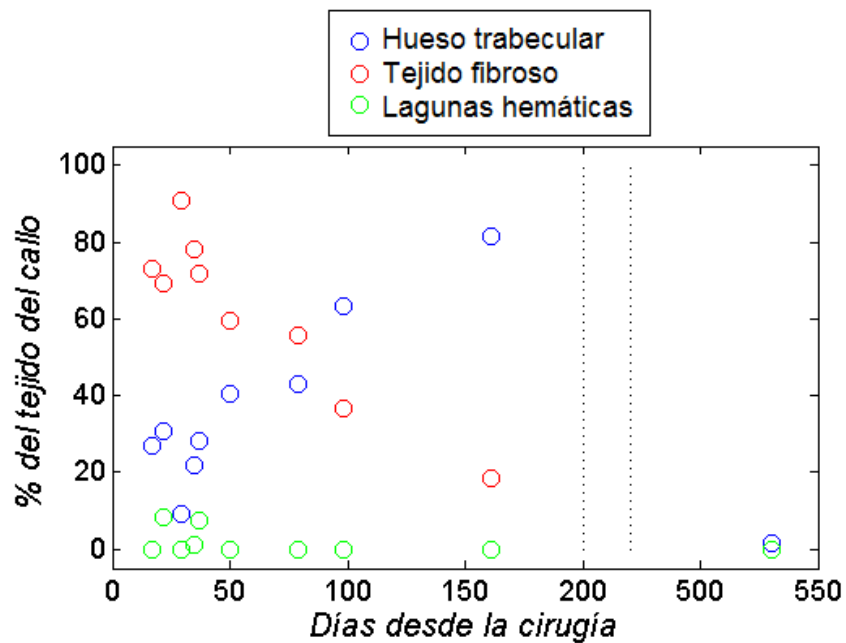


Fig. 51: Evolución de los tejidos en el callo.

En cuanto al tipo de osificación (perióstica vs endóstica), durante la fase de transporte y hasta los 50 días, fue de tipo mixta con un ligero predominio de la osificación perióstica sobre la endóstica. El patrón endóstico predominó a partir de los 50 días tras la cirugía (Fig. 52).

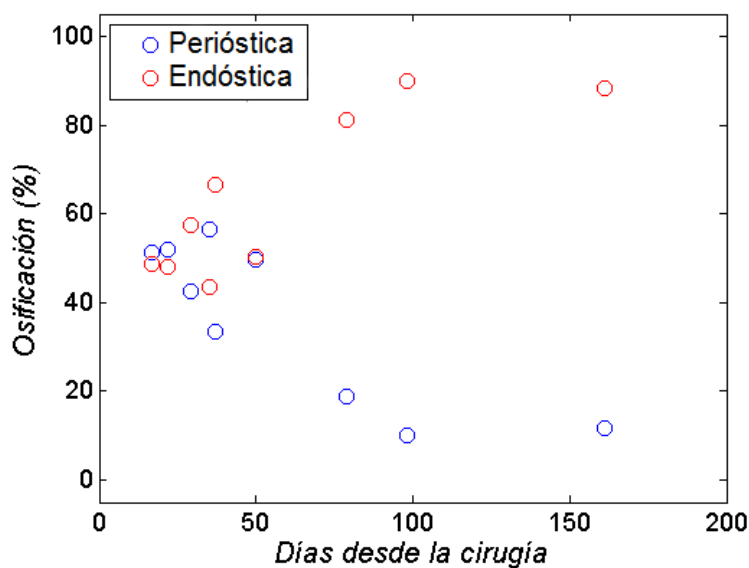


Fig. 52: Distribución de la osificación Perióstica y Endóstica.

Estudio al microscopio óptico

- *Tipos de osificación (Intramembranosa vs Endocondral)*

Se identificaron focos de osificación intramembranosa en todos los animales. Sólo en 3 animales (22 días, 50 días y 98 días) se identificaron focos de osificación endocondral. La relación de animales que mostraron focos de osificación endocondral, su cuantía y distribución fueron:

- 22 días: Focos a nivel subperiósticos en territorio medio y proximal del callo. Contabilizaban el 5% del total de focos de osificación presentes.
- 50 días: En la región proximal suponían 15% de los focos. En la región central el 8% de los focos y el 15% en la distal. Todos se localizaron a nivel subperióstico (Figs. 53A y C).
- 98 días: Sólo aparecen en la región central, registrando un 4% del total los focos.

Todos los focos de osificación endocondral identificados aparecieron a nivel subperióstico. Dichos focos eran de mayor tamaño que los de osificación intramembranosa y aparecieron en menor cuantía (Fig. 53).

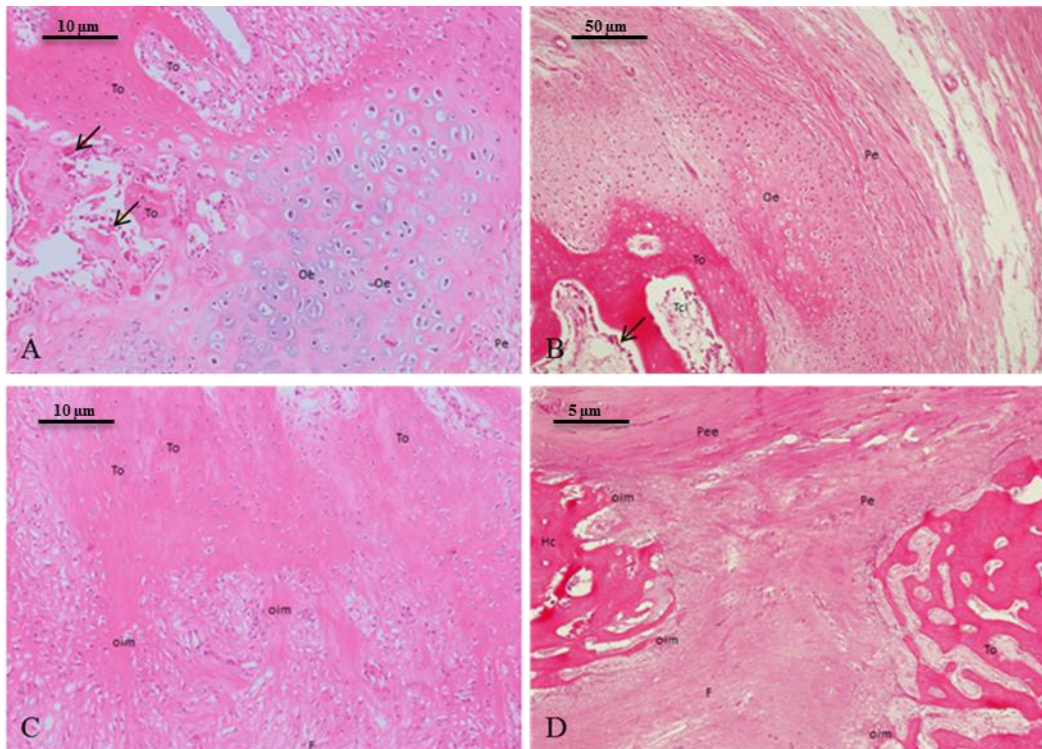


Fig. 53: (A) Focos de osificación endocondral 50 días, x 200 (B) Focos de osificación endocondral 98 días. Las flechas marcan osteoblastos, x40 (C) Focos de osificación intramembranosa 50 días, x 200 (D) Focos de osificación intramembranosa 98 días, x 400. Tinción: hematoxilina-eosina (*To*: trabécula ósea, *Pe*: periostio, *F*: fibrosis, *Oim*: osificación intramembranosa, *Oe*: osificación endocondral, *Hc*: conducto de Havers).

Se identificó un gap a nivel medio (Fig. 54) constituido por tejido conjuntivo fibroso denso dependiente del periostio en todos los casos salvo en la oveja de mayor tiempo de evolución. Dicho gap central disminuyó de tamaño progresivamente con el tiempo, cerrándose desde la periferia hasta el centro (centrípetamente).

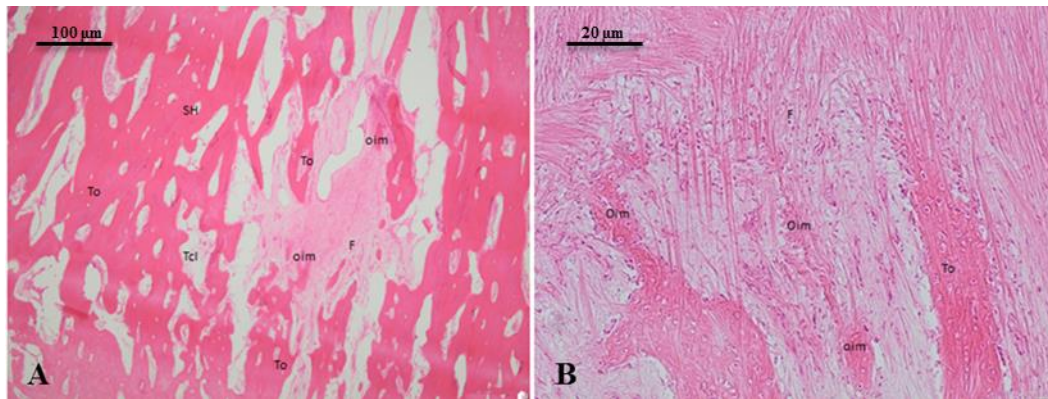


Fig. 54: Tercio medio de la oveja de 79 días. Tinción: hematoxilina-eosina, x 20 (A) y x 100 (B) (To: trabécula ósea, F: fibrosis, Oim: osificación intramembranosa, Tcl: Tejido conjuntivo laxo, Sh: Sistema de Havers).

Todo el tejido óseo identificado fue de tipo *Woven Bone* hasta la muestra analizada a los 50 días. A los 79 días comienzan a identificarse las primeras zonas de hueso maduro, identificadas por la aparición de estructuras similares a Sistemas de Havers, a partir de trabéculas que se alejan de los focos de osificación. Dichas estructuras aparecen a nivel periférico mayoritariamente, y están formadas por aposición de trabéculas óseas que aparecen rodeadas de gran cantidad de osteoblastos. Fueron también comunes los osteoclastos, lo que indicaba hacia un proceso de remodelación activa (Fig. 55)

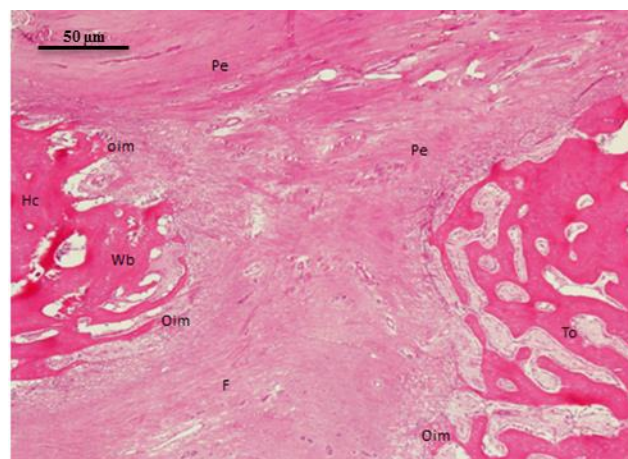


Fig. 55: Tercio medio de 98 días de evolución. Diferente disposición entre las trabéculas neoformadas (*Woven Bone*) y la aposición concéntrica de las mismas en los primeros Sistemas de Havers. Tinción: hematoxilina-eosina, x 40 (Pe: periostio; Wb: *Woven Bone*; Oim: osificación intramembranosa; F: fibrosis; Hc: conductos de Havers).

Dicho proceso aparece coetáneamente en las tres regiones estudiadas, estando en todos los casos más avanzado a nivel proximal y distal que central. Además se identifican en un primer tiempo a nivel subperióstico progresando hacia el centro del callo.

- *Contajes celulares*

Los osteoclastos siguieron una distribución normal en sus contajes globales. Sus cifras fueron más elevadas durante las fases iniciales del proceso de remodelación y disminuyeron en cantidad conforme progresaba (Fig. 56). En el análisis por zonas, se identificó mayor número de osteoclastos en la región proximal (Fig. 57) en las fases iniciales, seguido de la zona distal y media. En los casos de mayor duración, la cantidad de osteoclastos fue mayor a nivel medio, respecto a proximal y distal (tabla 5).

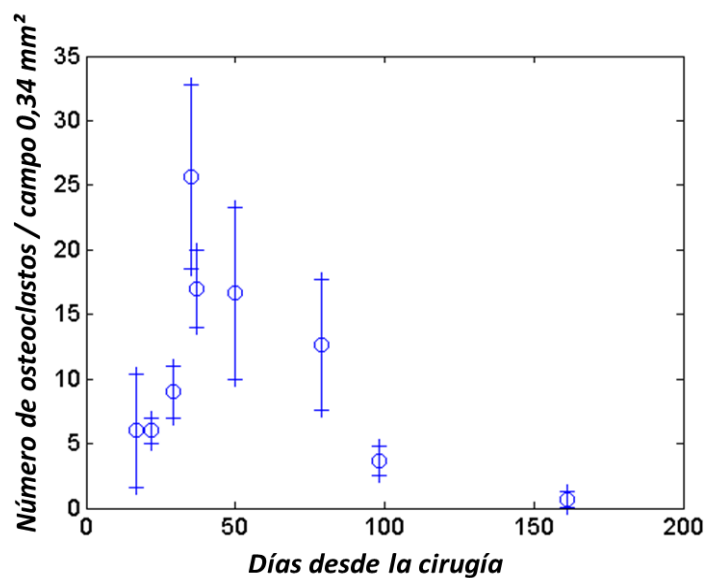


Fig. 56: Representación gráfica de la evolución de la cantidad media de osteoclastos por cada campo a 20X estudiado respecto al tiempo.

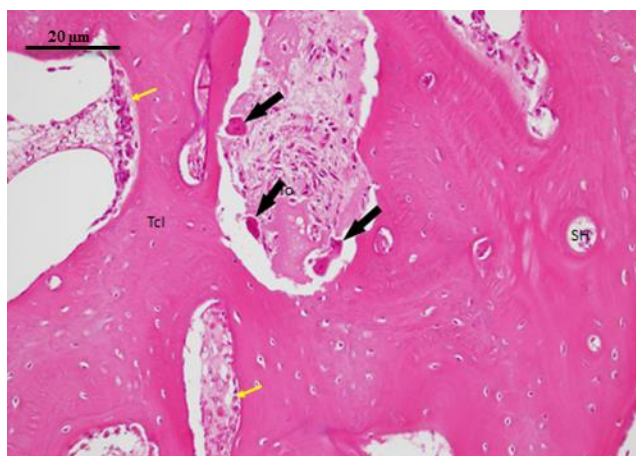


Fig. 57: Callo de 98 días tercio proximal. Las flechas negras señalan los osteoclastos durante la remodelación. Las flechas amarillas señalan acumulaciones de osteoblastos. Tinción: hematoxilina-eosina, x 100 (*Sh*: sistemas de Havers; *Tcl*: Tejido conjuntivo laxo, *To*: trabécula ósea).

Tabla 5: Cantidad neta de osteoclastos por zona.

Días desde la cirugía	Proximal	Medio	Distal	Media	SD
17	11	4	3	6,0	4,36
22	7	5	6	6,0	1,0
29	9	7	11	9,0	2,0
35	27	32	18	25,67	7,09
37	17	20	14	17,0	3,0
50	11	24	15	16,67	6,66
79	12	18	8	12,67	5,03
98	3	5	3	3,67	1,15
161	0	1	1	0,67	0,58

Las mediciones de la cantidad de osteoblastos por cada $100 \mu\text{m}^2$ de extensión mostraron cifras mayores durante la fase de transporte (contajes a los 17 días) y durante

los primeros días tras la cirugía, mostrando una caída gradual a partir de los 79 días. Los contajes variaron desde $9,83 \pm 2,16$ a $4,75 \pm 2,4$ a los 161 días. La SD media fue de 2,09 (Figs. 58 y 59). El análisis por zona mostró mayores cantidades en las regiones centrales que en las periféricas, salvo en el animal estudiado durante la fase de transporte (17 días) al igual que ocurría con los osteoclastos.

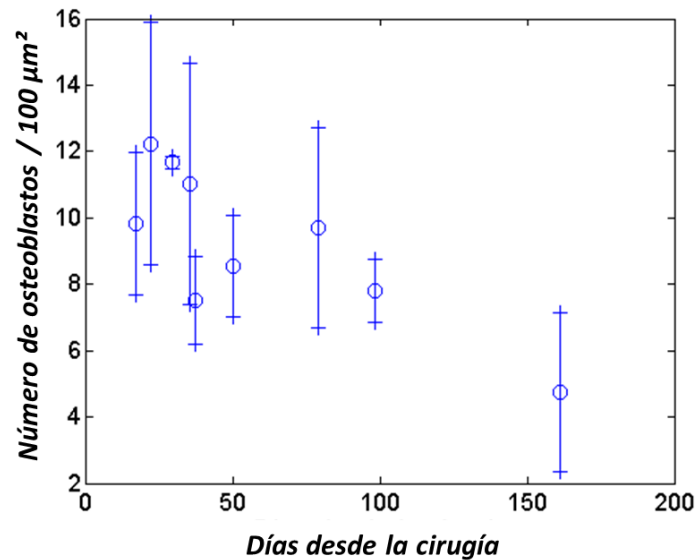


Fig. 58: Progresión de la cantidad media de osteoblastos por cada $100\mu\text{m}^2$ en el tiempo.

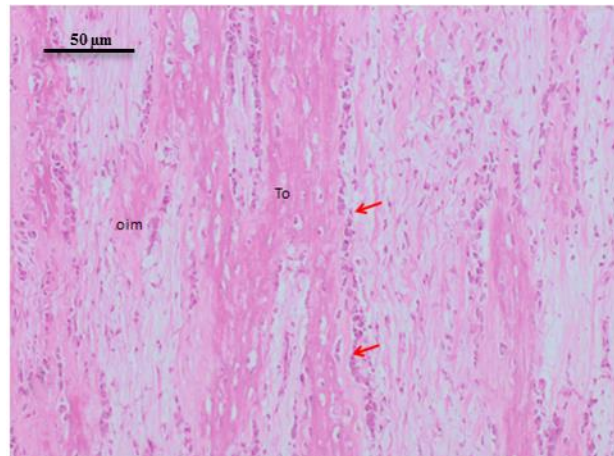
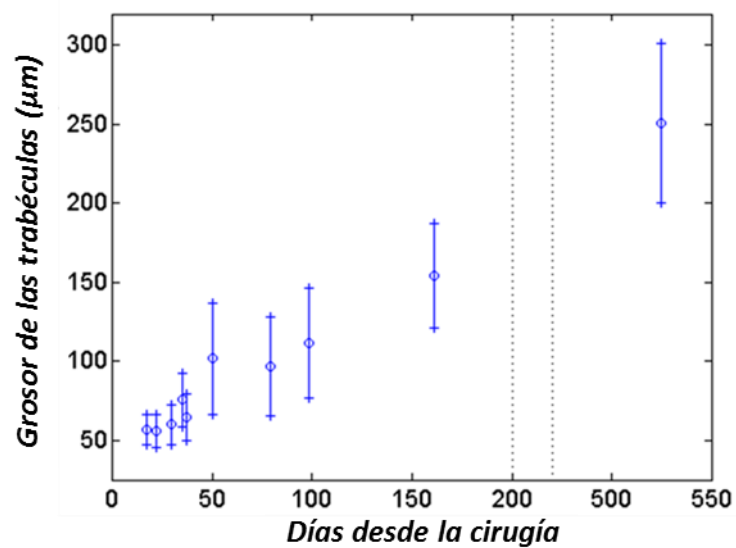


Fig. 59: Callo de transporte a los 37 días, tercio distal. Flechas rojas en la zona de los osteoblastos.

Tinción: hematoxilina-eosina, x 40 (*To*: trabécula ósea, *oim*: osificación intramembranosa).

Tabla 6: Grosor de las trabéculas óseas.

Días desde la cirugía	Grosor medio (μm)	SD media
17	56,6357639	9,74839295
22	55,7095238	10,6710416
29	60,150625	12,589247
35	75,4778646	17,2669328
37	64,5417411	14,771581
50	101,63776	35,0806794
79	96,8501488	31,6097642
98	111,852198	34,65755
161	154,284821	32,8208049
525	250,539049	50,5777526

Fig. 61: Progresión en el grosor medio de las trabéculas óseas. $R^2 =$ significancia.

1.3 Estudios inmunohistoquímicos

Colágenos tipo I y II

Los estudios inmunohistoquímicos mostraron un aumento de la expresión en la captación del anticuerpo para el colágeno tipo I frente al tipo II en cada una de las áreas estudiadas al microscopio (Fig. 62). Se calculó el ratio colágeno I /colágeno II, con una media del mismo de 2,48 (tabla 7).

Tabla 7: Evolución de los porcentajes de área ocupada por los colágenos tipo I y II.

	% COLÁGENOS (por campo de 0,34 mm ²)							
	Días desde la cirugía							
	98	79	50	37	35	29	22	17
Colágeno I	4,01%	3,27%	1,52%	3,22%	3,38%	0,94%	3,35%	1,17%
Colágeno II	3,74%	2,19%	8,98%	0,95%	0,28%	0%	1,88%	0%
Colágeno I/ Colágeno II	1,1	1,49	0,17	3,39	11,94	N/A	1,78	N/A

* N/A: no aplicable

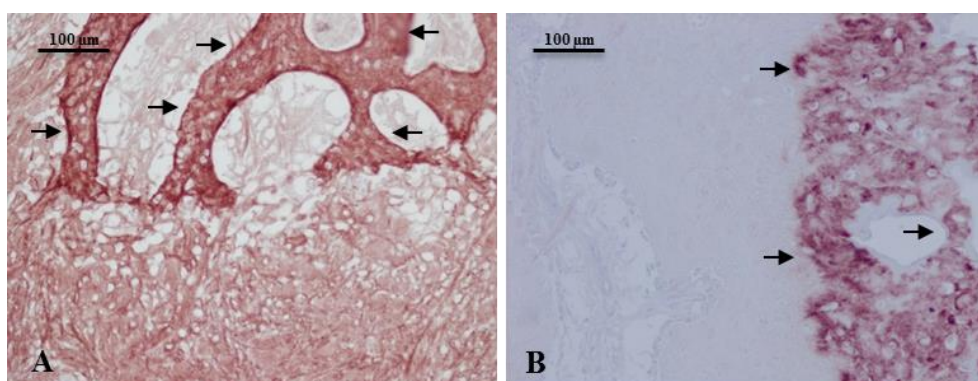


Fig. 62: Inmunohistoquímica de oveja sacrificada a los 98 días de evolución: (A) Colágeno tipo I, x 20 (B) Colágeno II, x 20. Las flechas indican las zonas captantes.

En las ovejas de 161 días y de 365 días no pudieron llevarse a cabo dichos estudios debido a dos hechos:

- El tiempo prolongado de inclusión en solución decalcificadora que precisaron las piezas, al tener un grado alto de osificación.
- Los callos de transporte estaban formados prácticamente por tejido óseo compacto maduro.

Estas dos circunstancias disminuyen notablemente la inmunogenicidad de los tejidos, motivo por el cual las tinciones con anticuerpos no son eficientes.

Anti Factor VIII

Se observaron los niveles más altos de captación del anticuerpo y por lo tanto de área vascular en la oveja estudiada a los 17 días de la cirugía (durante la fase de transporte) (Fig. 63). Los contajes fueron especialmente altos en el segmento proximal respecto al medio y al distal en este caso, presentando además los vasos mayores calibres a ese nivel (Fig. 64). El resto de animales mostró niveles más bajos de captación en el total del callo. Sin embargo, aunque los niveles de anticuerpo fueron más altos en todos los casos a nivel proximal, las diferencias entre las 3 regiones no fueron tan marcadas como en el caso de la oveja de 17 días, y se obtuvieron mayores niveles en las regiones distales que en las centrales.

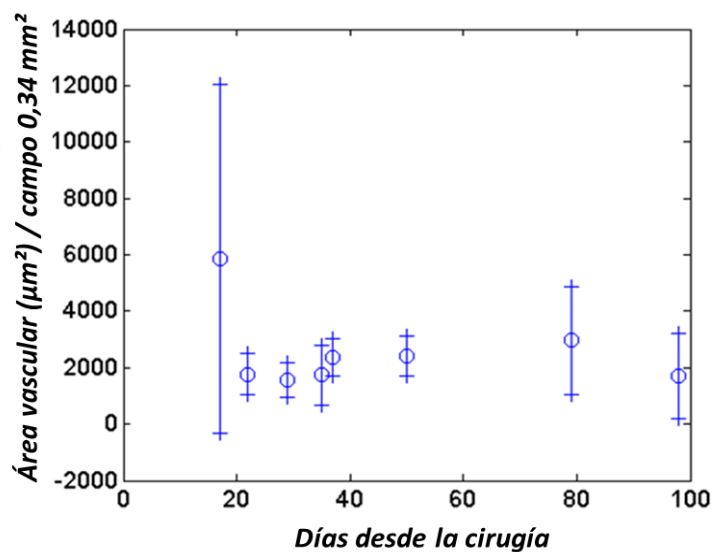


Fig. 63: Evolutivo del área vascular el global del callo de transporte óseo.

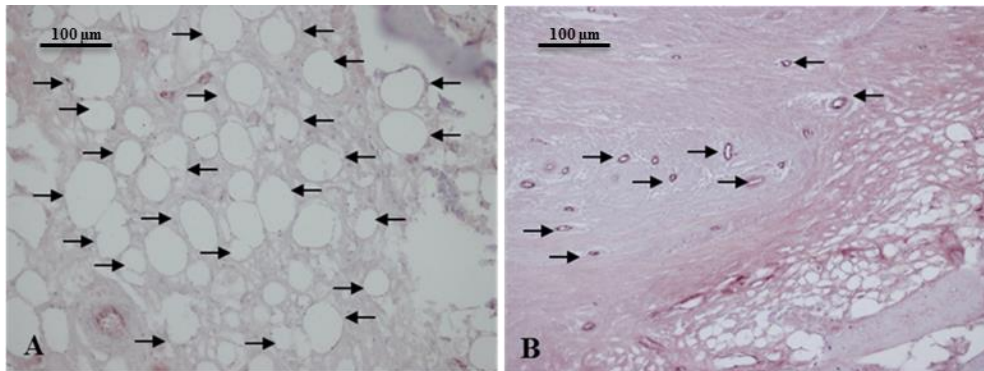


Fig. 64: Inmunohistoquímica Anti Factor VIII mostrando las diferencias de grosor y cantidad de vasos en el callo de transporte óseo entre los segmentos proximal y distal en la oveja de 17 días desde la cirugía.

(A) Segmento proximal, x 20. (B) Segmento distal, x 20. Las flechas marcan los vasos.

2. *Docking Site*

2.1 Pruebas de imagen

Estudios radiográficos

En el *Docking Site*, a partir de los 50 días tras la cirugía comenzó a verse la presencia radiográfica de callo, y se mantuvo en la mayor parte de los casos del estudio. Dicho callo apareció redundante (sobrepasando los márgenes del hueso adyacente normal) siendo más temprano y de mayor tamaño cuanto mejor afrontadas se hallaban las corticales. Sin embargo, a los 100 días tras la cirugía, sólo los dos animales de mayor duración presentaron un callo de osificación con suficiente entidad en los controles radiográficos como para permitir la retirada del distractor. En el animal sacrificado a los 98 días, la región de la osteotomía mostró ausencia de consolidación completa, por lo que radiológicamente hablaríamos de signos de retardo de consolidación (Fig. 65).

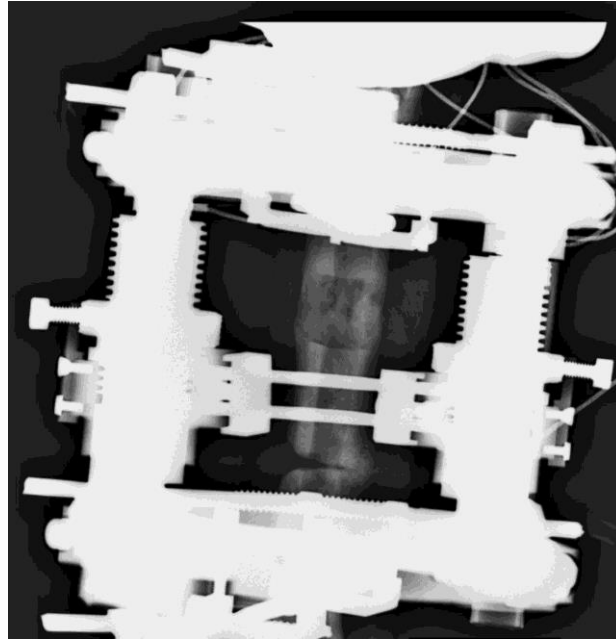


Fig. 65: Radiografía a los 98 días. *Docking Site* con callo de consolidación en una de las corticales y ausencia del mismo en la contralateral.

Tomografía Axial Computarizada (TAC)

En el *Docking Site* se pudo objetivar que el callo obtenido a partir de los 50 días era fundamentalmente perióstico. En los casos de menor evolución la expresión de dicha reacción perióstica fue muy tenue o no se apreció. A los 98 días más de la mitad estaba consolidado a pesar de tener aspecto de lo contrario en las radiografías. A los 161 la circunferencia apareció prácticamente ocupada por callo perióstico con signos de remodelación en algunas zonas, salvo en una pequeña región de una de las corticales (Fig. 66). Este defecto cortical continuó observándose a los 205 días. En el TAC de los 331 días la osificación fue completa y abarcó el 100% de la circunferencia cortical.

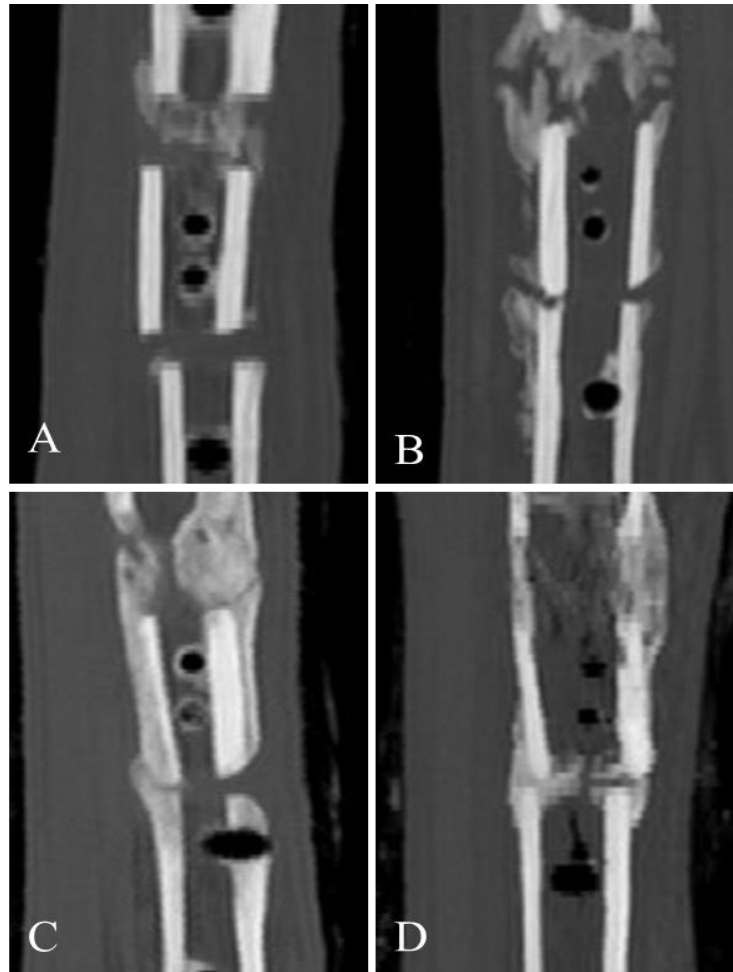


Fig. 66: Progresión radiológica del *Docking Site*. (A) 35, (B) 50, (C) 98 y (D) 161 días.

2.2 Estudio histomorfométrico

Descripción macroscópica de las piezas

Los *Docking* tuvieron una anchura media de 3,3 mm (máximo 5 mm a los 17 días por no haber acabado la fase de transporte). Todos aparecieron bien alineados salvo en la oveja de 37 días, donde presentó una traslación lateral de 2 mm, lo que originó ausencia de contacto en una de las corticales (Fig. 67).

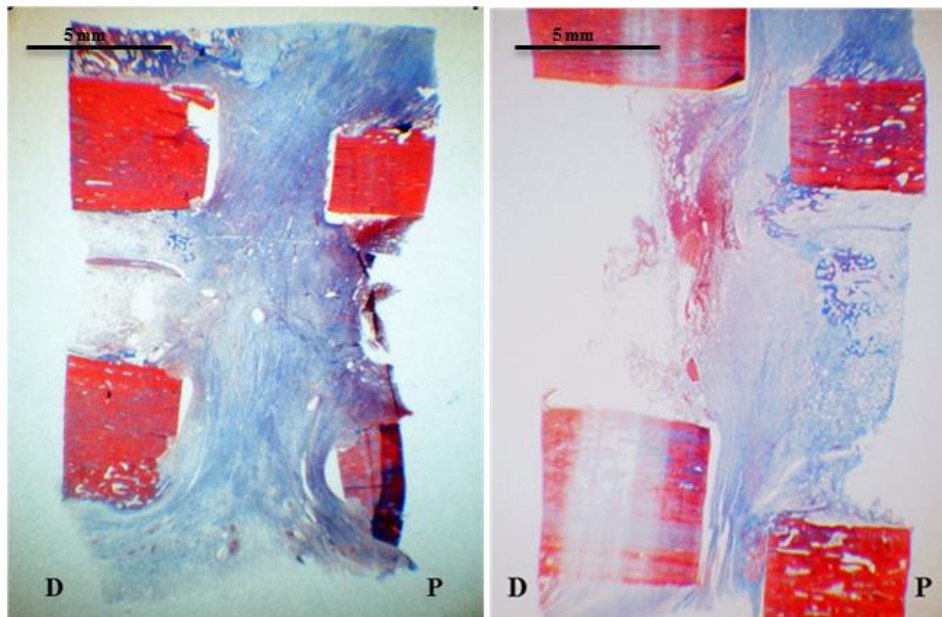


Fig. 67: Izquierda: *Docking Site* a los 22 días, bien alineado. Derecha: *Docking Site* a los 37 días de evolución, leve traslación mediolateral. Tinción: tricrómico de Masson, x 10 (*P*: proximal, *D*: distal).

Contajes tisulares

La figura 68 muestra las imágenes resultantes de la conversión de las microfotografías a 10 aumentos de los *Docking Site* en mapas óseos:

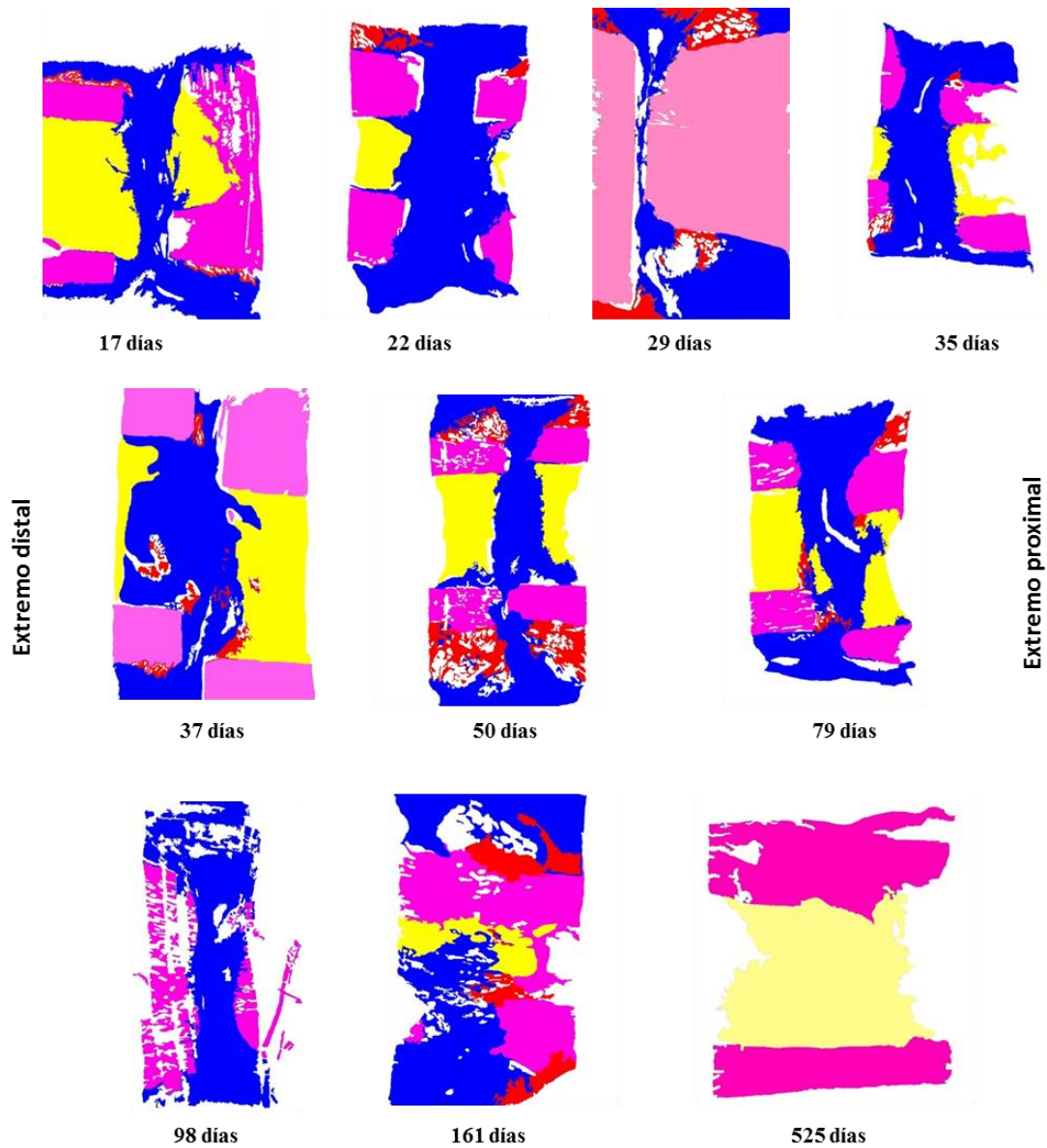


Fig. 68: Mapas óseos *Docking Site*. (Rojo: tejido óseo trabecular; Azul: tejido fibroso; Amarillo: Medula ósea; Rosa: Tejido óseo cortical).

El estudio de los tipos de tejidos presentes demostró un claro predominio de tejido fibroso en el *Docking Site*, llegando a alcanzar el 100%. A partir de los 98 días se observó un ascenso más marcado en la cantidad de tejido óseo trabecular, que alcanza el 20.96% a los 161 días. (Fig. 69). No se identificaron áreas de necrosis.

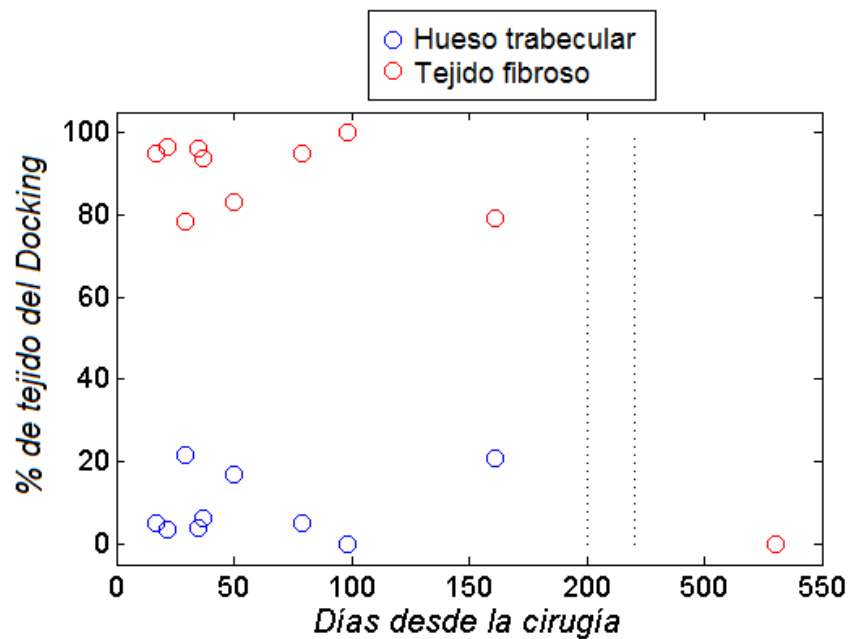


Fig. 69: Evolución del tejido fibroso y óseo trabecular en el *Docking*.

Estudio al microscopio óptico

En los cortes histológicos de hematoxilina-eosina estudiados a 20, 40 y 100 aumentos no se identificaron focos de osificación en el *Docking Site* de las ovejas de 79 y 98 días de evolución, apareciendo ocupada dicha zona por tejido conectivo fibroso denso. El resto de animales presentaron focos de osificación intramembranosa. Sólo en 2 animales (22 días y 50 días) se identificaron además focos de osificación endocondral. Dichos focos representaron hasta el 60% de los focos de osificación a los 22 días y sólo el 10% a los 50 días (Fig. 70). Al igual que en el callo, dichos focos fueron de mayor extensión comparados con los de osificación intramembranosa, pero en global aparecieron en menor cuantía.

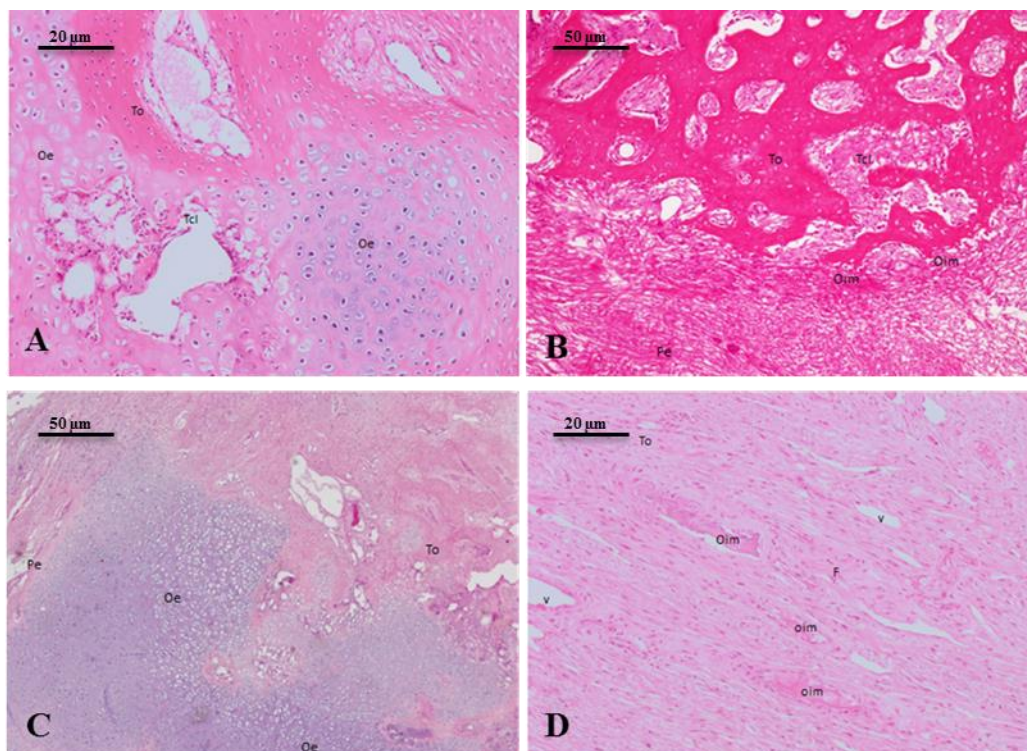


Fig. 70: Focos de osificación endocondral e intramembranosa en el *Docking Site*. (A) Oveja de 50 días, x 100 (B) Oveja de 50 días, x 40 (C) Oveja de 22 días, x 40 (D) Oveja de 22 días, x 100. Tinción: hematoxilina-eosina.

La osificación se inició a nivel subperióstico, y hasta los 35 días no se identificaron los primeros focos de osificación endóstica. Todos los focos identificados a nivel endóstico fueron de osificación intramembranosa.

2.3 Estudios inmunohistoquímicos

Colágenos tipo I y II

Los estudios inmunohistoquímicos mostraron captación de anticuerpos contra colágeno tipo I en todas las ovejas salvo en la de 98 días tras la cirugía. Las zonas captantes correspondieron a pequeños focos aislados de trabéculas neoformadas en la periferia de los *Dockings* (Fig. 71A). Sólo mostraron captación para colágeno tipo II las ovejas de 35, 22 y 50 días (Fig. 71B). Dichas zonas aparecieron en la periferia de las áreas osteotomizadas del hueso compacto, y por lo tanto no corresponderían al *Docking Site*. La zona central no captó ninguno de los dos anticuerpos, por lo que solo se visualizó tejido fibroso en su interior.

Al igual que en el caso del callo de transporte, no pudieron realizarse los estudios en las ovejas de 161 y 525 días por los mismos motivos citados anteriormente.

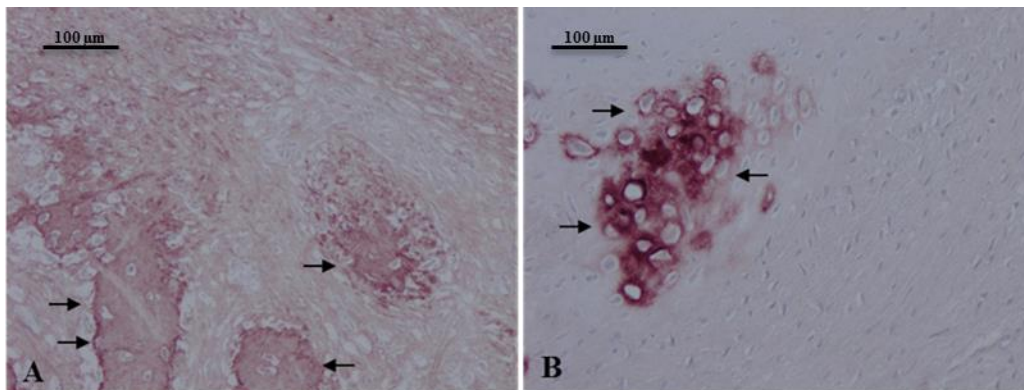


Fig. 71: Inmunohistoquímica frente a colágeno tipos I y II en la oveja de 50 días. Imágenes a 20X. (A) Las flechas marcan las zonas captantes de anticuerpos frente a colágeno tipo I. (B) Zonas captantes de anticuerpos frente a colágeno tipo II.

Anti Factor VIII

En el *Docking Site* se identificó un aumento marcado del área vascular en las muestras tomadas inmediatamente tras la fase de transporte. En las muestras de los sujetos entre 22 y 37 días se mantuvo dicho ascenso, aunque de menor cuantía al inicial. Se siguió por un descenso llamativo, que fue más lento a partir de los 50 días (Figs. 72 y 73).

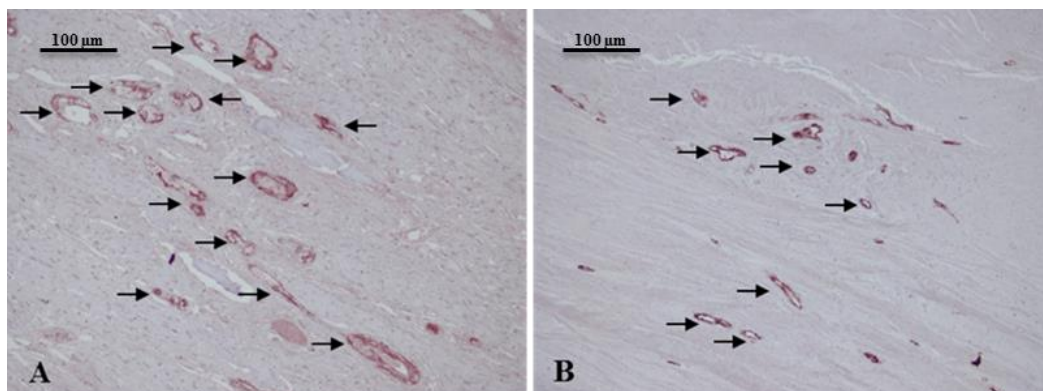


Fig. 72: Inmunohistoquímica Anti Factor VIII en el *Docking Site*. Ovejas de (A) 29 días, x 20 (B) 79 días, x 20. Las flechas señalan las zonas vasculares. Se aprecia disminución progresiva de tamaño y número.

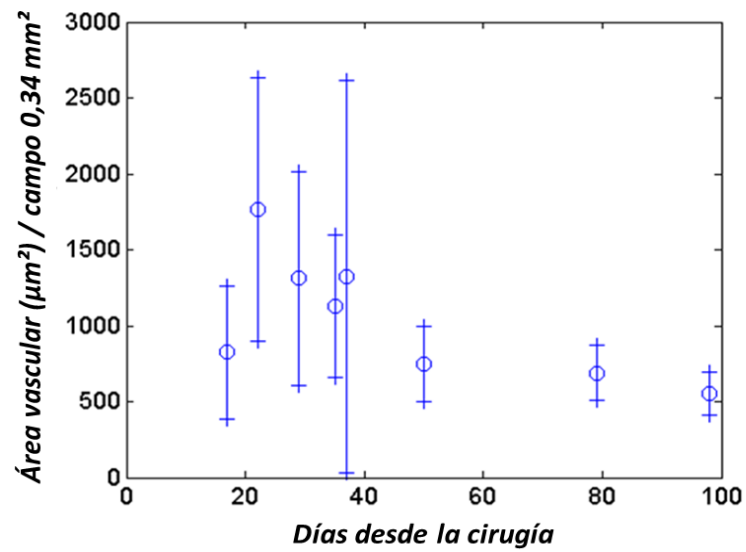


Fig. 73: Evolución del área vascular en μm^2 en función del tiempo.

Al igual que en el caso de los anticuerpos para colágeno, no pudieron realizarse estudios inmunohistoquímicos vasculares en las ovejas de 161 y 525 días por los motivos referidos anteriormente.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El hueso neoformado en el callo de la osteogénesis por distracción ha sido ampliamente estudiado a lo largo de los años. En muchos casos se han extrapolado los resultados obtenidos en alargamientos óseos^(8, 22, 31, 32, 35, 56, 70, 95, 111-115) al callo obtenido en los transportes óseos^(36, 54, 55, 58, 116), siendo estos estudios menos frecuentes. La gran cantidad de estudios realizados con diferente metodología ha mantenido vivo el debate sobre el tipo o tipos de osificación presentes al realizar un transporte óseo^(20, 32, 34, 37, 53, 54), pero al mismo tiempo han impedido obtener resultados concluyentes. El estudio de evolución de los tejidos neoformados en el callo de transporte óseo y su distribución celular durante todo el proceso, incluida la remodelación, supone una base importante sobre la que establecer principios de tratamiento que ayuden al éxito de este tipo de procedimientos. En cuanto al *Docking Site* cabe destacar los problemas relacionados con su consolidación como principal causa de fracaso de la técnica de transporte óseo⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾. A pesar de ello, son muy pocos los estudios^(36, 101-103) que se han centrado histológicamente en él. El presente trabajo sería el primero que ha seguido las pautas de la práctica clínica habitual, incluyendo la carga desde el primer día sobre el miembro intervenido, y ha mostrado una evolución histológica, del callo y el *Docking Site*, desde la fase de transporte hasta el final de la remodelación.

Los resultados obtenidos del estudio del callo de transporte óseo mostraron un modelo de osificación centrípeto (de la periferia al centro) y mixto, con un claro predominio de la osificación intramembranosa sobre la endocondral. En el *Docking Site* se detectó un retardo de consolidación en todos los sujetos, y un patrón de osificación mixto con predominio de la osificación intramembranosa, al igual que en el callo. Los resultados obtenidos mediante técnicas histomorfométricas fueron apoyados con un estudio inmunohistoquímico, tanto de tipos de osificación como desde el punto de vista vascular, convirtiéndolo en el primer trabajo conocido que ha realizado dichas técnicas sobre el *Docking Site*.

El sistema de fijación circular utilizado para la realización del presente estudio sigue las mismas directrices biomecánicas que los fijadores Ilizarov de la práctica clínica convencional. Además, el ritmo de distracción empleado, la conservación del periostio en el momento de realizar las osteotomías y el mantenimiento del apoyo y

actividad del miembro intervenido desde el momento de la cirugía, hacen de este un modelo bastante próximo al humano. Por todo lo anterior, se considera que los resultados obtenidos pueden ser tenidos como concluyentes y aplicables a la práctica médica diaria.

1. Callo de transporte

1.1 Estudio histomorfométrico

La histomorfometría es un método bien establecido para cuantificación histológica de volúmenes, superficies, contajes celulares y tejidos relacionados con la formación ósea. La determinación de los patrones evolutivos de los distintos tipos celulares, así como de los tejidos que aparecen como resultado del transporte óseo, no sólo durante la fase de transporte, sino también durante los periodos posteriores, se supone fundamental a la hora de establecer las bases terapéuticas del mismo.

Contajes tisulares

Las técnicas histomorfométricas también han sido empleadas por múltiples autores con distintos fines^(8, 9, 22, 34-37, 54, 113, 115, 117). Así Claes⁽⁵¹⁾ y cols en su trabajo acerca del efecto de la compresión cíclica sobre el foco de fractura o sobre el desarrollo de técnicas de distracción lateral, cuantifica los tipos de tejido existentes en el callo. Aunque hay múltiples estudios histológicos del callo de la osteogénesis por distracción, la mayoría presentan resultados descriptivos^(29-31, 48, 53, 95, 111, 115, 117), y son pocos autores los que dan datos histomorfométricos de las cantidades de tejido presentes en cada momento^(34-36, 54, 113, 118).

Los contajes tisulares realizados mostraron la existencia de una cantidad elevada de tejido fibroso en todo el callo de transporte óseo, predominante durante la fase de transporte y los 50 primeros días tras la cirugía, momento a partir del cual comienza a aumentar la cantidad de tejido óseo trabecular neoformado en el callo (Fig. 51). Ambos tipos de tejido alcanzan niveles similares en el callo alrededor de los 79 días desde la cirugía, teniendo ambos un desarrollo inverso a lo largo del tiempo. Además, durante esta primera fase se identificó la existencia de gaps o “lagunas hemáticas”, compuestas de fibrina y plasma, que posteriormente fueron ocupadas por tejido fibroso y rellenas de trabéculas óseas. Los mayores porcentajes de tejido fibroso se identificaron en la zona

central. Previamente a las técnicas histomorfométricas se realizaron contajes de los distintos tejidos por parte de Mora y cols⁽¹¹⁰⁾ en los mismos sujetos, basándose en reconstrucciones 3D de TAC, obteniendo resultados que corroboran los obtenidos mediante técnicas histomorfométricas. Además, los resultados aquí presentados pueden compararse con los de trabajos como el de García y cols⁽³⁶⁾. Estos autores realizaron estudios histomorfométricos en ovejas sometidas a transporte óseo mostrando los resultados por zonas del callo (proximal, medio y distal) en tres grupos de animales sacrificados en distinto momento evolutivo (3 semanas de diferencia entre cada grupo). Al realizar un análisis en conjunto de los datos, se observó cómo los niveles de tejido óseo que se exponían a las 3, 6 y 12 semanas desde la cirugía eran más altos que los aquí obtenidos, alcanzando aproximadamente el 100% en las tres regiones del callo al final proceso. Sin embargo, en el presente estudio se obtuvieron niveles de alrededor del 64% de trabéculas neoformadas en dicho momento. Además, se habla incluso de corticalización de parte de hueso, lo cual determinaría que el proceso de consolidación más rápido al obtenido en el presente trabajo. Sin embargo, dicho estudio fue realizado usando un sistema de transporte sobre placa, algo no habitual en la práctica clínica, e incluyó en el proceso quirúrgico una tenotomía del tendón calcáneo para evitar la carga durante la fase de latencia. Por lo anterior, podría deducirse que se alteró el patrón de marcha de los animales, lo cual podría haber tenido efectos sobre el proceso de osificación.

Otro de los trabajos a destacar es el de Fink y cols⁽³⁴⁾ en 2003. Utilizó perros, sometidos a un alargamiento óseo con un sistema de fijación circular, permitió el apoyo y aplicó un régimen de distracción de 1 mm al día (0,5 mm/12h). Aunque los resultados histomorfométricos que obtuvo fueron similares a los aquí presentados a los 25 días, en el grupo estudiado a los 50 días, los porcentajes de tejido óseo fueron bastante más bajos a los que se obtienen de este trabajo (28,64 vs 40,27%). Esto podría deberse a que centran el estudio en la región endóstica y desechan la perióstica, donde se concentra gran parte del tejido óseo neoformado.

En cuanto a los modelos de distracción sobre mandíbulas, cabe destacar estudios como el de Zimmerman y cols⁽⁹⁾. Éste compara los porcentajes de área ocupada de tejido óseo neoformado en función de la velocidad de distracción en mandíbulas de cerdo. Los resultados que obtiene en los sujetos de 1 mm/día a igualdad de tiempo

(alrededor del 14%) son menores a los aquí obtenidos (aproximadamente 28%). Sin embargo, hay que tener en cuenta que, además de no ser un transporte óseo, existe ausencia de estímulo por la carga, ausencia de fase de latencia y las peculiaridades de la región anatómica que estudió.

No se ha encontrado ningún estudio en la literatura publicada que muestre una representación esquemática empleando un software informático de los cambios histológicos del callo de transporte óseo como el aquí presentado (Fig.50). La realización de los mapas óseos ayudó a tener una imagen esquemática de la evolución espacial de los tejidos en el callo, así como a cuantificar las cantidades de los distintos tejidos implicados. A los aumentos a los que se realizaron dichos mapas no se observaron cambios a tejido óseo compacto dentro del callo en ninguno de los casos, salvo en la oveja de 525 días. De la misma forma, no se identificaron áreas de necrosis durante el análisis.

En cuanto al patrón de osificación perióstica o endóstica, fue de tipo mixto en las primeras fases, con un ligero predominio de osificación a costa del periostio en los primeros 50 días (Fig. 52). Este hallazgo fue confirmado mediante un estudio paralelo realizado por Mora y cols⁽¹⁰⁾, no motivo de esta tesis, en el que se determinaron los distintos volúmenes del callo perióstico y endóstico a lo largo del tiempo. Pocos son los trabajos que profundizan en el rol del periostio^(8, 9). El trabajo desarrollado en conejos por Kojimoto⁽⁸⁾ y cols demostró como el periostio aparece como un elemento clave para dar estabilidad al callo neoformado, de manera que en los sujetos del estudio en los que lo reseco se desarrolló un callo endóstico incapaz de mantener el peso corporal. Otros como Zimmerman⁽⁹⁾ y cols hablan de un predominio de osificación endóstica, aunque hay que tener en cuenta que excluyó la región periférica del callo para sus mediciones. Al igual que en el caso de la distribución tisular, tampoco existen datos cuantitativos publicados de la distribución de los tipos de osificación (perióstica-endóstica) durante periodos tan largos de tiempo como el que aquí se presenta. Lo que parece establecerse es que el periostio se conforma como un elemento clave para mantener la estabilidad del callo en la osteogénesis por distracción.

Tipos de osificación

En cuanto al estudio de los tipos de osificación del callo, existe una clara diferencia entre los resultados obtenidos en animales de talla pequeña^(8, 113, 114, 119) y grande^(20, 21, 30, 34-36, 55), apareciendo trabajos que muestran un modelo de osificación puramente intramembranosa^(20, 37, 54, 118), endocondral^(8, 37), mixta^(22, 34-36, 113, 114, 117, 119) e incluso se ha descrito un tercer tipo de osificación que podría estar presente (transcondroide)⁽¹¹⁵⁾. El análisis de los estudios publicados muestra como la mayoría de estudios que hablan sobre osificación endocondral en el callo se han realizado en animales pequeños (ratas, conejos, gallinas, etc). Sin embargo, los realizados en animales cuyas características morfológicas permiten utilizar sistemas de fijación circulares o laterales similares a los empleados en la práctica clínica, obtienen patrones de osificación puramente intramembranosa o mixta con predominio de osificación intramembranosa.

Los resultados obtenidos en el análisis del callo de transporte óseo de los sujetos de este estudio muestran un patrón de osificación puramente intramembranoso, y mixto en algunos animales. La variabilidad a lo largo del tiempo en la distribución de los tipos de osificación presentes, mostró un predominio claro espacial y temporal de la osificación intramembranosa sobre la endocondral. Dichos focos de osificación endocondral se visualizaron mediante técnicas histomorfométricas únicamente en tres animales, los de 22, 50 y 98 días postcirugía (Fig. 53). Así mismo mientras que en el animal de 22 días solo suponían el 5% del total de focos de osificación presentes, en el de 50 días alcanzó hasta el 15% de los mismos, siendo éste el que mostró niveles más altos de este tipo de osificación. Aunque comparativamente los focos de osificación endocondral eran de mayor tamaño que los de osificación intramembranosa, estos últimos en conjunto ocupaban la mayoría del área osificada, mostrando un claro predominio sobre la osificación endocondral. Además, estos últimos sólo se detectaron a nivel subperióstico, no encontrándose ningún foco de osificación endocondral a nivel endóstico, y sólo en un animal en el segmento distal.

Son varios los autores que aportan datos de osificación mixta en el callo de la osteogénesis por distracción^(22, 34-36, 113, 114, 117, 119). Cabe destacar el de García y cols⁽³⁶⁾, que en su estudio de transporte óseo en ovejas, habla de un claro predominio de la

osificación intramembranosa sobre la endocondral y el de Forriol⁽³⁵⁾ y cols, que en su trabajo sobre distracción determinan que la cantidad de osificación endocondral es moderada, pero las áreas de osificación de este tipo disminuyen mucho en cantidad a partir de las 4 semanas, siendo el único autor que encuentra dichos focos a nivel medular. También existen estudios de distracción fisaria^(30, 31) que hablan de osificación de tipo mixto, con predominio de la intramembranosa. Sin embargo, ninguno de ellos usa un fijador circular.

Entre los autores que usan fijadores tipo Ilizarov, Krawczyk y cols⁽²²⁾ presentaron un modelo de distracción ovino comparando el patrón de osificación en función de distintos tipos de osteotomía, y determinaron que la osificación endocondral aparecía a partir de las 5 semanas y la intramembranosa a las 9, sobre todo a nivel perióstico. Frierson y cols⁽⁴⁶⁾ realizaron un trabajo similar en perros, determinando que las osteotomías hechas con sierra oscilante aumentaban la cantidad de tejido cartilaginoso y retrasaban la consolidación, pero aun así la osificación parecía predominantemente intramembranosa. Fink y cols⁽³⁴⁾ en su trabajo en 2003 emplearon un fijador circular, e intentaron determinar el patrón de aparición de los distintos tipos de osificación durante la distracción en un modelo animal canino. Determinaron que la osificación era de tipo mixto, apareciendo los focos de osificación endocondral entre el frente de osificación y el gap fibroso, con predominio de la osificación intramembranosa sobre la endocondral de 5 a 1. Sin embargo, limitaron su estudio a la región endóstica, y aunque obtuvieron un total del 20% del área de osificación como intramembranosa y un 4% como endocondral, estos resultados podrían tener valores muy diferentes si se incluyera la osificación de la región perióstica. Su hipótesis acerca de que aunque el fijador sea muy estable se dan micromovimientos en la interzona fibrosa-osificada que explicaría la aparición de los focos de osificación endocondral, aparece como una explicación relevante dada la estabilidad del sistema de distracción empleado.

El motivo por el que se presentan estos focos de osificación endocondral es causa de debate y estudio en la actualidad. Ilizarov^(20, 21) en sus trabajos a finales del siglo XX determinó las diferencias en función del tipo de osteotomía y del ritmo de distracción, observando que cuando se usa la distracción más gradual (en más pasos al día), la actividad en muchos tejidos tiene cambios característicos de la histogénesis en el crecimiento de los miembros durante la embriogénesis, fetal y postnatal. Con el fijador

circular se conseguiría suficiente estabilidad en todos los planos, pero permitiría micromovimientos axiales suficientes que estimularían la osteogénesis, traduciendo la existencia de los focos de osificación endocondral como consecuencia de este déficit de estabilidad. Otros autores como Paley⁽¹²⁰⁾ y cols relacionaron los focos de este tipo de osificación con áreas de isquemia vascular. Sin embargo, el hecho de que la mayor cantidad de tejido cartilaginoso sea reportada por autores que desarrollan sus estudios en animales de talla pequeña^(8, 32, 50, 121), que usan fijadores monolaterales y por lo tanto más inestables que los circulares, hablaría más en favor de la teoría de Ilizarov.

Como respuesta a esta hipótesis sobre la estabilidad del fijador surgen trabajos como los de Aronson y cols⁽¹²²⁾ y Claes y cols⁽⁵⁵⁾. Aronson y cols⁽¹²²⁾ intentaron demostrar las diferencias en la osificación en función del tipo de fijador usado (Ilizarov vs monolateral) para la distracción en perros. Determinaron que bajo las mismas condiciones y ritmo de distracción, y aunque ambos sistemas de fijación eran suficientemente estables, el fijador circular mostraba un patrón de osificación más uniforme, con columnas completamente paralelas a la dirección de la distracción. Esto se debía a que aplicaba una tensión concéntrica sobre la región osteotomizada, y evitaba las angulaciones. En el caso de los fijadores monolaterales, la tensión aplicada sobre el callo era excéntrica, dejando que el callo se angulara, apareciendo más ensanchado en la cortical más cercana a la barra del distractor que en la contralateral. Todo ello provocaba que la osificación no fuera uniforme como en el caso anterior, y aunque en ambos casos aparecían focos de osificación intramembranosa, ésta era más abundante en el caso de los fijadores circulares. Siguiendo esta línea de investigación, Claes y cols⁽⁵⁵⁾ desarrollaron varios estudios referentes a la influencia del tipo de distractor sobre la osificación. Así, además de estudiar los fijadores circulares, presentaron un modelo de distracción transversal, donde sólo detectaron osificación intramembranosa, lo cual explicó cómo debido a la existencia únicamente de tensión uniaxial y la ausencia de compresión cíclica, ausencia de inestabilidad o de fuerzas musculares que actuaran sobre el foco. El fijador empleado para el desarrollo de la presente tesis era bastante estable (600 N/mm aproximadamente), por lo que se puede concluir que bajo condiciones biomecánicas ideales, una tensión longitudinal pura debería estimular una osificación puramente intramembranosa. Sin embargo, debido a la tensión añadida, que varía según el sistema de fijador, y los movimientos axiales de los fragmentos,

favorecidos por la carga sobre el miembro osteotomizado, se favorecería un entorno que da lugar a la aparición de tejido cartilaginoso y focos de osificación endocondral en consecuencia, al igual que ocurre en el proceso de consolidación de las fracturas^(123, 124).

Independientemente de la región anatómica estudiada, las publicaciones^(8, 34, 35, 48, 50, 122, 125, 126) hablan de un frente de osificación que crece desde la periferia al centro, tal y como se describe en el presente trabajo, rellenando el gap fibroso central. Este gap central, estuvo compuesto por tejido fibroso en este ensayo y, fue identificado en todos los animales tanto radiológica como histológicamente hasta los 161 días. También se observó cómo el tejido óseo trabecular creció a la vez en toda la longitud del callo, osificándose desde la periferia al centro. Dichas imágenes histológicas se correlacionaron con las imágenes radiográficas seriadas obtenidas en cada caso hasta el momento del sacrificio, y que se utilizaron para determinar la correcta evolución del transporte. El gap central ha sido ampliamente descrito. En algunos casos como en los trabajos de Forriol y cols⁽³⁵⁾ se hizo una extensa descripción de la disposición de los tejidos y proporción de tejido cartilaginoso, y Karaharju y cols⁽⁹⁵⁾ en sus estudios en ovejas describieron un proceso de osificación centrípeta tanto en sus estudios en distracción ósea en mandíbulas como en el radio de dichos animales. Aronson y cols⁽¹²²⁾ también encontraron dicho gap independientemente de que el distractor fuera pluri o monoaxial. Sin embargo, este hallazgo va en contra de los resultados obtenidos por otros autores⁽³⁶⁾, que han empleado sistemas de transporte sobre placas en lugar de fijadores externos, los cuales proponen un modelo de progresión de la osificación de proximal a distal. La variabilidad en la metodología de los diferentes trabajos podría explicar la falta de consenso en este aspecto, aunque cabría deducir que el sistema de distracción empleado influya en la progresión de la osificación.

El modelo de osificación centrípeta quedaría apoyado por la distribución del *Woven Bone* en el callo. Así, en el presente estudio, todo el tejido óseo neoformado en el callo fue de este tipo hasta los 50 días. Posteriormente comenzaron a identificarse los primeros Sistemas de Havers, a partir de trabéculas que se alejaban de los focos de osificación. Este proceso se identificó a nivel periférico. La mayoría de estudios que hablan sobre la diferenciación del tejido óseo limitan el seguimiento de la fase de consolidación alrededor de un mes^(9, 39, 40, 42, 49), encontrando que la práctica totalidad del tejido óseo formado ese periodo es de tipo *Woven Bone*. Al no prolongar el tiempo de

seguimiento no pueden determinar en qué momento se diferencia a hueso maduro. Aquellos que estudiaron la diferencia en la osificación en función de si se permitía o no la carga de los animales^(39, 40, 42) sólo encontraron como diferencia entre ambos grupos que los especímenes a los que se permite la carga presentan callos más desarrollados, con mayor interconexión entre las trabéculas óseas, pero todos formados completamente por *Woven Bone* originado a partir de focos de osificación intramembranosa o endocondral. Además, exponen una progresión centrípeta del *Woven Bone* como en la presente tesis, por lo que el modelo de osificación de la periferia al centro quedaría apoyado de esta forma.

Contajes celulares y estudio de las trabéculas óseas

Los contajes de los tipos celulares implicados en la remodelación ósea pueden relacionarse con la progresión de la osificación. En vistas a esto, se determinó la variabilidad en las cantidades de osteoclastos y osteoblastos presentes en el callo en cada momento.

En el caso de los osteoclastos, estos mostraron una distribución normal, mostrando un aumento progresivo en los contajes durante las fases iniciales y un descenso posterior en el periodo comprendido entre los 50 y 79 días post-transporte (Fig. 56). Las cantidades de osteoblastos por cada 100 μm^2 de extensión medidas, fueron mayores durante la fase de transporte óseo y los primeros días tras la cirugía, mostrando una caída gradual a partir de los 79 días (Fig. 58). Además, el estudio por zonas tanto en el caso de los osteoblastos como de los osteoclastos mostró mayores cantidades a nivel proximal en los primeros días, seguidos del segmento medio y distal en el animal estudiado durante la fase de transporte (17 días). En los animales estudiados hasta los 29 días, las cantidades de ambos tipos celulares fueron mayores a nivel proximal y distal respecto a la zona central. Los demás especímenes mostraron niveles más altos de ambos tipos celulares en el segmento central que en los otros dos, manteniéndose esa cadencia hasta las últimas fases, donde las cantidades a nivel medio y distal son similares, con un ligero predominio de la región central. Ello indicaría un aumento de la actividad celular, y por lo tanto progresión del proceso de remodelación desde proximal y distal hacia el centro con el tiempo.

Existen múltiples estudios hablando sobre la evolución de los osteoblastos en el callo de la osteogénesis por distracción, pero la mayoría de ellos dan resultados descriptivos^(37, 40, 54, 118, 127), o se basan en la expresión de determinadas moléculas como la osteocalcina o el BMP 2/4 para determinar sus variaciones^(42, 121). El trabajo de Fink y cols⁽³⁴⁾ en perros es el único encontrado en cuanto a distracción ósea que habla de la cantidad de osteoblastos por zona con datos cuantitativos, pero como se ha indicado en el apartado previo, limitó su estudio a la región endóstica y al igual que todos los anteriores, limita a mucho menor seguimiento la fase de consolidación. No se han encontrado publicaciones en la literatura con datos cuantitativos referentes a la evolución de los osteoblastos y osteoclastos en el callo de osificación en transportes óseos. En lo que sí se coincide con los anteriores autores, aun siendo estudios descriptivos, es que los osteoblastos aparecen en gran cantidad rodeando las trabéculas de hueso neoformado, así como los osteoclastos, lo que indicaría un proceso de remodelación activa. Además, estos resultados quedarían avalados por las mediciones de los callos realizados mediante técnicas de TAC por Mora y cols⁽¹¹⁰⁾ en los mismos especímenes de forma paralela, coincidiendo los volúmenes máximos del mismo con los periodos de mayor actividad celular (0-100 días postcirugía).

En cuanto a la evolución de las trabéculas óseas, éstas aparecieron orientadas en la dirección del transporte en todos los sujetos, salvo en el animal de 17 días (Fig. 60) (sacrificado durante dicha fase), lo cual podría explicarse por la corta evolución del mismo, que limitaría la capacidad de reorientación de las fibras colágenas, aún en formación en este periodo. La variación en el grosor de las trabéculas se midió como cuatro veces mayor al final del proceso (Fig. 61), siendo más gruesas en todo momento las proximales que las distales, pero apareciendo todas coetáneamente a lo largo del callo, cerrando el gap desde la periferia al centro. Ello corrobora el modelo de osificación centrípeta que se ha defendido a lo largo de la presente tesis. Si se comparan los resultados del presente estudio con los trabajos que aportan datos cuantitativos^(34, 121), también muestran grandes incrementos en el grosor de las mismas en los primeros días (Tabla 6). En aquellos trabajos en los que se estudia la influencia de la carga sí se habla de mayores grosores de las trabéculas óseas en el grupo en carga respecto al de descarga.

Los estudios inmunohistoquímicos cuyos resultados se presentan más adelante, determinarán que las regiones de mayor grosor trabecular coinciden con aquellas de mayor aporte vascular, lo que apoyaría la teoría ya propugnada por Ilizarov^(20, 21) de la necesidad de un correcto aporte vascular además de estabilidad para que la osificación del callo tenga éxito.

1.2 Estudios inmunohistoquímicos

Colágenos I y II

Los estudios inmunohistoquímicos se mostraron más sensibles que la histomorfometría a la hora de detectar la presencia de focos de osificación intramembranosa o endocondral, los cuales están directamente relacionados con la presencia de colágeno tipo I o II respectivamente.

Así, el análisis de las muestras determinó la presencia de focos de osificación endocondral en la mayoría de animales, aunque en menor cuantía que los de osificación intramembranosa, siendo inexistentes en las ovejas de menor tiempo de seguimiento y alcanzando niveles aproximados, aunque nunca iguales, a los de colágeno tipo I en los animales de alrededor de los tres meses de seguimiento. Así la media de las relaciones entre ambos tipos de colágeno determinó que los niveles de colágeno tipo I aparecieran aproximadamente dos veces y media más altos que los del tipo II (Tabla 7).

La distribución por zonas de los mismos coincidió con los resultados de histomorfometría, apareciendo todos los focos de tejido cartilaginoso en la región periférica (subperióstica), no evidenciándose la presencia de focos endósticos en ningún caso. Además, se detectaron en mayor cuantía en los segmentos proximal o medio en todos los casos, siendo muy escasos los contajes a nivel distal.

A pesar de la gran utilidad demostrada por las técnicas inmunohistoquímicas para determinar los tipos de osificación, éstas se han usado en muy pocos trabajos con estos fines^(35, 42, 119). Ello podría ser debido a la complejidad asociada a la obtención de diluciones correctas que eviten falsos positivos en las muestras, por lo que la mayoría de estudios se limitan a estudios histomorfométricos.

Entre los autores que las emplean, cabe destacar el trabajo de Forriol y cols⁽³⁵⁾. Dichos autores utilizaron los mismos anticuerpos Anti-colágeno (Biogénesis®) que se han usado para el presente estudio (aunque a diferentes diluciones) en sus trabajos de estudio del ritmo de distracción ósea en ovejas. Dicho trabajo concluyó que independientemente de la velocidad de distracción la osificación es de tipo mixto, con cantidades moderadas de osificación endocondral, definiendo como “moderados” dichos niveles dos semanas tras la distracción y decreciendo a las 4 semanas. Sin embargo, no se muestran datos cuantitativos de las cantidades de colágeno presentes. Además, en contra de los resultados de otros autores^(8, 37, 113-115, 117), incluido el presente estudio, detectaron la presencia de focos de osificación endocondral en la región endomedular. Este hecho, además de las variaciones en los contajes de colágeno, mostrando niveles más altos de los habituales de colágeno tipo II, podría explicarse por el empleo de sistemas de distracción monolateral, menos rígidos que los distractores circulares como el usado para el presente estudio.

Radomisli y cols⁽⁴²⁾ compararon los resultados inmunohistoquímicos de un grupo de ratas sometidas a distracción ósea con un minifijador, separándolas en función de que se autorizara o no la carga. Los patrones en la distribución del colágeno tipo I y II fueron similares en ambos grupos, apareciendo cantidades mayores de tipo I respecto al II en todos los casos. Sin embargo la distribución del colágeno tipo II fue más amplia en el caso de los animales a los que no se permitió cargar. En algunos cortes de animales aislados se detectaron algunos focos de osificación endocondral endomedulares, lo que se interpretó como un hallazgo casual.

Previo al empleo de técnicas inmunohistoquímicas, se utilizó la electroforesis para caracterizar los colágenos existentes en el callo. Así, Kallio y cols⁽³⁷⁾ a finales del siglo XX presentaron su estudio de la matriz ósea del callo neoformado en ovejas durante los primeros 14 días de distracción con un sistema de fijación circular. Aplicando una fase de latencia de 7 días y un ritmo de distracción de 1 mm/día, determinaron los distintos componentes que formaban la matriz ósea empleando técnicas de electroforesis, encontrando que a partir de la segunda semana de inicio de la distracción la cantidad de colágeno presente en el callo se duplicaba. Sin embargo no detectó colágeno tipo II en ningún caso. Otros autores de la época^(20, 122, 128, 129) ya habían hablado de la casi inexistencia de focos de osificación endocondral empleando diferentes métodos. En la

misma década, Karaharju y cols⁽⁹⁵⁾ publicaron su estudio en ovejas, comparando las diferencias en la matriz ósea, en función de si se realizaba distracción fisaria o a través de una osteotomía, separando este grupo en distracción de hueso tubular o mandíbular. Mantuvieron los mismos ritmos de distracción en los grupos, pero emplearon diferentes sistemas de distracción (tubulares, circulares, minifijadores). Sin embargo, concluyeron que en todos los casos el depósito de la matriz ósea era el mismo, y que se detectaba un predominio de colágeno tipo I sobre el II, aunque se detectaron algunas áreas aisladas del mismo.

Aunque no se han encontrado más trabajos publicados en la literatura con los que poder comparar los resultados de la medición de los distintos tipos de colágeno, la coincidencia con estudios que muestran datos descriptivos, y la similitud a los resultados obtenidos mediante histomorfometría, se considera que los resultados aquí expuestos pueden ser consistentes y científicamente relevantes.

Anti-factor VIII

Los estudios con anticuerpo Anti-factor VIII (marcaje de los endotelios vasculares) mostraron que los niveles más altos de vascularización correspondieron a las regiones proximales en todos los casos, seguidos por las distales y finalmente por la región central, aumentando el área vascular hasta el periodo de tiempo de los 30-50 días para decrecer después (Figs. 63 y 64). Además, dichos vasos neoformados seguían el eje de distracción. De ello puede deducirse que la vascularización progresa desde los márgenes hacia el centro del callo, siguiendo el sentido de la osificación. Dichas zonas proximales corresponden a las mismas áreas donde se localizan los focos de osificación endocondral, por lo que el presente estudio pondría en duda la teoría sustentada por Paley⁽¹²⁰⁾ a cerca de la isquemia tisular como causante de los focos de osificación endocondral.

Se han hallado pocos trabajos publicados^(35, 119) que emplearan técnicas inmunohistoquímicas para la determinación de la vascularización en un modelo de osteogénesis por distracción. Uno de los más recientes es el de Forriol⁽³⁵⁾ y cols en 2010, quien en su estudio histológico demuestra las uniones entre los vasos endósticos y periósticos, así como la invasión de las regiones avasculares ocupadas por tejido cartilaginoso, tras lo cual se produce la osificación de las mismas. Sin embargo, sólo

hace un estudio descriptivo. Previamente, Li y cols⁽¹¹⁹⁾ en 1999 estudiaron las diferencias en la vascularización en función del ritmo de distracción (0,3-0,7-1,3-2,7 mm/día) durante la osteogénesis por distracción usando también estas técnicas (con anticuerpos anti colágeno IV y frente a células endoteliales). Concluyeron que había una mayor respuesta angiogénica con ritmos adecuados de distracción (0,7-1,3 mm/día), no estimulándola los ritmos más bajos e inhibiéndola los más altos. Sus resultados fueron concordantes con Ilizarov⁽²⁰⁾ y Aronson y cols⁽¹²⁵⁾. Sin embargo, solo midieron la existencia de los precursores vasculares (no el área vascular) y en un solo momento evolutivo (al final de la distracción). Esto explicaría los mayores niveles de captación en el gap fibroso central respecto a las regiones periféricas, que es avascular inicialmente, coincidiendo finalmente con varios autores^(35, 48, 50, 125), entre los que se incluye el presente estudio, en que la red vascular se forma de la periferia al centro.

Entre los estudios histológicos (no inmunohistoquímicos) más completos del callo de transporte, se encuentra el de García y cols⁽³⁶⁾ 2009, con ellos se coincidió al determinar una mayor área vascular en la región proximal. Choi⁽⁵⁰⁾ en el año 2000 hizo también una descripción histológica de los cambios vasculares en el callo de distracción en ratas, y muestra su evolución. Así, observa vasos que crecen desde el periostio a partir de la primera semana, y desde la medular a las dos semanas, interconectándose los periósticos a las 3 semanas, momento en el que el gap continuaba siendo avascular, y formando una red completa con los medulares a los 42 días.

La respuesta vascular a la distracción, no solo en el callo, sino en el miembro completo y los elementos musculotendinosos^(52, 125, 130-132) implicados en el proceso, así como la influencia de la carga^(42, 133) o el ritmo de distracción^(106, 117, 119), han sido estudiadas en múltiples trabajos y mediante múltiples técnicas. Cabe destacar como precursor el de Aronson y cols⁽¹²⁵⁾ en 1994, quienes midieron los cambios en la vascularización durante la osteogénesis por distracción en perros mediante gammagrafía con Tecnecio-99 (Tc-99). Para ello, los dividieron en tres grupos en función de lo que se prolongase el periodo de distracción, aumentando en uno de ellos además el ritmo de distracción al doble. En todos los casos el flujo aumentó hasta alrededor de 9 veces en el miembro intervenido respecto al contralateral, y al igual que en el presente estudio, fue más alto en la región proximal respecto a la distal (medida alrededor de 1,6 veces). El flujo aumentado se mantuvo hasta 4 meses, decayendo a la semana o a las 4 semanas en

función del ritmo de distracción (1mm/día vs 2 mm/día) y determinaron que la respuesta vascular presentaba los mismos patrones temporales y espaciales a las fracturas, solo que de mayor amplitud. Siguiendo este trabajo, Gil-Albarova y cols⁽¹³²⁾ en 1997 midieron la respuesta tisular a la distracción en nervios, músculos y vasos en un modelo animal ovino. Determinaron mayores niveles de vascularización en el miembro intervenido respecto al contralateral al mes de la distracción. Al comparar dichas observaciones con los contajes realizados de la expresión del Anti-factor VIII presentados, se podría determinar que son coincidentes, pues con un ritmo de distracción estándar (1 mm/día) los mayores niveles se midieron entre los 30 y 50 días. Posteriormente De Coster y cols⁽¹¹⁶⁾ en 1999 determinaron mediante angiografía que el flujo vascular al hueso aumentaba durante la fase de transporte en un modelo de transporte óseo en ovejas. Shevtsov y cols^(52, 130, 131) realizaron hasta tres estudios diferentes (1995-2002) en perros sobre los cambios en la vascularización en los elementos musculotendinosos implicados en la elongación mediante técnica Ilizarov. Para ello usaron reovasografía, angiografía, esfigmografía y estudios histológicos. Determinaron que durante el primer mes de distracción se origina una extensa red vascular especializada en procesos de crecimiento, con mayor capilaridad cuanto más se fracciona la distracción. Hacia el final del segundo mes de distracción, los procesos metabólicos iban encaminados a mejorar la función de estos microvasos. Esto confirmó los resultados de trabajos como el Rowe y cols⁽¹³⁴⁾ (la vascularización aumenta durante la distracción y disminuye durante la consolidación). Moore y cols⁽¹³³⁾ en 2003 estudiaron por microangiografía en ratas la influencia de la carga en la vascularización, determinando que independientemente de la carga, aumentan el volumen y el tejido vascular, aunque en mayor cuantía en el grupo al que se permite cargar.

En vistas a todo lo anterior, se concluye que aunque la vascularización del callo en la osteogénesis por distracción ha sido ampliamente estudiada, han sido pocos los autores que han realizado estudios no descriptivos, aunque a pesar de usar diferentes técnicas, todos coinciden en un modelo de flujo aumentado y creación de una red vascular centrípeta siguiendo a la osificación. Si a esto se suma la práctica ausencia de este tipo de estudios sobre el callo originado durante el transporte óseo, se hace necesaria la realización de trabajos como el presente para esclarecer el papel de la vascularización en el desarrollo de la osificación de dicho callo.

2. *Docking Site*

2.1 Estudio histomorfométrico

Contajes tisulares

Durante años se ha hablado de la existencia de un cúmulo de tejido conectivo fibroso que rellena la cavidad entre el segmento transportado y la zona receptora^(97, 99, 101-103). El origen de este “capuchón” podría estar en la transformación hacia tejido fibroso del hematoma inicialmente organizado entre ambos segmentos óseos, y que se genera durante la fase de latencia y es comprimido durante la fase de transporte⁽⁹⁷⁾. Dicho tejido fibroso puede llegar a sellar el canal medular, favoreciendo la aparición de problemas relacionados con la falta de consolidación del *Docking*. A pesar de ser este retardo e incluso a veces ausencia de consolidación una de las principales complicaciones ligadas a los transportes óseos, muy pocos han sido los autores que han estudiado con técnicas histomorfométricas dicha zona⁽³⁶⁾.

Al igual que en el caso del callo de transporte, se cuantificaron las cantidades de tejido fibroso y tejido óseo trabecular neoforado en el *Docking Site*. Se identificaron niveles muy altos de tejido fibroso en casi todos los animales, detectándose a los aumentos empleados (10X) una ausencia completa de tejido óseo trabecular hacia los 98 días (Fig. 69). En ese momento los niveles de tejido fibroso comenzaron a decrecer. El único estudio publicado que realiza técnicas histomorfométricas sobre el *Docking Site* es el de García y cols⁽³⁶⁾ en 2009. Éstos obtuvieron cantidades de tejido óseo en el *Docking* a las 3 semanas de alrededor del 14% y de hasta el 71% a las 12 semanas (cuando concluye el estudio), determinando consolidación completa del mismo en todos los animales. Si bien es cierto que en el presente trabajo, en la representación gráfica los niveles más altos de tejido óseo trabecular correspondieron al animal de 161 días, se deduce que dichos niveles siguieron aumentando, remodelando a tejido cortical durante el espacio de tiempo entre los 161 y los 525 días, motivo por el cual aparece ausente en el animal de mayor evolución. Por lo anterior podría interpretarse que la consolidación fue más rápida en el grupo de estudio de García respecto al que aquí se expone. Sin embargo, habría que tener en cuenta las diferencias en el sistema de fijación empleado (dispositivo no empleado en humanos) y la realización de una segunda cirugía una vez

concluido el transporte durante la cual se retiraba el sistema de distracción y se aplicaba compresión al *Docking* al tiempo que se fijaba el segmento móvil.

Otros autores como Nagashima y cols⁽¹⁰¹⁾, quienes estudiaron la histología del callo y el *Docking* tras realizar un transporte óseo mandibular en perros, obtuvieron tasas de no consolidación de alrededor del 50% al final de su estudio. Estas altas tasas fueron atribuidas a la existencia del ya conocido gap fibroso^(28, 97-99, 102, 103) que se desarrolla durante la fase de latencia y transporte, y queda finalmente interpuesto en la zona del *Docking*.

El papel de dicho capuchón fibrocartilaginoso continúa siendo controvertido, así como las medidas a tomar sobre el mismo con la finalidad de favorecer la consolidación. Así, mientras Ilizarov⁽¹³⁵⁾ hablaba de que la simple compresión por la carga sobre la extremidad genera el estímulo necesario para que se osifique, otros propugnaban la necesidad de una cirugía de desbridamiento de dicho tejido y aporte o no de injerto^(98, 103) para generar un ambiente más parecido al de consolidación de las fracturas y que la curación fuera más predecible. En vistas a esto, se publicaron trabajos como el de Lovisetti y cols^(98, 99), comparando los resultados de las técnicas de compresión aislada sobre el *Docking* con técnicas de desbridamiento (abierto y endoscópico) más aporte de injerto y compresión. No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a tiempos de fijación, porcentajes de consolidación o complicaciones, por lo que no se puede afirmar que el desbridamiento del gap fibroso suponga una ventaja sobre el hecho de no someter a los pacientes a un doble procedimiento. Tampoco se encontraron diferencias al comparar las técnicas abiertas de desbridamiento con las endoscópica⁽¹⁰³⁾.

En el presente trabajo se optó por no comprimir más allá del final de la fase de transporte para evitar complicaciones que pudieran derivarse de una compresión excesiva, como alteraciones en la vascularización o mala alineación de los segmentos. Esta pudo ser la causa del retardo de consolidación asociado (ausencia de una consolidación estable más allá de 6 meses)⁽²⁸⁾ lo que retrasó además la retirada del fijador. Periodos de fijación muy prolongados ya fueron reportados por Paley y cols^(28, 136) e Ilizarov⁽¹³⁵⁾, lo que hace la tolerancia al distractor un factor más a tener en cuenta a la hora de realizar este tipo de técnicas.

Tipos de Osificación

Aunque inicialmente se pensaba que *Docking Site* seguía un modelo de osificación similar a los focos de fractura, la separación de los extremos de los segmentos óseos y el periodo de tiempo que tardan en contactar provocaría la ausencia de la respuesta inflamatoria y la subsecuente cascada de reparación presente en todo proceso fractuario normal⁽⁹⁷⁾. Así, mientras la osificación del callo de fractura responde a un modelo de osificación endocondral, cabría la posibilidad de pensar que no tiene porqué seguir tal patrón en el caso del *Docking Site*. Por dicho motivo, se determinó que la caracterización de dicho modelo de osificación podría ayudar a esclarecer cuáles son las técnicas más apropiadas para favorecer su consolidación.

El estudio de los tipos de osificación mostró el *Docking Site* ocupado en su práctica totalidad por tejido conectivo fibroso en los animales de 79 y 98 días. El resto mostraron focos de osificación intramembranosa, que se iniciaban a nivel subperióstico y a partir de los 35 días aparecieron a nivel endóstico. Sólo se detectaron focos de osificación endocondral en la periferia de los extremos osteotomizados de los animales de 22 y 50 días, pudiendo determinar en líneas generales que la osificación es predominantemente intramembranosa. Este hallazgo va en contra de los resultados del estudio de García y cols, quienes también hablaban de un patrón de tipo mixto respecto a la osificación de esta región, pero con predominio de la osificación endocondral, no difiriendo de la osificación normal del foco de fractura, con salvedad de la temporalidad (más lenta en el caso del transporte). Justificaron tal hallazgo como consecuencia de que los defectos creados en los sujetos a estudio no se corresponden con los generados habitualmente en los pacientes sometidos a transportes óseos, quienes generalmente presentan daños o complicaciones asociadas al defecto óseo al ser consecuencia de traumatismos de alta energía.

Retardos en la consolidación como los detectados en los animales del presente estudio ya han sido previamente reportados tanto en humanos como en animales^(28, 96, 100, 136-139). Naggar y cols⁽¹³⁹⁾ en 1993 presentaron una serie de resultados en pacientes en los que emplearon el transporte óseo, con un 53% de complicaciones asociadas a problemas de consolidación del *Docking*. Sin embargo Cierny y cols⁽¹³⁷⁾ en 1994 compararon los resultados en el tratamiento de los defectos óseos tibiales entre el

empleo de transportes óseos con un sistema Ilizarov y el aporte masivo de injerto, encontrando solo dos casos de pseudoartrosis del *Docking* entre 21 pacientes, aunque sus tasas de retardo de consolidación fueron mayores que las de autores como Green y cols⁽¹³⁸⁾. Estos últimos compararon también los resultados del transporte óseo frente al tradicional Papineau para el manejo de defectos óseos tibiales similares al anterior, reportando problemas relacionados con la consolidación de dicha zona en el 41% de los pacientes. Más tarde, Paley y cols⁽¹³⁶⁾ en el 2000 publicaron una serie de los resultados y complicaciones asociadas al tratamiento de los defectos tibiales mediante técnica de transporte siguiendo el sistema Ilizarov, consiguiendo la consolidación en todos los casos, y requiriendo la reintervención en un paciente que presentó una refractura del *Docking*. En el caso de la serie de 19 pacientes sometidos a transporte reportada por Mekhail y cols⁽¹⁰⁰⁾ en 2004, todos tuvieron problemas con la consolidación del *Docking*. En un caso nunca consolidó, y los otros 18 lo hicieron tras una cirugía adicional de desbridamiento y aporte de injerto. En el caso de estudios con animales, De Coster y cols⁽¹¹⁶⁾ hablaron de retardos de consolidación en todos los animales (conejos) incluidos en su estudio.

Muchos de estos autores emplean técnicas de refrescamiento del *Docking Site* para favorecer su consolidación, a pesar de que las series publicadas no muestran diferencias en los resultados entre las técnicas abiertas y las cerradas (como se ha explicado en el apartado previo). Esto podría explicarse por el alto nivel de exigencia en el tratamiento de estos pacientes, quienes en la mayoría de veces se han intervenido en varias ocasiones para conseguir un miembro viable y lo más funcional posible, lo que incentivaría al cirujano a agotar todas las opciones posibles para el éxito. Sin embargo, y a pesar de todo, otra de las mayores desventajas del empleo del transporte óseo es la tolerancia al fijador, el cual puede llegar a requerir fijaciones de más de un año.

Según Paley y cols⁽¹³⁶⁾, el resultado de la diferencia entre el Índice de Fijación Externa (EFI: meses de fijador por centímetro transportado) y el Índice de Consolidación Radiológica (RCI: meses hasta la consolidación radiológica por centímetro) es el tiempo adicional requerido por el *Docking Site* para consolidar. Éste sería el paso limitante para el éxito de las técnicas de transporte óseo, que en el caso de su serie está en los 0,3 meses. En el presente trabajo sólo se retiró el distractor previo al sacrificio al animal de 525 días (192 días de fijación externa), por lo que no se pudieron

establecer índices comparables con los publicados. Sin embargo, se coincide en afirmar la presencia de retardos de consolidación con todos aquellos autores que han empleado la técnica Ilizarov.

Las diferencias obtenidas en la distribución de las cantidades de los dos tipos de osificación detectadas en el *Docking* respecto al trabajo de García y cols⁽³⁶⁾, así como el tiempo de consolidación mucho menor en el caso de este último, podría por tanto explicarse por las diferencias en el sistema de transporte empleado. La mayor rigidez del sistema Ilizarov y el empleo de técnicas cerradas para favorecer la consolidación frente al empleo de un sistema de transporte sobre placa, más el desbridamiento y compresión “*de visu*” empleados en el caso del trabajo de García y cols⁽³⁶⁾, explicaría la mayor cantidad de tejido cartilaginoso presente en el análisis histomorfométrico de dichos autores.

Por lo tanto, y a pesar de los pocos estudios disponibles para comparar, se podría concluir que el proceso de osificación del *Docking Site* difiere en función el tipo de fijación empleada, tal como sucede en el caso del callo de transporte.

2.2 Estudios inmunohistoquímicos

Colágenos I y II

El empleo de las técnicas inmunohistoquímicas sobre el *Docking Site* permitió especificar mejor el patrón de osificación presente en el mismo. El animal de 98 días no presentó más que tejido fibroso, así como el gap central. Se detectaron focos de colágeno tipo I (en relación con osificación intramembranosa) en todos los demás animales, todos ellos en la región periférica en relación con el periostio. Las ovejas de 35, 22 y 50 días fueron las únicas que mostraron zonas captantes para colágeno tipo II (Fig. 71B). Dichas zonas aparecieron en la periferia de la región de las osteotomías del hueso compacto, y por lo tanto no corresponderían al *Docking Site*.

La distribución de las áreas de osificación coincidió con los datos obtenidos en los estudios histomorfométricos, salvo por la detección de tejido cartilaginoso en la oveja de 35 días, que no se reportó en dicho apartado. Al igual que ocurría con el callo de

transporte, al ser las técnicas inmunohistoquímicas más sensibles permitieron delimitar mejor las áreas de cada uno de los tipos de osificación.

Una vez revisada a tal efecto la bibliografía publicada, el presente sería el único trabajo hasta la fecha que emplea las técnicas inmunohistoquímicas para el estudio del *Docking Site*. Las distintas publicaciones existentes suelen estudiar el *Docking Site* como complemento al callo. De esta forma, los trabajos más centrados en el mismo se basan en determinar cuáles son las diferencias entre las distintas técnicas que se podrían emplear para mejorar su consolidación.

En vistas a estos resultados se determina que la osificación del *Docking Site* es fundamentalmente intramembranosa. La realización de nuevos trabajos al respecto podría ayudar a determinar las causas que provocan la aparición de los focos de osificación endocondral.

Anti-factor VIII

La cuantificación de los endotelios vasculares neoformados mediante esta técnica determinó las cifras más altas en el animal estudiado durante la fase de transporte respecto al resto de animales del estudio. Estos niveles se mantuvieron relativamente altos, con leves declives hasta los 50 días, momento en el que muestra una caída más importante (Fig. 73).

Son muy pocos los estudios dedicados en exclusiva a la vascularización tras transporte óseo⁽¹¹⁶⁾. La mayoría de estudios publicados son referentes a la vascularización en distracción ósea^(52, 125, 130-132) hablando de un incremento global en el aporte y la red vascular en el miembro intervenido respecto al contralateral. Ilizarov^(20, 21) en sus trabajos determinó la importancia de un correcto aporte vascular como mandatorio para conseguir el éxito en los procesos de transporte, tanto por la consolidación del callo como del *Docking Site*.

Los mayores contajes endoteliales iniciales podrían aparecer como respuesta a la isquemia inducida por la compresión paulatina del gap fibroso interpuesto. Esto sumado al incremento del aporte vascular ya estudiado, y que en el caso del callo era mayor durante el primer mes, podría explicar la respuesta vascular inicial.

3. Limitaciones

Las limitaciones del presente estudio son aquellas ligadas a la realización de estudios experimentales. La imposibilidad de llevar a cabo el proceso experimental en personas se ha intentado solventar utilizando animales cuya talla, peso y características morfológicas fueran lo más cercanas posibles a las humanas, consiguiendo asemejarse de esta manera lo máximo posible a la distribución de fuerzas, cargas y demás elementos que pudieran influenciar sobre el miembro intervenido.

Una de las principales limitaciones sería el pequeño tamaño de la muestra sometida a estudio. Al estar formado únicamente por un animal asignado a cada momento de proceso, podría generarse un sesgo de selección debido a la variabilidad interindividual de los sujetos incluidos o de los entorno mecanobiológicos diferentes que pudieran presentarse en cada uno. Respecto a este punto habría que considerar las dificultades para el correcto cuidado, alimentación, así como la necesidad de instalaciones adecuadas tanto en tamaño como en medios, y los costos derivados del mantenimiento de estos animales. Para minimizar los sesgos ligados al tamaño muestral, se utilizaron animales del mismo sexo, edad y similar peso, de manera que los resultados fueran lo más homogéneos posibles.

Otro elemento a tener en cuenta serían los posibles errores a los que pudiera llevar el ritmo de distracción empleado. Es sabido que el ritmo ideal en animales de esta talla (así como en humanos) se establece en 1mm/día^(20, 21, 26, 28), distribuido en incrementos de 0,25 mm/6h, de manera que la distracción sea lo más “constante” posible. Ritmos más lentos darían lugar a osificaciones tempranas y de más de 1 mm la impedirían. Por razones logísticas se optó por la distracción en un solo paso. Este ritmo ha sido empleado en múltiples trabajos^(22, 30, 35) con éxito, por lo que creemos que los resultados siguen siendo científicamente válidos y clínicamente relevantes.

Hay que considerar que los pacientes sometidos a transporte óseo generalmente asocian otro tipo de lesiones de partes blandas. Además, las pérdidas óseas que presentan suelen ir ligadas a traumatismos de alta energía o a procesos concomitantes (infecciosos o tumorales) que hacen que el punto de partida no sea un ambiente biológico normal. Por ello, aunque el defecto creado en los animales del presente trabajo no sea tan complejo inicialmente, como el que pueda darse en este tipo de

pacientes, la fase experimental se ha realizado bajo condiciones clínicas y fisiológicas ideales y similares a las que se dan en la práctica clínica, para que los resultados histológicos fueran lo más cercanos posible a los obtenidos en humanos.

Desde el punto de vista histológico cabría destacar los distintos tiempos de inclusión en solución decalcificante empleados para cada muestra. Dichos tiempos fueron mayores en las piezas con mayor grado de osificación, llegando a variar desde unas horas en los animales de menor tiempo de evolución tras la cirugía, a más de una semana en el animal de 525 días. Así, la inclusión prolongada en decalcificante provocaría que las imágenes histopatológicas fueran de peor calidad y dificultando además la estandarización de las diluciones con anticuerpos para la inmunohistoquímica. Para minimizar los posibles errores derivados de una tinción de mala calidad o los artefactos por no conseguir cortes homogéneos, se ajustaron los tiempos de decalcificación a cada pieza, alcanzando el nivel justo que permitiera cortar bloques que incluyeran el callo de transporte y el *Docking Site* completos junto con el hueso adyacente (el cual tenía diferente consistencia al estudiado). Para limitar la posible sobretinción con las técnicas inmunohistoquímicas (tinción de zonas no osificadas) se ajustaron las diluciones de los anticuerpos empleados a cada animal hasta obtener unas imágenes óptimas y libres de fondo teñido. Además, la cuantificación de dichas áreas con el software informático empleado minimizó los errores en las valoraciones, haciéndolas lo más objetivas posibles.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La osificación del callo obtenido mediante transporte óseo con mantenimiento de la actividad motriz es de tipo mixto siendo la osificación intramembranosa la predominante tanto temporal como espacialmente. Además, también presenta un patrón de osificación mixto en lo referente al origen endóstico-perióstico de las trabéculas óseas.

La ocupación vascular en el callo de transporte óseo varía a lo largo del tiempo cuando se permite la actividad motriz

La osificación del *Docking Site* es puramente intramembranosa y más lenta que la del callo de transporte óseo.

La vascularización del *Docking Site* es similar a la del callo de transporte. El patrón de vascularización global del *Docking Site* es similar al del callo, mostrando niveles más altos de endotelios neoformados en el primer mes tras la cirugía. El tamaño reducido del *Docking* impidió el estudio por zonas, por lo que no podemos establecer si los vasos siguen el mismo modelo centrípeto que en el callo de transporte óseo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferrández Portal L, Gómez-Castresana Bachiller F. El hueso y el cartílago de crecimiento. In: S.A. EmP, editor. Manual de Cirugía Ortopédica y Traumatología. 1. Madrid: Panamericana; 2010. p. 691.
2. Young B, Heath JW. Wheather's. Histología Funcional 4ª Edición. Harcourt, editor. Madrid: Ediciones Harcourt S.A.; 2000. 172-92 p.
3. Chavassieux P, Meunier P. Enciclopedia Médico Quirúrgica. 1. Francia: Elsevier Masson; 2008.
4. Ross M, Pawlina W. Histología. Texto y Atlas color con biología molecular y celular. Panamericana EM, editor. EEUU2006. 218-46 p.
5. Gartner LP, Hiatt JL. Texto Atlas de Histología. 2ª Edición. McGraw-Hill Companies I, editor. Méjico2002. 127-51 p.
6. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology, Twelfth Edition. In: McGraw-Hill Companies I, editor.2010.
7. Sobotta J, Welsch U. Histología. Panamericana, editor: Publicaciones médicas Panamericana; 2009.
8. Kojimoto H, Yasui N, Goto T. Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. Journal of Bone and Joint Surgery (Br). 1988(70B):543-9.

9. Zimmermann C, Thurmüller P, Troulis M, Perrot D, Rahn B, Kaban L. Histology of the porcine mandibular distraction wound. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005(34):411-9.

10. Vivar Díaz N. *Manual de procedimientos en Anatomía Patológica*. Quito (Ecuador): Roche; 2010. p. 49.

11. Mescher T. *Cell Biology and Histology A560* 2006.

12. Cantabria Ud. Remodelación ósea. 2013. In: *Materiales de Clase 1* [Internet]. OCW Universidad de Cantabria; [1-6]. Available from: ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia/materiales-de-clase-1/capitulo-13.-envejecimiento-musculo-esqueletico/13.2-remodelacion-osea.

13. Kumar V, Abbas AK, Fausto, Mitchell. Robbins. *Patología Humana 8ª Edición*: Elsevier España, S.A.; 2008.

14. Gallagher JC, Sai A. Biología molecular de la remodelación ósea: implicaciones para los nuevos blancos terapéuticos de la osteoporosis. *Rev Metab Óseo y Min.* 2010;8(2):60-72.

15. Cano-Sánchez J, Campo-Trpaero J, Sánchez-Gutiérrez J, Bascones-Martínez A. *Mecanobiología de los huesos maxilares II. Remodelación ósea. Avances en Odontoestomatología.* 2008;24(2):177-86.

16. Prieto Carrero JL. *Parámetros Histomorfométricos Óseos normales en una población infantojuvenil española.* Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1993.

17. Welsch U. *Sobotta Atlas de Histología 5ª Edición.* Libros M, editor1999. 254 p.

18. Navarro-Quilis A, Caja-López VL. Bases científicas de la consolidación de las fracturas. In: Panamericana, editor. Manual de Cirugía Ortopédica y Traumatología 2ª Edición. 1. Madrid 2010. p. 130-40.
19. Bier A. Die Bedeutung des Blutergusses für die Heilung des Knochenbruchs. Heilung von Pseudarthrosen and von verspäteter Callusbildung durch Bluteinspritzungen. Med Klin. 1905(1).
20. Ilizarov G. The Tension-Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues: Part II: The Influence of the Rate and Frequency of Distraction. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1989(239):263-85.
21. Ilizarov G. The Tension-Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues: Part I: The Influence of Stability of Fixation and Soft-Tissue Preservation. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1989(238):249-81.
22. Krawczyk A, Kuryszko J, Wall A, Dragan S, Kulej M. Experimental studies on the effect of osteotomy technique on the bone regeneration in distraction osteogenesis. Bone. 2007(40):11.
23. Fischgrund J, Paley D, Suter C. Variables affecting time to bone healing during limb lengthening. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1994(301):31-6.
24. Flores-Espinosa JA, Romero-Flores J. Distracción Osteogénica Bifocal como alternativa para reconstrucción mandibular. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2011;49(6):659-64.
25. Sanchukov ML, Cope JB, Cherkashin AM. Biologic Basis of New Bone Formation Under the Influence of Tension Stress. In: Rudolph P, editor. Craniofacial Distraction Osteogenesis. United States: Mosby; 2001. p. 21-36.

26. Jordan CJ, Goldstein RY, McLaurin TM, Grant A. The Evolution of the Ilizarov Technique. Part 1: The History of Limb Lengthening. *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases*. 2013;71(1):89-95.
27. Klapp. Precursors of the Ilizarov technique. *Injury*. 1993(24 (Suppl 2)):25-8.
28. Paley D, Catgni M, Argnani F, Villa A, Bendetti GB, Cattaneo R. Ilizarov treatment of tibial nonunions with bone loss. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1989(241):146-64.
29. Cañadell J, Forriol F. Elongación ósea: aspectos clínicos y experimentales. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*. 2003;47(4):283-94.
30. De Pablos J, Canadell J. Experimental Physal Distraction in Immature Sheep. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1990(250):73-80.
31. De Pablos J, Villas C, Canadell J. Bone lengthening by physial distraction. An experimental study. *International Orthopaedics*. 1986(10):163-6.
32. Ohyama M, Miyasaka Y, Sakuai M. The mechanical behavior and morphological structure of callus in experimental callostasis. *Bio-Medical and Engineering*. 1994;4(4):273-81.
33. Reina Romo E, Gómez Benito J, García Aznar J, Domínguez J, Doblaré M. Modeling distraction osteogenesis: analysis of the distraction rate. *Biomech Model Mechanobiol*. 2009(8):323-35.
34. Fink B, Pollnau C, Vogel M, Skripitz R, Enderle A. Histomorphometry of Distraction Osteogenesis During Experimental Tibial Lengthening. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2003;17(2):113-8.

35. Forriol F, Denaro L, Longo U, Taira H, Maffulli N, Denaro V. Bone Lengthening osteogenesis, a combination of intramembranous and endochondral ossification: an experimental study in sheep. *Strat Traum Limb Recon*. 2010(5):71-8.
36. García F, Picado C, Garcia S. Histology of the regenerate and docking site in bone transport. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009(129):549-58.
37. Kallio T, Vauhkonen M, Peltonene J, Karaharju E. Early bone matrix formation during distraction. A biochemical study in sheep. *Acta Orthopédica Scandinava*. 1994;65(4):467-71.
38. Cai G, Saleh M, Coulton L, Yang L. Distraction- resisting force during tibial diaphyseal lengthening and consolidation- a study on a rabbit model. *Clinical Biomechanics*. 2004(19):733-4.
39. Leung K, Cheung W, Yeung H, Lee K, Fung K. Effect of Weightbearing on Bone Formation During Distraction Osteogenesis. *Clinical Orthopedics*. 2004(419):251-7.
40. Pacicca D, Moore D, Ehrlich M. Weight-Bearing and Consolidation of New Bone in a Rat Model of Distraction Osteogenesis. *Journal of Pediatric Orthopaedics*. 2002(22):652-9.
41. Panjabi M, White A. A biomechanical comparison of the effects of constant and cyclic compression on fracture healing in rabbit long bones. *Acta orthopaedica Scandinava*. 1979;50(6 Pt 1):653-761.
42. Radomisli T, Moore D, Barrach H, Keeping H, Ehrlich M. Weight- bearing alters the expression of collagen types I and II BMP 2/4 and osteocalcin in the early stages of distraction osteogenesis. *Jouranl of Orthopaedic Research*. 2001(19):1049-56.

43. Sarmiento A, Schaeffer J, Beckerman L. Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing. *Journal of Bone and Joint Surgery (Am)*. 1977(59):369-75.
44. Donneys A, Tchanque-Fossuo C, Farberg A, Deshpande S, Buchman S. Bone regeneration in distraction osteogenesis demonstrates significantly increased vascularity in comparison to fracture repair in the mandible. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2012;23(1):328-32.
45. Brutscher R, Rahn A, Rüter A, Perren M. The role of corticotomy and osteotomy in the treatment of bone defects using the Ilizarov technique. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 1993;7(3):261-9.
46. Frierson M, Ibrahim K, Boles M, Boté H, Ganey T. Distraction Osteogenesis. A comparison of Corticotomy Techniques. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1994(301):19-24.
47. Wanders N, Richards M, Steen H, Kuhn J, Goldstein S, Goulet J. Evaluation of the Mechanical Environment During Distraction Osteogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1998(349):225-34.
48. Yasui N, Kojimoto H, Sasaki K, Kitada A, Shimizu H, Shimomura Y. Factors affecting Callus Distraction in Limb Lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1993(293):55-60.
49. Carvalho R, Einhorn T, Lehmann W, Edgar C, Al-Yamani A, Apazidis A, et al. The role of angiogenesis in a murine tibial model of distraction osteogenesis. *Bone*. 2004(34):849-62.
50. Choi I, Ahn J, Chung C, Cho T. Vascular proliferation and blood supply during distraction osteogenesis: a scanning electron microscopic observation. *Journal of Orthopaedic Research*. 2000;18(5):698-705.

51. Claes L, Augat P, Schorlemmer S, Konrads C, Ignatius A, Ehrnthaller C. Temporary distraction and compression of diaphyseal osteotomy accelerates bone healing. *Journal of Orthopaedic Research*. 2008(26):772-7.
52. Shevtsov V, Gordievskikh N, Bunov V, Petrovskaya N. Changes in blood flow during tibial thickening by the Ilizarov Method. *Bull Exp Biol Med*. 2002 134(6):525-7.
53. Singare S, Li D, Liu Y, Wang J. The effect of latency on bone lengthening force and bone mineralization: an investigation using strain gauge mounted on internal distractor device. *Biomedical Engineering Online* [Internet]. 2006 9 March 2006; 5:[8 p.]. Available from: www.biomedical-engineering-online.com/content/5/1/18.
54. Claes L, Veeseer A, Göckelmann M, Horvath D, Dürselen L, Ignatius A. A novel method for lateral callus distraction and its importance for the mechano-biology of bone formation. *Bone*. 2010;47:712-7.
55. Claes L, Lule J, Wenger K, Suger G, Liener U, Kinzl L. The influence of stiffness of the fixator on maturation of callus after segmental transport. *Journal of Bone and Joint Surgery (Br)*. 2000(82B):142-8.
56. Reichel H, Susanne L, Alter C, Hein W. Biomechanical and densitometric bone properties after callus distraction in sheep. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1998(357):237-46.
57. Reina Romo E, Gómez Benito J, Domínguez J, Niemeyer F, Wehner T, Simon U, et al. Effect of the fixator stiffness on the young regenerate bone after bone transport: Computational approach. *Journal of Biomechanics*. 2011(44):917-23.
58. Brunner U, Cordey J, Schweiberer L, Perren S. Force required for bone segment transport in the treatment of large bone defects using medullary nail fixation. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1994(301):141-55.

59. Proyecto fin de carrera. Estudio de la morfología del cuerpo vertebral en una L4 humana con modelos de remodelación ósea interna y externa. Biblioteca de Ingeniería de la Universidad de Sevilla: Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Sevilla; 2009.
60. Lasanianos N, Kanakaris N, Giannoudis P. Current management of long bone large segmental defects. *Orthopaedics and Trauma*. 2010;24(2):149-53.
61. Lin C, Wei F, Chen H, Chuang D. Outcome comparison in traumatic lower-extremity reconstruction by using various composite vascularized bone transplantation. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1999(104):984-92.
62. Jupiter J. Complex non-union of the humeral diaphysis. Treatment with a medial approach, an anterior plate, and a vascularized fibular graft. *Journal of Bone and Joint Surgery (Am)*. 1990(72):701-7.
63. Tu Y, Chen A, Chou Y, Ueng S, Ma C. Treatment for scaphoid fracture nonunion-the application of 3.0mm cannulated screws and pedicle vascularised bone grafts. *Injury*. 2008;39(Suppl 4):96-106.
64. Wei F, El-Gammal T, Lin C, Ueng W. Free fibula osteoseptocutaneous graft for reconstruction of segmental femoral shaft defects. *The Journal of Trauma*. 1993;43(5):784-92.
65. Moran C, Wood M. Vascularized bone autografts. *Orthopaedic review*. 1993;22(2):187-97.
66. Zaretski A, Amir A, Meller I, Leshem D, Kollender Y, Barnea Y, et al. Free fibula long bone reconstruction in orthopedic oncology: a surgical algorithm for reconstructive options. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2004;113(7):1989-2000.

67. Masquelet A, Fitoussi F, Beque T, Muller G. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. *Annales de chirurgie plastique et esthétique*. 2000;45(3):346-403.
68. Pelisier P, Martín D, Baudet J, Lepreux S, Masquelet A. Behaviour of cancellous bone graft placed in induced membranes. *British Journal of Plastic Surgery*. 2002;55(7):596-8.
69. Cobos J, Lindsey R, Gugala Z. The cylindrical titanium mesh cage for treatment of a long bone segmental defect: description of a new technique and report of two cases. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2000;14(1):54-60.
70. Forero Ramírez FM, Quiñonez Poveda AM, Buitrago Villamizar MI. Acortamiento y osteogénesis por distracción para el tratamiento de pseudoartrosis infectada en fracturas de fémur y tibia. *Rev Col Or Tra*. 2011;25(2):223-331.
71. Wiedemann M. Callus Distraction: A New Method? A Historical Review of Limb Lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1996(327):291-304.
72. Brand R. Advances in limb lengthening and reconstruction: Alessandro Codivilla, MD, 1861-1912. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2008;466(12):2901-2.
73. Codivilla A. Sulla correzione della deformita de frattura del femore. *Bull Sci Med (Bologna)*. 1903;3:246-9.
74. Codivilla A. On the means of lengthening, in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Journal of Bone and Joint Surgery (Am)*. 1905;S2(2):353-9.

75. Magnuson P. Lengthening shortened bones of the leg by operation. Ivory screws with removable heads as a means of holding the two bone fragments. *Surg Gynecol Obstet.* 1913(17):63-71.
76. Ombredanne L. Allongement d'un femur sur un member trop court *Bull Mem SOC Chirur (Paris).* 1913;39:1177.
77. Paterson D. Leg-lengthening procedures. A historical review. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 1990;250:27-32.
78. Putti V. The operative lengthening of the femur. *JAMA.* 1921(77):934-43.
79. Abbot L. The operative lengthening of the tibia and fibula. *Journal of Bone and Joint Surgery (Am).* 1927(9):128-52.
80. Abbot L, Saunders J. The operative lengthening of the tibia and fibula. A preliminary report on the further development of the principles and technique. *Ann Surg.* 1939;110(6):961-91.
81. Kenwright J, White S. A historical review of limb lengthening and bone transport. *Injury.* 1993;24(Suppl 2):9-19.
82. White J. A simplified method for tibial lengthening. *Journal of Bone and Joint Surgery (Am).* 1930(12):90-6.
83. Anderson R. Femoral bone lengthening. *Am J Surg.* 1936(31):479-83.
84. Allan F. Bone Lengthening. *Journal of Bone and Joint Surgery (Br).* 1948(30):490-505.
85. Allan F. Leg-lengthening. *Br Med J.* 1951;3(1):218-22.

86. Anderson W. Lengthening of the lower limb: its place in the problem of limb length. In: W G, editor. *Modern Trends in Orthopedics* (5th ed). London: Butterworths 1962. p. 1-22.
87. Glucksman A. The role of mechanical stresses in bone formation in vitro. *J Anat.* 1942;76(Pt 3):231-9.
88. Krompecher S. Die Beeinflussbarkeit der Gewebsdifferenzierung der granulierenden Knochenoberflächen, insbesondere die der Callusbildung. *Langenbecks Arch Klin Chir.* 1956(281):472-512.
89. Wagner H. Operative Beinverlängerung. *Der Chirurg.* 1971(6):260-6.
90. Cech O. Prof. Ilizarov and his contribution to the challenge of limb lengthening. *Injury.* 1993;24(Suppl 2):S2-8.
91. Berthand P. Technique d'allongement du fémur dans les grands raccourcissements. *Rev Chir Orthop.* 1951(37):530-33.
92. De Bastiani G, Aplet G, Goldberg A. *Orthofix external fixation in trauma and orthopaedics.* Springer-Verlag, editor. London 2000.
93. Paley D. Current Techniques of Limb Lengthening. *Journal of Pediatric Orthopaedics.* 1988;8(1):73-92.
94. Paley D, Herzenberg JE. *Principles of Deformity Correction.* Springer-Verlag, editor. New York: Springer; 2002. 799 p.
95. Karaharju E, Aalto K, Kahri A, Lindberg L, Kallio T, Karaharju-Suvanto T, et al. Distraction Bone Healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 1993(297):38-43.

96. De Coster T, Geblert R, Mikola E, Pirela-Cruz M. Management of Posttraumatic Segmental Bone Defects. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2004;12:28-38.
97. Giotakis N, Narayan BN, S. Distraction osteogenesis and nonunion of the docking site: Is there an ideal treatment option? *Injury*. 2007;38(S1):S100-S7.
98. Lovisetti G, Sala F. Clinical strategies at the docking site of distraction osteogenesis: Are open procedures superior to the simple compression of Ilizarov? *Injury*. 2013;44(S1):S58-S62.
99. Lovisetti G, Sala F, Miller AN, Thabet AM, Zottola V, Capitani D. Clinical reliability of closed techniques and comparison with open strategies to achieve union at the docking site. *International Orthopaedics*. 2012;36:817-25.
100. Mekhail A, Abraham E, Gruber B, Gonzalez M. Bone Transport in the Management of Posttraumatic Bone Defects in the Lower Extremity. *Journal of Trauma*. 2004;56:368-78.
101. Nagashima L, Rondon M, Zakhary I, Nagy W, Zapata U, Dechow P, et al. Bone regeneration and docking site healing after bone transport distraction osteogenesis in the canine mandible. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 2012;70(2):429-39.
102. Robinson P, Papanna M, Younis F, Khan S. Arthroscopic debridement of docking site in Ilizarov bone transport. *Ann R Coll Surg Engl*. 2010;92:437-43.
103. Sala F, Marinoni E, Miller AN, Pesenti G, Castelli F, Alati S, et al. Evaluation of an Endoscopic Procedure for the Treatment of Docking Site Nonunion. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2013;27(10):569-75.
104. Mora-Macías J, Reina Romo E, Morgaz J, Domínguez J. In vivo gait analysis during bone transport. *Annals of Biomedical Engineering*. 2015.

105. Mora-Macias J, Reina Romo E, Morgaz J, López-Pliego M, Giráldez-Sánchez M, Domínguez J. In vivo gait analysis during bone transport. 7th World Congress of Biomechanics; Boston2014.
106. White S. The timing of distraction of an osteotomy. *Journal of Bone and Joint Surgery (Br)*. 1990;72-B(3):356-61.
107. Sabri C, Richelme F, Pierres A, Benoliel A, Bongrand P. Interest of image processing in cell biology and immunology. *Journal of Immunological Methods*. 1997;208:1-27.
108. Schneider C, Rasband W, Eliceiri K. NIH Image to Imaje J: 25 years of image analysis. *Focus on Bioimage Informatics*. 2012;9(7):671-5.
109. Vijayalakshmi GV. Affordable Image Analysus using NIH Image/ ImageJ. *Indian Journal of Cancer*. 2004;41(1):47.
110. Mora-Macías J, Reina Romo E, López-Pliego M, Giráldez-Sánchez MA, Domínguez J. In vivo mechanical characterization of the distraction callus during bone consolidation. *Annals of Biomedical Engineering*. 2015.
111. Karp NS, McCarthy JG, Scheieber JS, Sissons HA, Thorne CHM. Membranous bone lengthening: a serial histological study. *Annals of Plastic Surgery*. 1992;29(1):2-7.
112. Rachmiel A, Laufer D, Jackson IT, Lewinson D. Midface membranous bone lengthening: A one-year histological and morphological follow-up of distraction osteogenesis. *Calcified Tissue International*. 1998;62:370-6.
113. Richards M, Goulet J, Schaffler MB, Goldstein SA. Temporal and spatial characterization of regenerate bone in the lengthened rabbit tibia. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(11):1978-86.

114. Jazrawi LM, Majeska RJ, Klein ML, Kagel E. Bone and cartilage formation in an experimental model of distraction osteogenesis. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 1998;12(2):111-6.
115. Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata H, Kitamura Y, et al. Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *The Journal of Bone and Joint Surgery (Br)*. 1997;79(5):824-30.
116. De Coster TA, Simpson AHRW, Wood M, Li G, Kenwright J. Biologic model of bone transport distraction osteogenesis and vascular response. *Journal of Orthopaedic Research*. 1999;17(2):238-45.
117. Mizuta H, Nakamura E, Mizumoto Y, Kudo S, Takagi K. Effect of distraction frequency on bone formation during bone lengthening. A study in chickens. *Acta Orthopædica Scandinavica*. 2003;74(6):709-13.
118. Sencimen M, Auydintug YS, Ortakoglu K, Karslioglu Y, Gunhan O, Gunaydin Y. Histomorphometrical analysis of new bone obtained by distraction osteogenesis and osteogenesis by periosteal distraction in rabbits. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2007;36:235-42.
119. Li G, Simpson A, Kenwright J, Triffitt JT. Effect of lengthening rate on angiogenesis during distraction osteogenesis. *Journal of Orthopaedic Research*. 1999;17(3):362-7.
120. Paley D, Fleming B, Catagni M, Kristiansen T, Pope M. Mechanical evaluation of external fixators used in limb lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1990(250):50-7.
121. Xue J, Peng J, Yuan M, Wang A, Zhang L, Shuyun L, et al. NELL1 promotes high-quality bone regeneration in rat femoral distraction osteogenesis model. *Bone*. (48):485-95.

122. Aronson J, Harrison B, Stewart C, Harp J. The histology of distraction osteogenesis using different external fixators. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1998;241:106-16.
123. Le AX, Miclau T, Hu D, Helms JA. Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *Journal of Orthopaedic Research*. 2001;19:78-84.
124. Thompson Z, Miclau T, Hu D, Helms JA. A model for intramembranous ossification during fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*. 2002;20:1091-8.
125. Aronson J. Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1994(301):124-31.
126. Mora-Macías J, Reina Romo E, Dominguez J. Distraction osteogenesis device to estimate the stiffness of the callus in vivo. *Medical Engineering & Physics* 2015.
127. Fang T, Salim A, Xia W, Nacamuli R, Guccione S, Song H, et al. Angiogenesis is required for successful bone induction during distraction osteogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2005;20(7):1114-24.
128. Delloye C, Delefortrie G, Coutelier L, Vincent A. Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. An experimental study. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1990;250:34-42.
129. Vauhkonen M, Peltonen J, Karaharju E, Aalto K, Alitalo I. Collagen synthesis and mineralization in the early phase of distraction bone healing. *Bone and Mineral*. 1990;10:171-81.
130. Shevtsov V, Asonova S, Naumov A, Gordievskikh N, Kuznetsova L, Erofeev S. Comparative morphofunctional investigation of vascular pool of the muscles of the elongated extremity using different distractional regimens. *La Chirurgia degli organi di movimento*. 2000;85(1):11-22.

131. Shevtsov V, Asonova S, Yerofeyev S. Morphological characteristics of angiogenesis in the myofascial tissues of a limb elongated by the Ilizarov method. *Bulletin Hospital for Joint Diseases*. 1995;54(2):76-84.
132. Gil-Albarova J, Melgosa M, Gil-Albaroba O, Cañadell J. Soft tissue behavior during limb lengthening: an experimental study in lambs. *Journal of Pediatric Orthopaedics Part B*. 1997;6(4):266-73.
133. Moore D, Leblanc C, Müller R, Crisco J, Ehrlich M. Physiologic weight-bearing increases new vessel formation during distraction osteogenesis: a microtomographic imaging study. *Journal of Orthopaedic Research*. 2003(21):489-96.
134. Rowe N, Mehrara B, Luchs J, Dudziak M, Steinbrech D, Illei P, et al. Angiogenesis during mandibular distraction osteogenesis. *Annals of Plastic Surgery*. 1999;42(5):470-5.
135. Ilizarov G, Ledyayev V. The replacement of long tubular bone defects by lengthening distraction osteotomy of one of the fragments. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1992;280:7-10.
136. Paley D, Maar D. Ilizarov bone transport treatment for tibial defects. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2000;14(2):76-85.
137. Cierny G, Zorn K. Segmental tibial defects: comparing conventional and Ilizarov methodologies. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1994;301:118-23.
138. Green S. Skeletal defects: a comparison of bone grafting and bone transport for segmental skeletal defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1994;301:111-7.
139. Naggar L, Chevalley F, Blanc CH, Livio J-J. Treatment of large bone defects with the Ilizarov technique. *The Journal of Trauma*. 1993;34:390-3.

