

Trabajo Fin de Grado Grado en Ingeniería Aeroespacial

Estudio de la porosidad y la mineralización en el callo de Distracción Ósea

Autor: Paloma García Florencio

Tutor: Esther Reina Romo, Juan Mora Macías

Dep. Mecánica
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2017



Departamento de Teoría de
la Señal y Comunicaciones

Trabajo Fin de Grado
Grado en Ingeniería Aeroespacial

Estudio de la porosidad y la mineralización en el callo de Distracción Ósea

Autor:

Paloma García Florencio

Tutor:

Esther Reina Romo, Juan Mora Macías

Profesora Titular

Dep. Mecánica
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2017

Trabajo Fin de Grado: Estudio de la porosidad y la mineralización en el callo de Distracción Ósea

Autor: Paloma García Florencio Tutor: Esther Reina Romo, Juan Mora Macías

El tribunal nombrado para juzgar el trabajo arriba indicado, compuesto por los siguientes profesores:

Presidente:

Vocal/es:

Secretario:

acuerdan otorgarle la calificación de:

El Secretario del Tribunal

Fecha:

Resumen

La distracción ósea es un proceso quirúrgico por el cual se genera hueso nuevo mediante la separación gradual de dos fragmentos óseos y una aplicación gradual de tracción. En este proyecto se busca determinar la evolución de la porosidad y la mineralización durante el proceso de curación a través del procesamiento de imágenes.

Existen dos casos distintos de estudio: la evolución de la porosidad y la evolución de la mineralización. Dentro del caso de la evolución de la porosidad se han analizado tres subcasos: el primero incluirá el tejido blando como poro, el segundo no incluirá el hueco del tejido blando como poro y el tercero corresponderá al *docking site*.

Para determinar la validez de los resultados, se han comparado con resultados existentes de estudios previos. Se llega a la conclusión de que la porosidad disminuye durante el proceso de curación, así como una correlación negativa existente con la rigidez del callo de distracción. El contenido mineral del hueso inmaduro tiene una evolución inversamente proporcional a la de la porosidad pero no es función de la porosidad.

Abstract

Distractio osteogenesis is a surgical process by which new bone is generated through the gradual separation of two bone fragments and a gradual traction application. Porosity and mineral content evolution during the healing process are searched in this project by image processing.

There are two different cases: porosity evolution and mineral content evolution. Within porosity evolution, three subcases had been studied: in the first one, it is included soft tissue as a pore, in the second one, soft tissue is not included as a pore and the third one is the docking site study.

To establish the validity of the results, datas of previous studies were compared with this project results. To conclude, the porosity of the woven bone diminishes during the healing process and that it is negatively correlated to its stiffness. In addition, the mineral content of the woven bone is inversely proportional to the porosity, but it is not a function of the porosity.

Índice

<i>Resumen</i>	I
<i>Abstract</i>	III
1 Introducción	1
1.1 Estado del arte y motivación	2
1.2 Objetivos	3
2 Antecedentes Biológicos de la Distracción Ósea	5
2.1 Fisiología del tejido conectivo	5
2.1.1 Tejido óseo	5
2.1.1.1 Estructura del hueso	6
2.1.1.2 Tipos de células óseas	7
2.1.1.3 Tipos de osificación	8
2.1.1.4 Composición del tejido óseo	10
2.1.1.5 Mineralización del tejido óseo	10
2.1.2 Tejidos blandos	10
2.2 Base biológica de la formación de hueso durante la distracción osteogénica	11
2.2.1 Fases de la distracción osteogénica	11
2.3 Base mecánica de la formación de hueso durante la distracción osteogénica	12
2.3.1 Historia del alargamiento de miembros	12
2.4 Aplicaciones clínicas	13
3 Métodos	15
3.1 Experimento previo	15
3.2 Evolución de la porosidad en el callo de distracción ósea y en el <i>docking</i>	17
3.2.1 Análisis de las micrografías y delimitación de la zona de estudio	17
3.2.2 Creación e implementación del programa de cálculo de porosidad en el callo de distracción ósea	20
3.3 Evolución de la mineralización en el callo de distracción ósea	25
3.3.1 Análisis de las radiografías y delimitación de las zonas de estudio	25
3.3.2 Creación e implementación del programa de cálculo de mineralización en el callo de distracción ósea	27
4 Resultados	31
4.1 Resultados del estudio de las micrografías	31
4.1.1 Porcentaje de porosidad en el callo de distracción ósea	31
4.1.2 Porcentaje de porosidad en el <i>docking</i>	33
4.1.3 Tamaño de poro en una zona determinada de las micrografías	34
4.2 Resultados del estudio de las radiografías	34
5 Discusión	37
5.1 Análisis de los resultados	37
5.1.1 Análisis de los resultados de las micrografías	37

5.1.2	Análisis de los resultados de las radiografías	42
5.2	Conclusiones	45
5.3	Limitaciones del proyecto	46
5.4	Líneas de trabajo futuras	46
6	Referencias	47
	<i>Índice de Figuras</i>	53
	<i>Índice de Tablas</i>	55

1 Introducción

La distracción osteogénica es una técnica quirúrgica para la reconstrucción de deformidades óseas, utilizada en cirugía ortopédica, oral y maxilofacial (Baur et al. 2016). Permite generar hueso nuevo mediante la separación gradual de dos segmentos óseos quirúrgicamente osteotomizados. Aunque la idea del alargamiento gradual de huesos no es nueva, ha ido ganando fama debido a diversos éxitos obtenidos.

Este método es ampliamente utilizado, incluyendo entre sus aplicaciones clínicas, en huesos largos, el transporte óseo para el tratamiento de no-uniones en fracturas así como la elongación de extremidades. El transporte óseo, en concreto, permite la segmentación de defectos en huesos largos, que son resultado de traumatismos, tumores o infecciones, para ser tratados. Esta técnica presenta dos zonas donde se desarrolla hueso nuevo: el callo de distracción y el *docking site*. El tejido nuevo se extiende a la zona donde no existe hueso, formándose rápidamente y sin una organización clara, caracterizado por tener una rigidez variable que aumenta con el tiempo. A medida que se va generando el hueso nuevo, la composición y las propiedades mecánicas van cambiando (Mora-Macías et al. 2017).

La técnica no ha sido estudiada por completo. Esto provoca que no existan unos protocolos de actuación preestablecidos y que sea necesario un conocimiento exacto y una técnica meticulosa para diseñar la operación por parte del cirujano. A pesar de ello, estas operaciones son cada vez más comunes, llegando a hacerse por estética.

Los riesgos más comunes que incluye este tipo de operación son: infecciones (en torno al 5%), crecimiento del hueso en una dirección no deseada (entre el 7% y el 9%), errores al seguir el protocolo de distracción (un 4.5% del total), dolor debido a la distracción una vez finalizado el procedimiento (aproximadamente un 1%), entre otros (Seaward et al. 2013).

Existe, por tanto, una necesidad de estudio del proceso durante toda su duración, no solamente durante la cirugía inicial y, en consecuencia, es importante estudiar la dependencia de las propiedades mecánicas del hueso inmaduro microestructuralmente y especialmente de la porosidad y el contenido mineral. Los análisis del proceso podrían permitir generar un protocolo definitivo de la operación así como simplificar el trabajo previo a la operación y seguimiento de la misma. El conocimiento de la evolución de las distintas propiedades mecánicas con respecto a la generación de hueso nuevo puede aportar información sobre el procedimiento que permita mejorarlo. Una vez obtenidas las distintas relaciones necesarias, las simulaciones serían mucho más precisas, sin necesidad de métodos invasivos.

En este proyecto se llevará a cabo un estudio sobre la evolución de la porosidad y mineralización en el callo óseo y en el *docking* durante la distracción osteogénica mediante un procesamiento de imágenes. El estudio se realizará sobre micrografías y radiografías obtenidas de 11 ovejas merinas sobre las que existe un experimento previo *in vivo* (Mora-Macías et al., 2015).

La disciplina científica que envuelve este trabajo es la biomecánica. La biomecánica se centra en el estudio de la estructura y funciones de los sistemas biológicos de humanos, animales, plantas, órganos, hongos y células mediante métodos mecánicos (Hatze et al. 1974). Está estrechamente relacionada con la ingeniería

aplicada en la medicina, utilizando así mismo conocimientos de diversas áreas como son: mecánica, anatomía, fisiología... Los resultados son obtenidos mediante métodos experimentales o modelos matemáticos. Un ejemplo de estos estudios es, por tanto, el análisis del callo óseo y el *docking* durante la distracción ósea.

1.1 Estado del arte y motivación

Las propiedades mecánicas macroscópicas del callo de distracción han sido estudiadas ampliamente, tanto *ex vivo* (Ohyama et al., 1994; Floerkemeier et al., 2010) donde se medían valores de la rigidez en el callo en distintos puntos temporales del proceso, *in vivo* (Mora-Macías et al. 2015 a,b,c; Aarnes et al., 2005; Dwyer et al., 1996) como *in silico* (Shefelbine et al., 2005). Se han medido *in vivo* fuerzas (Brunner et al., 1994; Hyodo et al., 1996; Mora-Macías et al., 2015 a,b,c), y desplazamientos (Claes et al., 2002). Se han realizado estudios histológicos y de radiografías para evaluar los tipos de tejido del callo, los modos de osificación y otros parámetros (Iizarov, 1989 a,b; Aronson, 1994; Aronson et al. 1989; Aronson et al., 1997; Forriol et al., 2010; Kojimoto et al., 1988; Okazaki et al, 1999; de Pablos et al., 1990).

Así mismo, se ha estudiado extensamente las propiedades macroscópicas y microscópicas del hueso cortical, tanto *ex vivo* como *in vivo*. Entre otros estudios, se ha comprobado una relación entre las propiedades mecánicas y la porosidad del hueso cortical (Currey, 1988; Martin et al., 1989; Martin et al., 1993; McCalden et al. 1993; Schaffler and Burr, 1988; Wachter et al. 2002; Granke et al. 2011). Se ha comprobado una relación inversa entre la porosidad y la rigidez, dureza, elasticidad y la capacidad de absorción de energía de impacto del hueso cortical (Augat & Claes, 1996; Currey, 1979, 1988, 2004); Schaffer & Burr 1988). Según estudios anteriores, el módulo elástico tiene una relación con la porosidad tal que una variación en porosidad del 10 al 15 % equivale a un 46 % de reducción del módulo del hueso cortical.

En un estudio reciente (Currey et al. 2013), se han clasificado cinco niveles de porosidad en los huesos compactos, ordenados de mayor a menor tamaño:

- Cavidad medular.
- Canales para nutrientes que atraviesan la corteza (proveen de sangre a la cavidad medular).
- Porosidad vascular dentro de la corteza.
- Porosidad lacuno-canalicular.
- Nanoporosidad; a nivel de colágeno y cristales de hidroxiapatita.

Aunque es de ayuda considerar como un único sistema el caso de la porosidad lacuno-canalicular, es usual considerarlas por separado porque, aunque es probable que actúen al mismo tiempo en la creación de hueso nuevo, afectan de manera distinta en las propiedades mecánicas. Si se elimina la cavidad central de la médula, la porosidad no supera el 10 % como máximo. Hay diferentes estudios sobre varias de estas porosidades, variando la porosidad vascular entre el 0.7 % (Voide et al., 2011) y el 12.2 % (Cooper et al., 2004), la porosidad Lacunar-canalicular entre el 3.5 % y el 5 % (Cowin, 1999), y, si consideramos por separado la porosidad lacunar y la canalicular, la porosidad lacunar varía entre 1.15 % y 1.9 % (Shipov et al., 2013) y la porosidad canalicular entre el 1.42 % (Frost, 1960) y aproximadamente el 5 % (Ebacher et al., 2012).

Otros artículos dividen la porosidad del hueso cortical en:

- Porosidad Haversiana
- Porosidad de Volkmann
- Porosidad Plexiforme o de los canales vasculares.

Donde la porosidad Haversiana sería del $1.42\% \pm 1.4\%$, la porosidad de Volkmann del $2.37\% \pm 2\%$ y la porosidad plexiforme del $5.06\% \pm 4.7\%$, siendo por tanto la porosidad total del $8.81\% \pm 2\%$ (Martin & Ishida, 1989).

Por tanto, en base a los estudios preexistentes, se puede aproximar la porosidad total del hueso cortical del 5 al 10%. Estudios realizados sobre el hueso trabecular apuntan a una porosidad entre el 70-95% (Schaffler & Burr, 1988; Renders et al. 2007; Hodgkinson et al., 1996). No existe una correlación significativa entre la porosidad del hueso cortical y la porosidad del hueso trabecular (Renders et al., 2007).

También existen estudios sobre el contenido mineral tanto en el hueso cortical como en el hueso trabecular (Gong et al., 1964; Currey, 1988, 2002; Götzen et al., 2003; Renders et al., 2007; Manjubala et al., 2009; Leong & Morgan, 2009). El contenido mineral del hueso trabecular, estudiado en animales vertebrados, era de aproximadamente un 95% del contenido mineral del hueso cortical (Gong et al. 1964; Currey, 1988). Currey (1988) calculó la cantidad de calcio en el hueso una vez deshidratado mediante un método colorimétrico, relacionando el módulo de Young con el nivel de mineralización del hueso cortical. Götzen et al., (2003) descubrió una evolución lineal de la rigidez con la mineralización. Currey (2002) demostró que una baja cantidad de mineral en el hueso generaba que éste fuera más duro pero con un menor módulo elástico que un hueso con alto contenido mineral. Renders et al. (2007) calculó la cantidad de mineral tanto en el hueso cortical como en el hueso trabecular, encontrando que el grado de mineralización del hueso trabecular era bastante menor que el del hueso cortical durante el proceso de creación de hueso nuevo.

Sin embargo, existen menos estudios sobre propiedades microscópicas del hueso inmaduro durante la distracción osteogénica. En concreto, si se habla de la medición de la porosidad durante el proceso de distracción osteogénica, se encuentran pocas referencias. Se toma una porosidad del 80% para el hueso nuevo y del 4% para el hueso cortical en estudios *in silico* (Lacroix et al., 2002; Isaksson et al., 2007, 2008; Burke et al., 2012). Este dato es una aproximación, no siendo tomado de un experimento. Además se mantiene el valor constante durante todo el proceso de generación de hueso. Para el caso del contenido mineral en el callo de distracción, se han utilizado diversas técnicas como son: tomografías computerizadas, radiografías (Shefelbine et al., 2005, Leong & Morgan, 2009) o Imagen electrostática retrodispersa (qBEI) (Roschger et al. 1998, Manjubala et al., 2009). Esta última técnica permite la determinación del contenido en calcio a través de imágenes retrodispersadas con microscopio electrónico. Manjubala et al. (2009) relacionó el contenido mineral y el módulo de nanoindentación del hueso inmaduro durante la curación de fracturas. No existe un estudio detallado del avance de la porosidad y la mineralización en el callo de distracción ósea durante la regeneración.

Este estudio podría permitir encontrar correlaciones entre el avance de la porosidad o la mineralización y la evolución de otras propiedades ya medidas extensamente en la literatura como puede ser la rigidez del callo (Mora-Macías et al., 2015 a,b; Dwyer et al., 1996; Aarner et al. 2005; Floerkemeier et al., 2011).

1.2 Objetivos

En este apartado se desarrollarán los objetivos de este proyecto:

- Obtener, mediante procesamiento de imágenes *ex vivo*, la porosidad en el callo de distracción y del *docking site* en distintos días desde la cirugía y comprobar si existe una evolución clara de la misma con el tiempo. Así mismo, para poder validar los resultados, el proceso seguido para obtener la porosidad en el callo se realizará también en el hueso cortical sobre el que sí existen estudios previos. Este proceso se realizará sobre distintas micrografías tomadas en un experimento anterior.
- Calcular el tamaño de los poros en una sección delimitada del callo de distracción que sea idéntica para las distintas micrografías a procesar para poder observar la evolución del tamaño y cantidad de poros en el tiempo.
- Estimar a través del procesamiento de imágenes el porcentaje de mineralización del callo de distracción

en dos planos distintos mediante radiografías tomadas en un experimento anterior en el proceso de curación una vez practicada la cirugía.

- Analizar los datos obtenidos y establecer una comparativa entre los resultados y la bibliografía para determinar su validez en cada uno de los casos de estudio.
- Comparar la evolución de la porosidad y la mineralización con otros parámetros ya estudiados en la bibliografía como puede ser el módulo elástico o la rigidez.

Para mostrar el cumplimiento de los distintos objetivos del proyecto, este trabajo sigue la siguiente distribución.

En el capítulo dos se desarrolla la fisiología del tejido conectivo, haciendo más hincapié en los tejidos que están involucrados en los casos de estudio, además se detalla el proceso de distracción osteogénica, tanto de manera biológica como mecánica, así como las aplicaciones clínicas.

En el tercer capítulo se exponen los métodos utilizados para calcular la porosidad y la mineralización del callo de distracción a través del procesamiento de imágenes, partiendo de las micrografías (para el caso de la porosidad) y de las radiografías (para el caso de la mineralización).

El cuarto capítulo está reservado a la exposición de los resultados obtenidos mediante el tratamiento de imágenes.

En el quinto y último capítulo se discuten los resultados obtenidos, analizándolos y comparando, tanto entre los mismos datos obtenidos para distintas casuísticas como con datos obtenidos mediante la bibliografía para determinar la validez. También se incluyen las conclusiones, las limitaciones del proyecto y las posibles líneas de futuro a partir de este proyecto.

2 Antecedentes Biológicos de la Distracción Ósea

La distracción ósea es un proceso biológico mediante el cual se genera tejido óseo nuevo entre los segmentos de hueso que son separados, de forma gradual, por la aplicación de un incremento de tracción. Debido a esta tensión, el callo se mantiene en el centro de la brecha de distracción. Este proceso comienza con la aplicación de la fuerza distractora sobre el callo y continúa mientras que los tejidos siguen siendo estirados (Samchukov et al., 2001). Además del tejido óseo, se han observado otros tipos de tejidos que se generan bajo tracción como pueden ser: mucosa, piel, tendón, cartílago, vasos sanguíneos y nervios periféricos (Ilizarov, 1989a, b; Cope et al., 1999). En consecuencia, la distracción ósea implica un proceso de formación de tejido continuo.

En este capítulo se analizará la fisiología del tejido conectivo, centrándose en el tejido óseo, debido a su gran importancia en el desarrollo de este proyecto.

2.1 Fisiología del tejido conectivo

El tejido conectivo, también llamado tejido conjuntivo, es de origen mesodérmico. Comparte origen con las células mesenquimales indiferenciadas o células madre y proporciona sostén y relleno estructural: huesos, cartílagos, tendones, ligamentos y tejido adiposo.

Dentro de la brecha de distracción aparecen distintos tipos de tejidos: tejido óseo, tejido cartilaginoso, tejido fibroso y tejido de granulación. Debido al tipo de estudio realizado en este proyecto, sólo se diferenciará entre tejido óseo y tejido blando, que incluirá el resto de tejidos mencionados con anterioridad.

2.1.1 Tejido óseo

Es el principal tejido de sostén y protección en los vertebrados. El tejido óseo es un tejido metabólicamente activo, capaz de adaptar su estructura a los estímulos mecánicos y reparar daños estructurales mediante un proceso de remodelación (Robling et al. 2006). Gracias a la propiedad del tejido de reparar daños estructurales se genera hueso nuevo en una fractura y, por tanto, en el proceso de distracción ósea.

El componente más característico de este tejido es una matriz extracelular, que se encuentra en su mayor parte mineralizada. En ella se pueden diferenciar dos partes: la porción inorgánica está formada por cristales de hidroxiapatita (compuesto químico formado por calcio y fósforo), la porción orgánica, formada principalmente por fibras de colágeno. Esta composición aporta al tejido óseo una gran consistencia, resistencia a la

compresión y cierta elasticidad.

2.1.1.1 Estructura del hueso

Se distinguen dos formas de clasificar la estructura del tejido óseo, a nivel macroscópico y a nivel microscópico.

Nivel Macroscópico

A nivel macroscópico, el hueso maduro se puede clasificar en:

- Hueso compacto o cortical: Matriz muy densa y sin cavidades vacías. Su matriz extracelular se ordena en laminillas óseas que se disponen de manera paralela (hueso compacto laminar) o de manera concéntrica (hueso compacto de tipo osteónico). En su composición destacan los conductos de Havers u osteonas, formadas por laminillas concéntricas de osteocitos, por donde circulan vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas. Estos conductos están comunicados entre sí mediante unos conductos transversales denominados canales de Volkmann. Se localiza en la parte central y externa de los huesos largos, en el exterior e interior de los huesos planos y en distintas zonas de los huesos cortos.
- Hueso esponjoso o trabecular: posee grandes espacios denominados cavidades vasculares, ocupados por vasos sanguíneos y elementos hematopoyéticos. Estas cavidades están delimitadas por trabéculas óseas, red de celdas tridimensionales irregulares, en las cuales las fibras de colágeno pueden estar dispuestas de manera entrecruzada (hueso trabecular no laminar) u ordenadas en laminillas óseas (hueso trabecular laminar). Esta estructura es la que confiere la estructura esponjosa característica. En los espacios vacíos alrededor de esta estructura se almacena la médula ósea roja. Durante la formación de tejido óseo primero se forma hueso trabecular no laminar (hueso primario) que es sustituido por un hueso trabecular laminar (hueso secundario). Éste se encuentra en el interior de los huesos rodeado por hueso compacto (Delloye et al. 1990; Yasui et al., 1991). Se encuentra localizado en los extremos de los huesos largos y en los huesos cortos y planos.

Nivel Microscópico

A nivel microscópico, se divide en tres categorías:

- Hueso primario o lamelar: puede existir en el cortical o en el trabecular.
- Hueso secundario: se deposita solamente durante la remodelación y reemplaza al hueso primario cortical o trabecular.
- Tejido óseo inmaduro: Se despliega rápidamente como una disposición desorganizada de fibras de colágeno y osteocitos. El patrón desorganizado y la baja proporción de proteínas no colágenas disminuye la fuerza mecánica del tejido en comparación con el hueso primario o secundario. Da un apoyo mecánico temporal tras lesiones o durante la distracción osteogénica, apareciendo en el callo de distracción.

Las superficies interiores o medulares del hueso compacto, así como las cavidades del hueso esponjoso están recubiertas por el denominado endostio, que contiene células osteogénicas, osteoblastos y osteoclastos. Recubriendo al hueso externamente se encuentra el periostio, formado por una capa externa de tejido conectivo fibroso y por otra más próxima al hueso que contiene material osteogénico.

En la siguiente imagen pueden apreciarse las distintas partes:

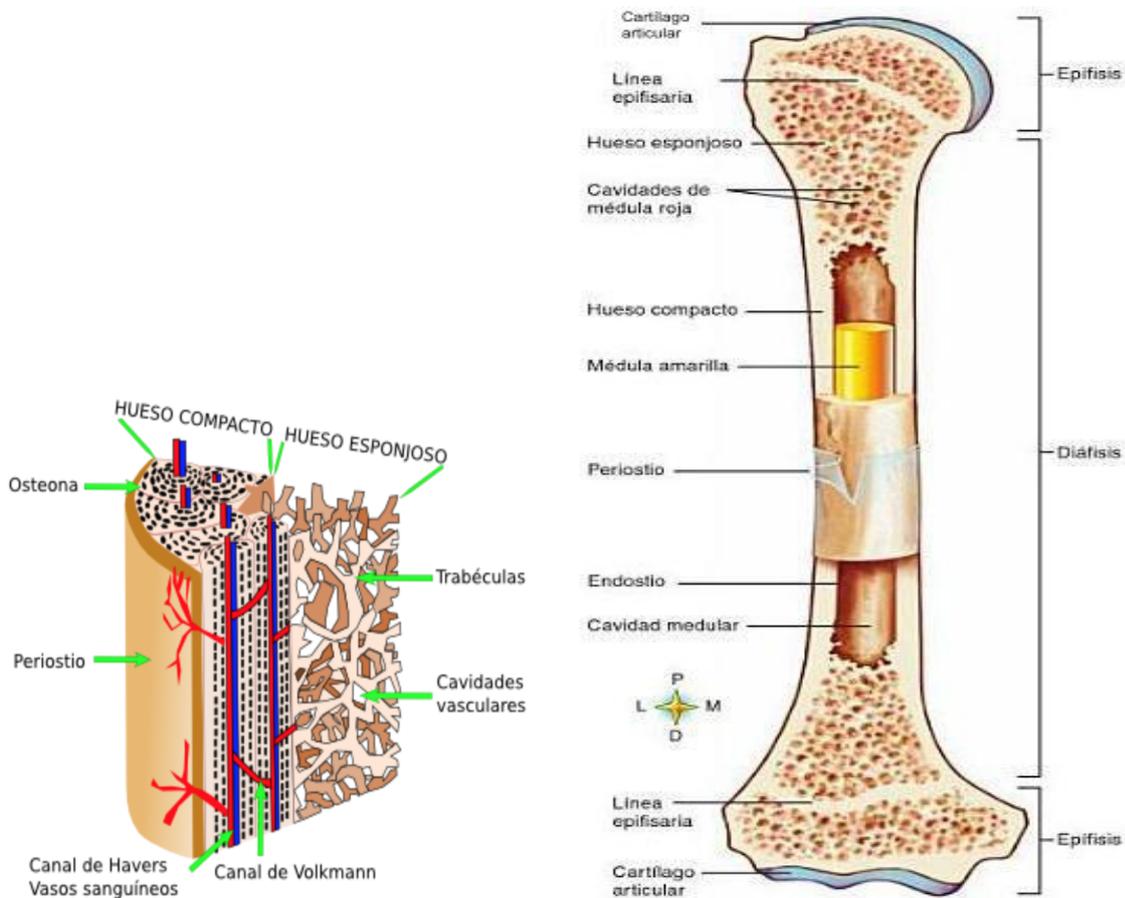


Figura 2.1 Partes del hueso.

2.1.1.2 Tipos de células óseas

Se distinguen distintos tipos de células en el tejido óseo:

- **Osteogénicas:** tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse en osteoblastos. Son muy activas durante la fase de crecimiento de los huesos y durante la reparación de las lesiones óseas. Se encuentran en la capa más profunda del periostio y del endostio, así como en las paredes de los conductos de Havers.
- **Osteoblastos:** células que forman los componentes orgánicos de la matriz ósea. Después se inicia el proceso de mineralización. Se encuentran en la superficie de los huesos en crecimiento y en aquellos que han sufrido algún tipo de lesión. Al finalizar su función, se diferencian en osteocitos o células de borde.
- **Osteocitos:** células más abundantes en el hueso maduro. Se originan a partir de los osteoblastos que han perdido la capacidad de síntesis y que han quedado atrapados en la matriz del tejido óseo. Su función se basa en mantener el buen estado de la matriz.
- **Osteoclastos:** se originan a partir de los monocitos en la médula ósea y tienen la función de controlar el crecimiento y la reparación del hueso, así como la eliminación de las células dañadas o debilitadas. Se localizan en la superficie de absorción de los huesos y avanzan hacia el interior del tejido.

2.1.1.3 Tipos de osificación

La osificación es el proceso de formación de tejido óseo. Siempre ocurre a partir de un tejido preexistente. Existen dos tipos de osificación, directa (intramembranosa) o indirecta (endocondral). La osificación intramembranosa se produce a partir de tejido mesenquimático mientras que la osificación endocondral se produce a partir de cartílago.

Actualmente sigue en estudio el tipo de osificación que se produce en el proceso de distracción osteogénica. Algunos autores proponen que solamente se da osificación endocondral (Kojimoto et al., 1988; Kallio et al., 1994), otros defienden una osificación puramente intramembranosa (Singare et al., 2006; Ilizarov, 1989b; Kallio et al., 1994; Sencimen et al., 2007). En otras investigaciones se defiende una combinación de ambas, endocondral e intramembranosa (Fink et al., 2003; Forriol et al., 2010; Krawczyk et al., 2007; Jazrawi et al., 1998; Li et al., 1999; Mizuta et al., 2003; Richards et al., 1999).

Osificación intramembranosa

En este tipo de formación de hueso, las células mesenquimáticas se transforman directamente en osteoblastos, los cuales, en conjunto, construyen un centro de osificación a partir del cual se va formando el hueso. Se produce dentro de una membrana de tejido conjuntivo.

Inicialmente se produce una agrupación de células mesenquimáticas para transformar células osteoprogenitoras y por tanto osteoblastos. Los osteoblastos segregan una serie de sustancias como colágeno y matriz ósea. Este proceso genera una zona de osificación inicial en torno a la cual se va repitiendo el proceso de maduración de células mesenquimáticas en osteoblastos, con lo que las trabéculas van aumentando de tamaño. La propia secreción y maduración de la matriz extracelular hace que los osteoblastos queden progresivamente rodeados por matriz ósea, lo que los convierte en osteocitos maduros. En los límites externos de este sistema de trabéculas se formará el periostio y el interior de los espacios entre trabéculas se convertirá en médula ósea y endostio. Las trabéculas junto al periostio espesan, formando un collar de tejido óseo inmaduro que posteriormente se reemplaza por hueso laminar maduro. El hueso esponjoso, que consta de distintas trabéculas, persiste internamente y su tejido vascular se convierte en la médula roja.

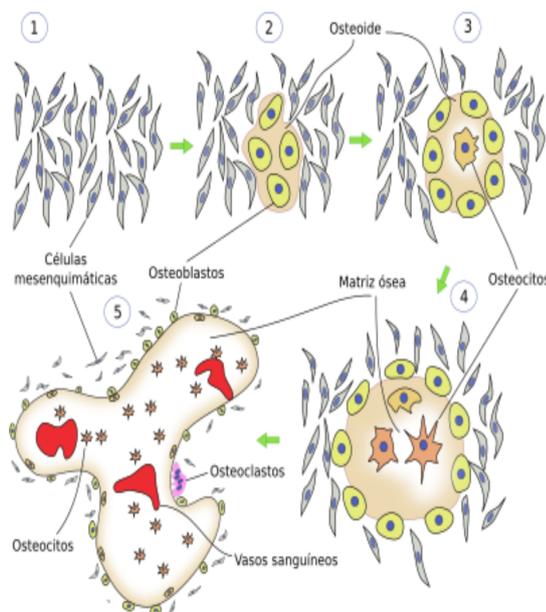


Figura 2.2 Proceso de osificación intramembranosa.

Osificación endocondral

En la osificación endocondral, las células mesenquimáticas se diferencian primero en condrocitos, los cuales son sustituidos por células óseas.

En primer lugar, las células mesenquimáticas se condensan, creando agregados compactos de células, denominados nódulos. En estos nódulos se formará cartílago de tipo hialino, así mismo, las células que se encuentran en la parte periférica de estos nódulos expresarán genes para diferenciarse en células óseas. Tras el proceso de compactación, hay una proliferación de condrocitos para formar un cartílago que servirá de molde para obtener el nuevo hueso. Los condrocitos secretarán matriz cartilaginosa típica y una capa periférica o pericondrio. Posteriormente, los condrocitos de la zona media dejan de dividirse apareciendo un collar óseo que sirve de soporte al hueso. Tras este proceso, crecen significativamente de tamaño, convirtiéndose en condrocitos hipertrofiados, determinando la longitud total y la tasa de crecimiento del hueso. Estos condrocitos producen un tipo de matriz extracelular que contiene elementos que permiten la mineralización. Los condrocitos hipertrofiados mueren por apoptosis y los huecos generados son invadidos por vasos sanguíneos que aportan osteoblastos, los cuales comienzan a generar matriz ósea interna. En los extremos de los huesos largos quedarán restos de cartílago que permitirán el crecimiento longitudinal del hueso y desaparecerá en huesos maduros, es decir, termina por osificarse completamente.

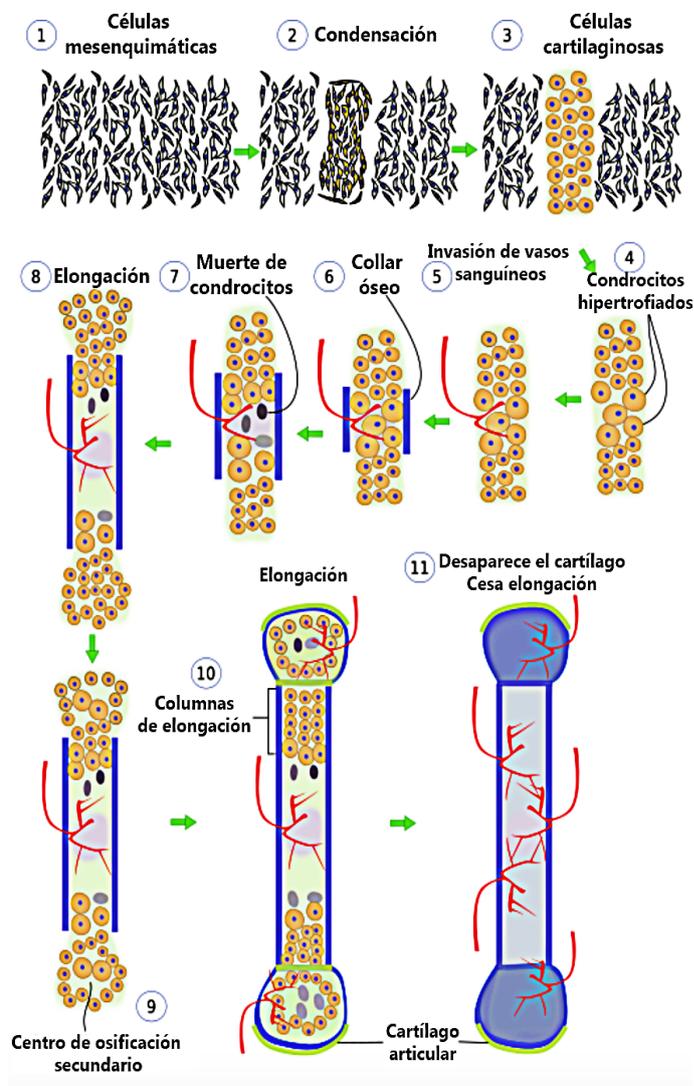


Figura 2.3 Proceso de osificación endocondral.

2.1.1.4 Composición del tejido óseo

El hueso maduro está compuesto por un 70% de matriz inorgánica, un 20% de matriz orgánica y un 10% de agua.

Dentro de la parte inorgánica el componente principal es hidroxiapatita cristalina en forma de placa $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ o HA (Kaplan et al., 1994; Ying, 2001). En la parte orgánica, aproximadamente el 90% es colágeno de tipo I, el porcentaje restante son proteínas no colágenas, como lípidos y otras macromoléculas.

La presencia de cristales da al hueso su rigidez y resistencia a la compresión y las fibras de colágeno le aportan resistencia a la tensión y dureza (Adams et al., 2006). Las propiedades de retención de agua de los proteoglicanos les permiten capturar espacio en el tejido en desarrollo (Adams et al., 2006).

2.1.1.5 Mineralización del tejido óseo

El componente mineral del hueso representa en torno al 65% del peso óseo. Está formado por calcio, fosfato y carbonato en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita y, en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor.

La mineralización del tejido óseo es el proceso por el cual se depositan minerales en la matriz ósea. Estos minerales son inicialmente depositados en huecos entre el final de las fibras de colágeno y la matriz. Cuando el hueso madura, los cristales de hidroxiapatita crecen para rellenar el espacio disponible, resultando en moléculas de colágeno flexibles. Durante el inicio de la mineralización, los cristales se orientan para que sus ejes sean paralelos a los ejes de las fibras de colágeno. El colágeno de tipo I contribuye de manera crítica en la mineralización, facilitando la formación inicial de cristales, aumentando la concentración local de calcio y/o fósforo o facilitando una nucleación heterogénea.

Las macromoléculas también intervienen en el proceso, enlazando el crecimiento de las superficies de los cristales para determinar el tamaño, la forma y el número de cristales formados.

Además, otros tipos de moléculas, principalmente la vitamina D, regulan la mineralización de la matriz ósea, coordinando la homeostasis de calcio y fosfato y estimulando la diferenciación de osteoblastos y su actividad.

2.1.2 Tejidos blandos

Como se ha comentado anteriormente, en esta sección se incluirán el resto de tejidos que componen el tejido conectivo. En el desarrollo de este proyecto, la composición y creación de los tejidos que no son el tejido óseo se encuentra fuera del objeto de estudio.

Tejido cartilaginoso

Es un tipo de tejido conectivo que crece tanto a tracción como a compresión y que tiene propiedades intermedias entre el tejido conectivo denso y el hueso. Es duro pero flexible. Aporta rigidez elástica a las estructuras que da apoyo.

Tejido fibroso

Es un tipo de tejido conectivo que tiene, relativamente, una alta resistencia a tracción y gran elasticidad, debido a su alta concentración de colágeno y fibras elásticas incrustadas en una matriz formada por agua, polisacáridos y proteínas.

Tejido de granulación

Es un tejido conectivo débilmente organizado que reemplaza el coágulo de fibrina durante la fase de latencia de la distracción osteogénica.

2.2 Base biológica de la formación de hueso durante la distracción osteogénica

La distracción osteogénica es una técnica quirúrgica destinada a formar grandes cantidades de tejido óseo. Dependiendo de la localización anatómica donde se induzca el esfuerzo tensional, la distracción osteogénica se puede dividir entre callotaxis (distracción del callo de fractura) o distracción fisaria (distracción de la placa de crecimiento). Este trabajo se centrará en el primer caso basado en el estiramiento gradual del callo de reparación que se forma alrededor de los segmentos de hueso quirúrgicamente separados mediante una osteotomía (Murray, 1996). Este método ha sido utilizado como la técnica de distracción predominante en los modelos experimentales y en las aplicaciones clínicas debido a las muchas complicaciones asociadas a la distracción fisaria (Pietrzak, 2008).

2.2.1 Fases de la distracción osteogénica

En base a la evolución en el tipo del callo de distracción ósea se pueden diferenciar cinco fases secuenciales en el proceso de distracción osteogénica, representadas en la figura 2.4

1. **Osteotomía:** El hueso es quirúrgicamente dividido en dos segmentos, con la consiguiente pérdida de continuidad y de integridad mecánica. Los fragmentos de hueso son posteriormente fijados a un distractor o fijador externo para estabilizar la brecha creada.
2. **Fase de latencia:** Fase comprendida entre la realización de la osteotomía y el comienzo de la tracción, durante la cual se forma el callo blando (Figura 2.4a). Coincide con el inicio de la curación normal del hueso.
3. **Distracción:** Los extremos del hueso osteotomizado son separados gradualmente formándose nuevos tejidos óseos en la brecha interfragmentaria (Figura 2.4b). Durante la aplicación del esfuerzo de tensión, se crea un microambiente dinámico (Delloye et al., 1990). Este ambiente estimula cambios a nivel celular y subcelular que pueden ser caracterizados como un efecto de estimulación del crecimiento y de forma (Kallio et al., 1994; Holbein et al., 1995; Mosheiff et al., 1996).
4. **Consolidación:** Espacio de tiempo entre el cese de la tracción y la retirada del dispositivo de distracción (Figura 2.4c). Este periodo representa el tiempo requerido para completar la mineralización del tejido regenerado. Tras el fin de la distracción, el callo de distracción osifica gradualmente y una nueva zona de fibra ósea recorre la brecha.
5. **Remodelación:** Es el plazo de tiempo entre la retirada del dispositivo de distracción (y por tanto la aplicación de la carga funcional completa) hasta completar la remodelación del hueso recién formado (Figura 2.4d). Durante este periodo, la estructura ósea inicialmente creada se refuerza por hueso lamelar de fibras paralelas. Tanto el tejido cortical como la médula se restablecen.

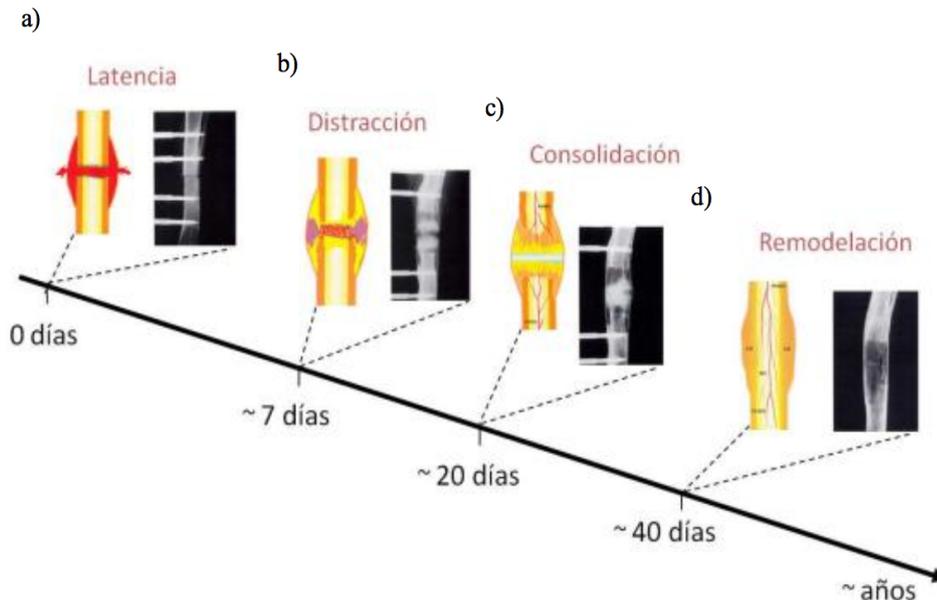


Figura 2.4 Fases de la distracción osteogénica.

2.3 Base mecánica de la formación de hueso durante la distracción osteogénica

Las investigaciones clínicas y experimentales han demostrado que el hueso es un tejido sensible a los esfuerzos que reacciona ante el ambiente mecánico imperante (Lanyon, 1987; Riddle & Donahue, 2009). En particular en la distracción osteogénica el ambiente mecánico lo impone el equipo de distracción e influye en la posterior curación.

Dentro de la historia de la distracción osteogénica un nombre sobresale sobre el resto y este es Gavriil Abramovich Ilizarov. El profundo interés en la influencia mecánica en los procesos biológicos llevó a este traumatólogo ruso a desarrollar su conocida ley de “Tension-Stress”. Esta ley describe como la tracción gradual de algunos tejidos vivos genera unas tensiones que estimulan y mantienen la regeneración y el crecimiento continuo de ciertas estructuras tisulares, tales como vasos sanguíneos, nervios, piel o huesos.

2.3.1 Historia del alargamiento de miembros

La primera aparición del método de distracción ósea se produce en 1905 por parte de Codivilla. Se consiguió un alargamiento por tracción en una sola fase aplicada en el pin transcalcáneo (Samchukov et al., 2001), lo cual se vio complicado por lesiones nerviosas graves y convulsiones persistentes e incontrolables (Codivilla, 1905).

Esta técnica comenzó a dar resultados fiables tras introducir la utilización de un fijador monolateral en el periodo de latencia.

El mayor desarrollo del proceso se consiguió a través del traumatólogo Ilizarov que diseñó un nuevo aparato (1951) y modificó la técnica de alargamiento (1989). Sin embargo, su trabajo era desconocido en la mayor parte del mundo durante bastante tiempo, empleándose la técnica de Wagner (1971). Para corregir deformaciones en un plano aparecieron los fijadores híbridos (Green, 1991; Green et al., 1992). Este tipo de fijadores no corrige las deformaciones en varios planos, para lo que se requiere un fijador Marco Espacial

Taylor. Actualmente esta operación se puede realizar también utilizando fijadores internos colocados en el canal del hueso.

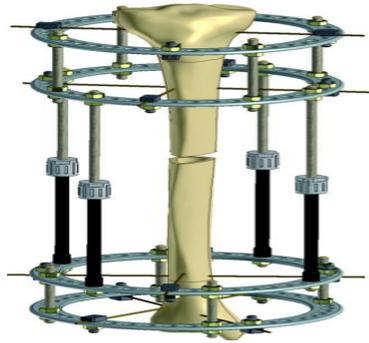


Figura 2.5 Distractor de Ilizarov.

2.4 Aplicaciones clínicas

La distracción ósea es utilizada en diversos procedimientos de alargamiento de huesos, ya sea en huesos largos, craneales, faciales o mandibulares. En base al estudio de este proyecto, las aplicaciones en huesos largos se pueden clasificar en:

- Transporte óseo: Para tratar defectos de huesos largos. Incluye la resección del hueso patológico, seguido del transporte de un segmento de hueso sano.
- Alargamiento de miembros: Para anomalías congénitas con deficiencias de reducción de extremidades.
- Tratamiento de no-uniones: Una vez pasado el proceso de curación de una fractura pueden darse no-uniones. Para fijar el hueso tal y como se debería se puede utilizar la distracción osteogénica.
- Artrodiastasis: Para corregir gradualmente deformaciones en articulaciones angulares y poder reestablecer el movimiento.
- Reconstrucción de pies: Se lleva a cabo para una gran variedad de condiciones.

3 Métodos

Este capítulo está dedicado a la descripción de los procesos seguidos para la obtención de los resultados de este proyecto. Debido a que el estudio tiene dos vertientes diferenciadas, este capítulo estará separado en dos secciones independientes, en las que se detallarán los pasos seguidos para cada uno de los estudios, precedidas de una breve introducción en la que se mostrará el experimento previo del que provienen los datos de estudio. Debido a la dificultad para obtener estos resultados de manera in-vivo, no se dispone de datos previos sobre la porosidad y la mineralización del callo de distracción.

3.1 Experimento previo

El experimento de distracción ósea se realizó sobre 11 ovejas merinas, con edades entre los 3 y los 5 años y un peso de 53.5 ± 8.5 kg (Mora-Macías et al., 2015). El bienestar durante los experimentos de cada una de las ovejas fue garantizado según el comité ético de la Universidad de Sevilla.

Para analizar la evolución de la porosidad durante el proceso se obtuvieron 6 micrografías del callo de distracción ósea, correspondientes a 6 ovejas en los días 35, 50, 79, 98, 161 y 525, así como 6 micrografías del *docking* correspondientes a los mismos días.

Para analizar la mineralización del callo de distracción se realizaron radiografías a todas las ovejas, desde la cirugía inicial hasta el sacrificio o final de la intervención. En total se cuenta con 172 radiografías, sin incluir las realizadas el día de la cirugía, para analizar la evolución de la mineralización. Estas radiografías están divididas en dos planos distintos:

- Plano Mediolateral: El rayo de la radiografía se dirige paralelamente al suelo (representado en la figura 3.1).
- Plano Dorsoplantar: El rayo de la radiografía se dirige con una inclinación de 45° respecto a la horizontal. Se obtiene una imagen menos distorsionada y permite ver mejor las líneas articulares (representado en la figura 3.2).



Figura 3.1 Proyección Mediolateral de una extremidad inferior.



Figura 3.2 Proyección Dorsoplantar de una extremidad inferior.

Se realizará un estudio independiente para cada plano y otro para la media de ambos planos.

3.2 Evolución de la porosidad en el callo de distracción ósea y en el *docking*

Para el estudio de la porosidad a lo largo de todo el proceso de distracción se han analizado 12 micrografías mediante procesamiento de imágenes con Matlab, 6 correspondientes al callo y 6 correspondientes al *docking*. El estudio se ha realizado sobre las micrografías con dos hipótesis distintas: incluyendo el tejido blando como poro y eliminando la zona correspondiente al tejido blando del estudio. Las distintas zonas de las micrografías quedan ejemplificadas en la figura 3.3.

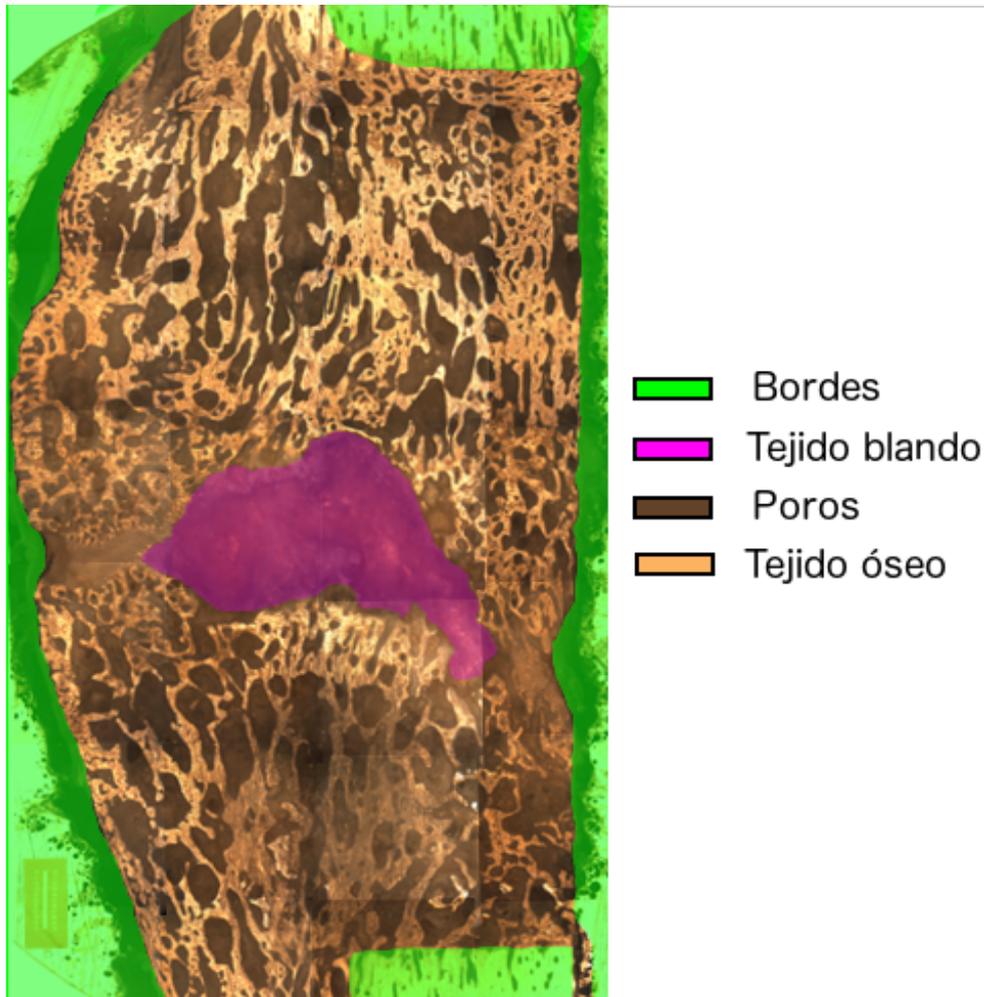


Figura 3.3 Zonas diferenciadas de una micrografía.

A continuación, se procede a describir los pasos seguidos para la obtención de los resultados de porosidad. La descripción del proceso es idéntica para el caso del callo y del *docking*, excepto para el caso en el que no se tiene en cuenta el tejido blando ya que éste no contiene dicho tipo de tejido.

3.2.1 Análisis de las micrografías y delimitación de la zona de estudio

Inicialmente se parte de 12 micrografías del callo de distracción, como la que se muestra en la figura 3.4, que contienen tanto la sección del callo de distracción como hueso cortical y resina proveniente de la muestra. Por tanto, si se analizara la imagen tal y como se obtiene inicialmente, se estaría incluyendo en los resultados información no proveniente del callo de distracción. Para evitar incluir estos datos en el tratamiento

de imágenes de Matlab, se modificarán los márgenes de las micrografías no correspondientes al callo de distracción ósea y que por tanto no son objeto de estudio de este proyecto. Una vez diferenciada la zona de estudio, se procederá a computar la imagen para obtener los resultados.

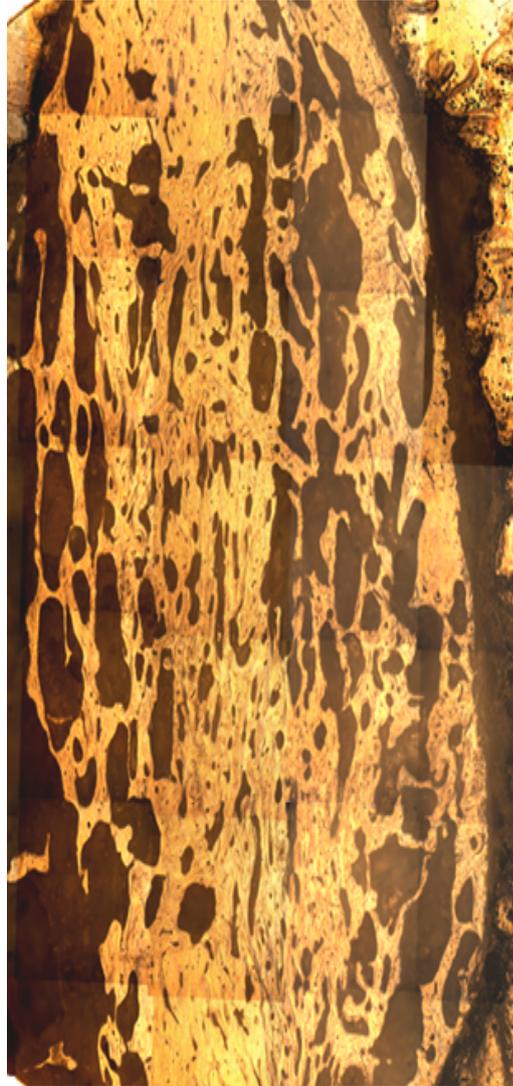


Figura 3.4 Micrografía correspondiente a 161 días tras la cirugía.

Como se ha comentado, para evitar añadir información no deseada a los resultados, se decide modificar la micrografía, eliminando toda aquella información que no sea de interés. Debido a la similitud de valores de los píxeles y a la falta de borde de referencia en la separación entre el hueso cortical y el callo, resulta imposible poder automatizar un proceso en Matlab que sea capaz de diferenciar esta zona sin necesidad de introducir los datos a mano. De manera similar, a la hora de no incluir la zona correspondiente a tejido blando, se encuentran las mismas dificultades ya que al no encontrarse en la micrografía dicho tejido blando, el valor del color del hueco creado para ello es igual al valor del color del poro. Por estas razones, en lugar de desarrollar un programa poco fiable, se decide modificar las micrografías con un programa de edición de imágenes (GIMP).

En cada una de las micrografías, se analiza cuidadosamente donde se encuentra el margen del callo, delimitándolo y tñiéndolo de color verde (RGB, G255) para, posteriormente, poder aplicar un filtro de color que elimine esa zona del estudio. Para aquellas micrografías que incluyen zonas de tejido blando, se obtienen

dos imágenes distintas, una en la que se incluye el tejido blando dentro de la zona a eliminar del estudio y otra en la que no.

En las siguientes figuras (figura 3.5 y figura 3.6) se muestra la modificación realizada a dos micrografías, correspondientes a los días 79 y 161. La micrografía tomada a los 79 días de la cirugía, incluye tejido blando, mientras que la micrografía tomada a los 161 días sólo incluye poros.

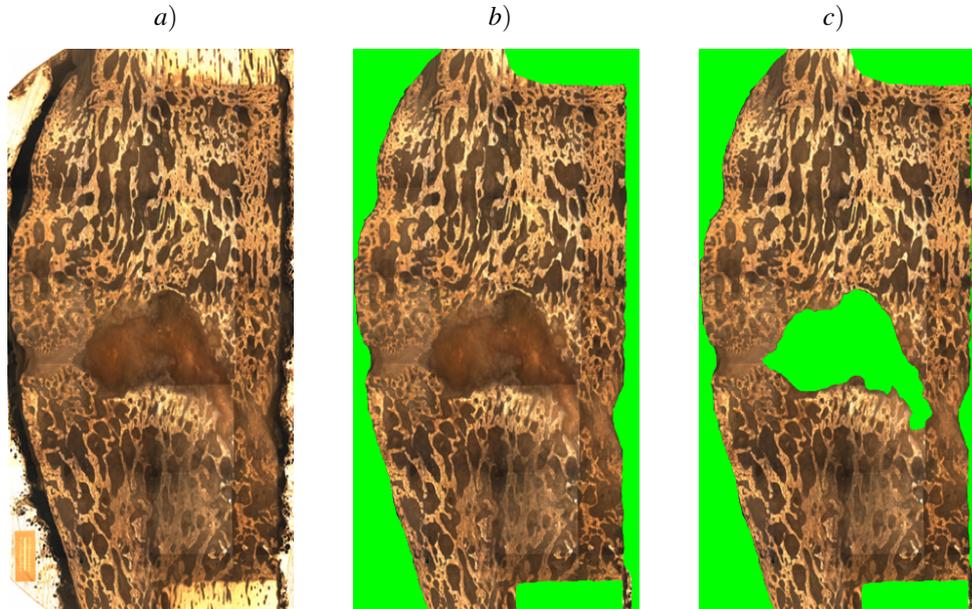


Figura 3.5 Delimitación de la sección del calo en la micrografía correspondiente a 79 días tras la cirugía: a) Micrografía sin modificar, b) Micrografía modificada incluyendo tejido blando, c) Micrografía modificada sin incluir tejido blando..

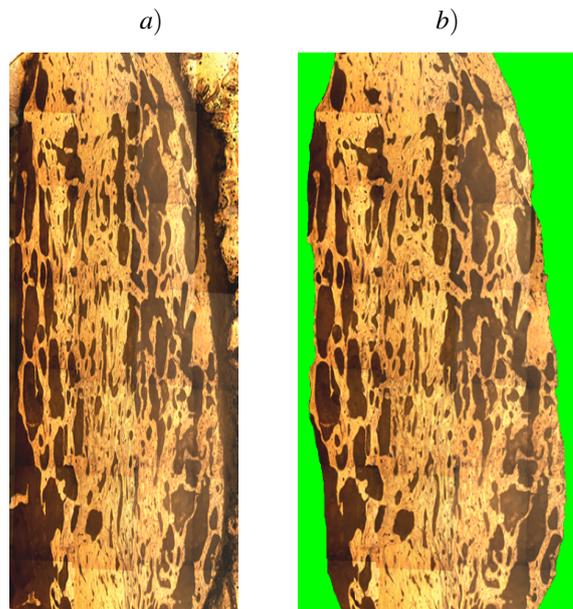


Figura 3.6 Delimitación de la sección del calo en la micrografía correspondiente a 161 días tras la cirugía: a) Micrografía sin modificar, b) Micrografía modificada..

Este mismo proceso se ha realizada con el resto de micrografías, tanto del callo de distracción como del *docking*. Una vez obtenidas las imágenes delimitadas se puede proceder a implementarlas en Matlab.

El estudio del número de poros así como su tamaño máximo y mínimo en una zona delimitada con anterioridad es también de interés. Para ello se ha seleccionado una zona concreta de las micrografías, representada en la figura 3.7 para el caso de la micrografía correspondiente a 35 días después de la cirugía. Una vez seleccionada la zona se puede proceder al cálculo de las magnitudes de interés dentro de la misma.

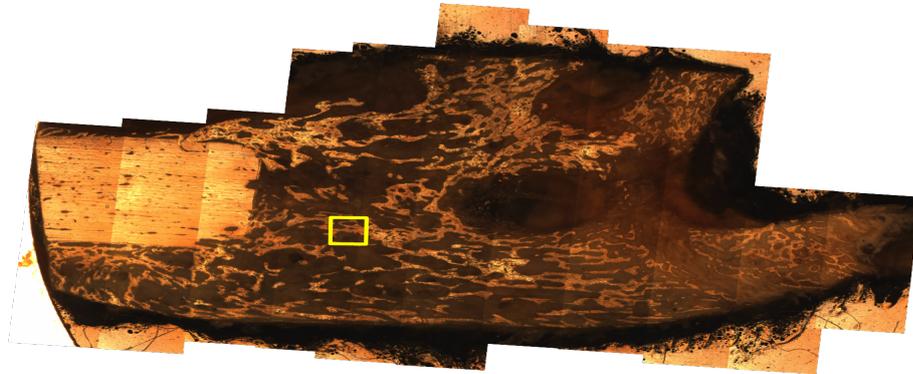


Figura 3.7 Zona seleccionada para el estudio de la evolución de los poros en las micrografías.

3.2.2 Creación e implementación del programa de cálculo de porosidad en el callo de distracción ósea

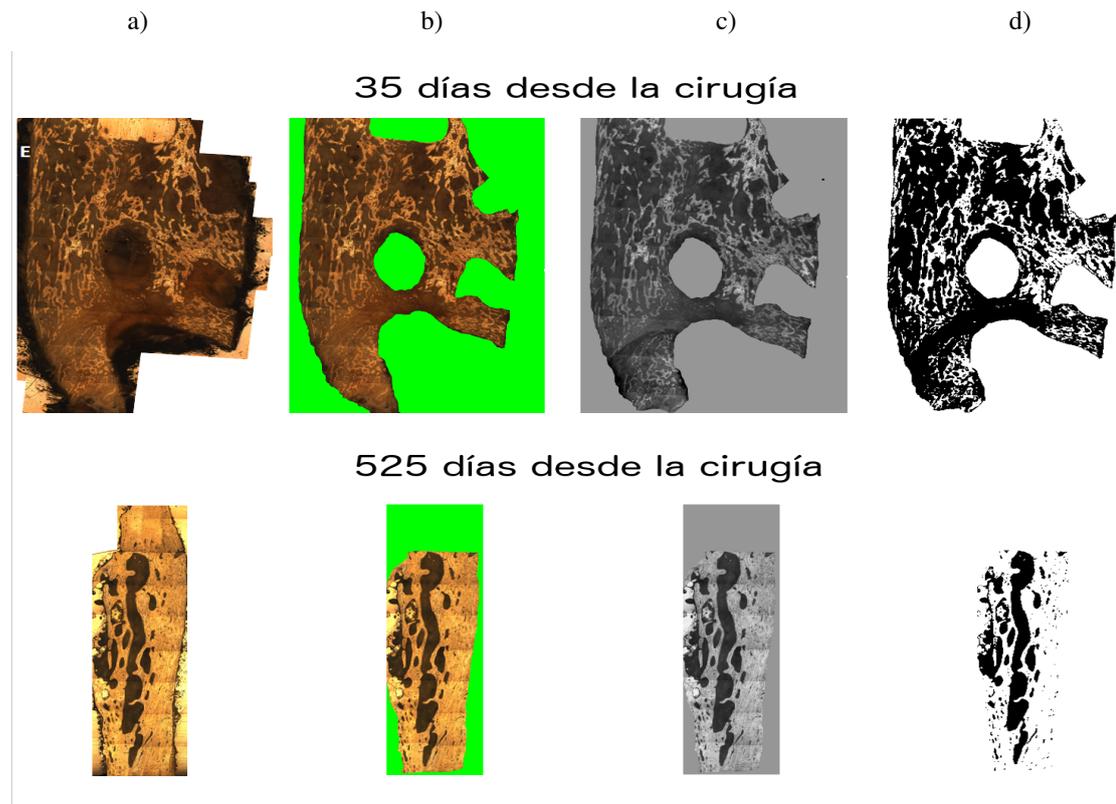


Figura 3.8 Proceso seguido de manipulación de las micrografías para el cálculo de la porosidad: a) Micrografía sin modificar; b) Micrografía una vez eliminados bordes y tejido blando; c) Micrografía en escala de grises; d) Micrografía binarizada.

Para calcular el porcentaje de porosidad en cada una de las micrografías, se ha desarrollado un programa que transforma la imagen, primero a escala de grises y posteriormente a blanco y negro. Una vez binarizada la imagen se puede proceder a los cálculos. El umbral tomado para cada micrografía, a la hora de transformar a blanco y negro, es distinto ya que, al tratarse de trabajo experimental, la calidad y luminosidad de cada una de ellas varía. Se ha tomado aquel umbral que mejor representa, en la imagen binarizada, la cantidad de poros en la micrografía original. El proceso que sigue cada micrografía hasta estar binarizada se muestra en la figura 3.8.

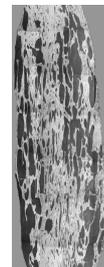
Como se comenta en la sección anterior, gracias a la edición de las micrografías iniciales se puede aplicar un filtro de color que elimine del cómputo toda aquella zona de la imagen que contenga dicho valor en RGB permitiendo así unos resultados más fiables. El tipo de código empleado para el filtro de color en la imagen queda ejemplificado en las siguientes líneas:

```
I=imread('micrografía');
color_rojo=double(I(:,:,1)); %Micrografía sólo con rgb rojo
color_verde=double(I(:,:,2)); %Micrografía sólo con rgb verde
color_azul=double(I(:,:,3)); %Micrografía sólo con rgb azul
bordes_imagen=color_verde - color_rojo - color_azul; %Bordes a eliminar de la
micrografía
[m,n]=size(I); %Número de filas y columnas de la matriz de píxeles.
area_margenes=0;
if bordes_imagen(1:m,1:n)>0;
    area_margenes=area_margenes+1; %Área encerrada en los márgenes
end
Area_imagen=m*n; %Área total de la imagen de la radiografía
Area_osea_final=Area_imagen - Area_borrar; %Área final para el cálculo
```

Micrografía sin modificar



Micrografía en escala de grises



Márgenes de la imagen a eliminar



Micrografía en blanco y negro sin márgenes



Figura 3.9 Micrografía correspondiente a 161 días tras la cirugía.

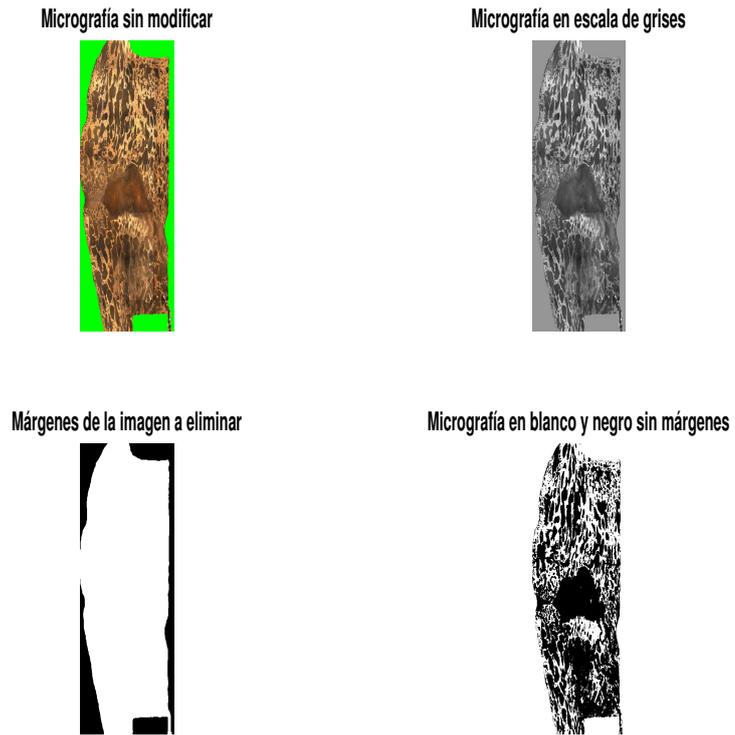


Figura 3.10 Micrografía correspondiente a 79 días tras la cirugía incluyendo tejido blando.

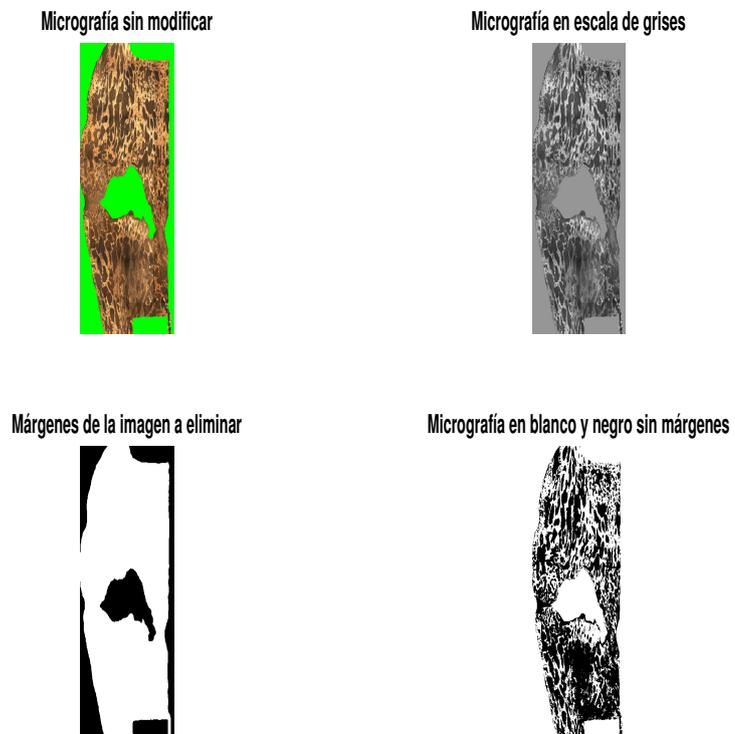


Figura 3.11 Micrografía correspondiente a 79 días tras la cirugía sin incluir tejido blando.

El proceso seguido por el programa, de imagen en RGB a escala de grises, eliminación de los márgenes y binarización de la micrografía queda representado en las figuras 3.9, 3.10 y 3.11. En ellas se refleja claramente el filtro de color aplicado y cómo en el caso de existir tejido blando incluido dentro del callo de distracción, éste es eliminado también del cómputo en un caso e incluido como poro en la otra hipótesis.

Una vez obtenida la imagen en blanco y negro, eliminando las zonas no deseadas para el cálculo, se procede a tratar la imagen como una matriz de ceros y unos, correspondiendo el valor cero con el color negro y el valor uno con el color blanco, simbolizando cada celda un pixel de la imagen. Las celdas de valor 1, por tanto, se corresponden a aquella parte del callo que está osificada, mientras que las celdas de valor 0 se corresponden con los poros del callo. Haciendo esta distinción se procede a calcular el porcentaje de porosidad en el callo de distracción ósea. Se toma como área total del callo todas las celdas de la matriz a la cual se le resta el total de píxeles contabilizados en el filtro de color para eliminar los datos no deseados. El área correspondiente a los poros serán todas aquellas celdas que contengan ceros. Teniendo nombradas estas dos variables, el porcentaje total de porosidad de cada micrografía es fácilmente calculable, siendo este:

$$\text{Porcentaje de porosidad de la micrografía} = \frac{\text{Área porosa}}{\text{Área ósea}} \quad (3.1)$$

Los resultados obtenidos por este proceso se mostrarán en el siguiente capítulo.

Para el caso del *docking* se ha realizado el mismo procedimiento, el cual queda representado en la figura 3.12

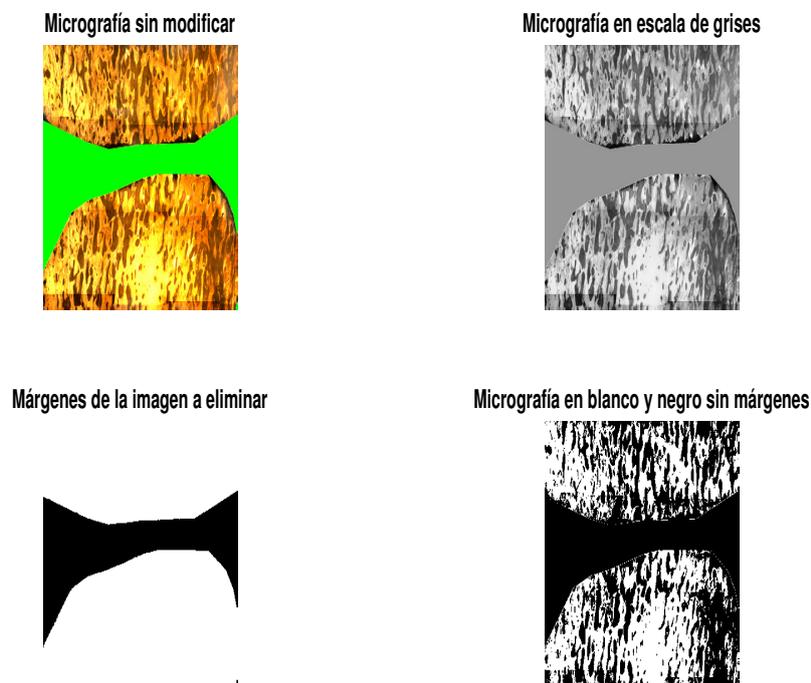


Figura 3.12 Micrografía correspondiente al *docking* 98 días tras la cirugía.

En la zona determinada de estudio dentro de las micrografías especificada anteriormente, se ha procedido a calcular el número de poros así como el tamaño máximo de poro y el tamaño mínimo de poro. Para ello se han utilizado dos funciones implementadas en Matlab: 'regionprops' y 'bwboundaries'

La función 'regionprops' mide variables de las regiones de la imagen, indicadas a través de las variables de entrada. En este caso, la variable de entrada es la imagen binarizada de la zona delimitada y la propiedad a analizar por la función será el área de las regiones encontradas. La función 'bwboundaries' permite delimitar las regiones de la imagen. Ambas funciones seleccionan tanto los poros como zonas de tejido óseo que se puedan considerar dentro del poro por estar éste alrededor del tejido óseo (figura 3.13).

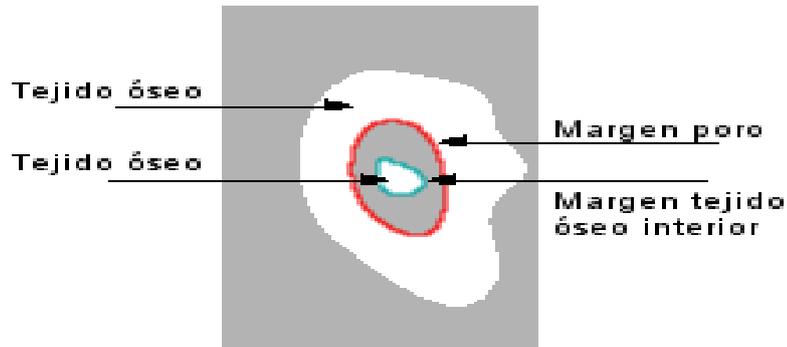


Figura 3.13 Ejemplo de funcionamiento 'bwboundaries'.

Para evitar que esto ocurra, introduciéndose información no deseada, se ha invertido los colores de la imagen y se ha añadido una opción a la función 'bwboundaries' *noholes* (evita incluir zonas óseas dentro de los poros), permitiendo así que las zonas delimitadas sean exactamente los poros de la imagen. En la figura 3.14 se muestra el proceso seguido.

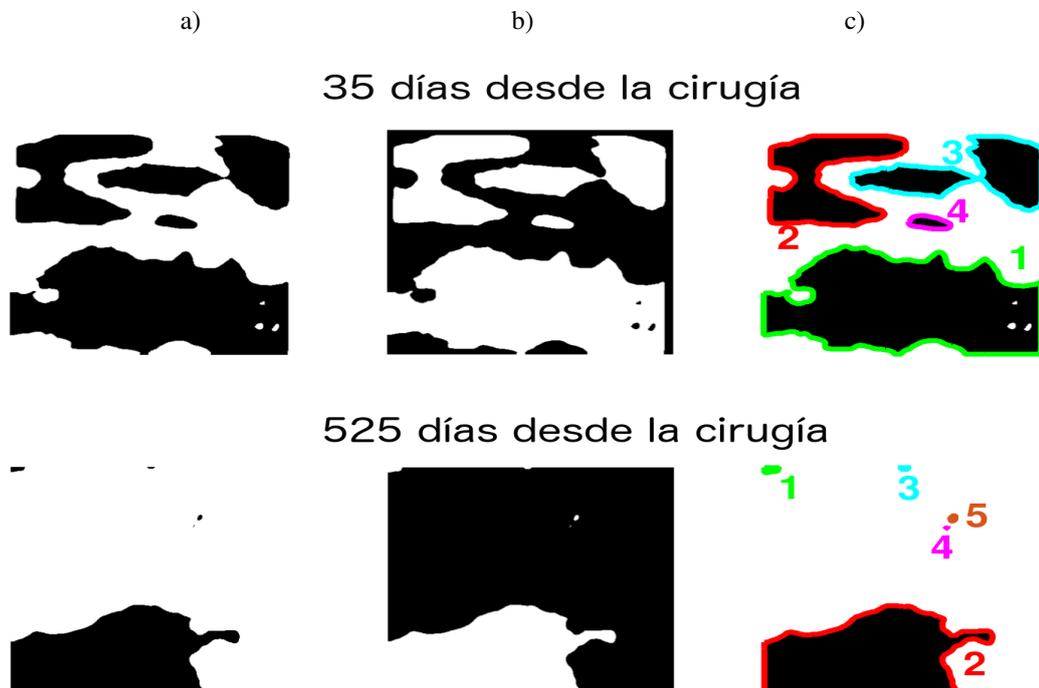


Figura 3.14 Proceso seguido para la delimitación de los poros en las micrografías correspondientes a 35 y 525 días después de la cirugía: a) Imagen binarizada; b) Imagen binarizada inversa; c) Imagen binarizada con los poros bordeados.

El código utilizado una vez delimitada el área de estudio queda ejemplificado en las siguientes líneas:

```
I = imread('zona_de_estudio'); %Se toma la imagen ya binarizada
I_inversa = imcomplement(I);; %Cambia los píxeles blancos por negros y
viceversa
areas = regionprops(I_inversa, 'Area'); % Estructura de propiedades donde se
calculan las áreas de las regiones
[B,L]=bwboundaries(bw_inversa,'noholes'); %Obtiene los márgenes de los poros
```

Una vez calculadas las áreas se procederá a obtener el valor máximo y mínimo del área de cada poro respecto al área ósea total de la zona de estudio así como cuántos poros existen en la zona.

3.3 Evolución de la mineralización en el callo de distracción ósea

En este estudio se han utilizado las radiografías tomadas a las 11 ovejas del experimento previo. Para analizar cómo de mineralizado está el callo de distracción ósea se analizará cada imagen en escala de grises. En función de los valores de gris de la imagen se obtendrá el resultado de mineralización.

En la tabla 3.1 se expone el número de radiografías obtenidas, de cada plano, para cada oveja de estudio.

Tabla 3.1 Número de radiografías separadas por ovejas y plano.

Oveja	Plano Mediolateral	Plano Dorsoplantar
Oveja 1	10	4
Oveja 2	8	8
Oveja 3	4	4
Oveja 4	11	11
Oveja 5	20	20
Oveja 6	4	4
Oveja 7	2	1
Oveja 8	3	3
Oveja 9	1	1
Oveja 10	15	15
Oveja 11	7	7

3.3.1 Análisis de las radiografías y delimitación de las zonas de estudio

Al igual que lo ocurrido en el caso de las micrografías, utilizadas para el estudio de la porosidad, en las radiografías de este análisis no se puede fijar, mediante funciones de Matlab, regiones de estudio. Esto es debido a la cercanía de los valores de gris de cada uno de los píxeles de las imágenes.

Así mismo, la imagen de la radiografía completa, como se puede apreciar en la figura 3.15, incluye tanto zonas no pertenecientes a la radiografía en sí, como al aparato distractor utilizado en la operación. Por ello, se toma la determinación de analizar sólo la zona correspondiente al callo de distracción dentro de la radiografía.

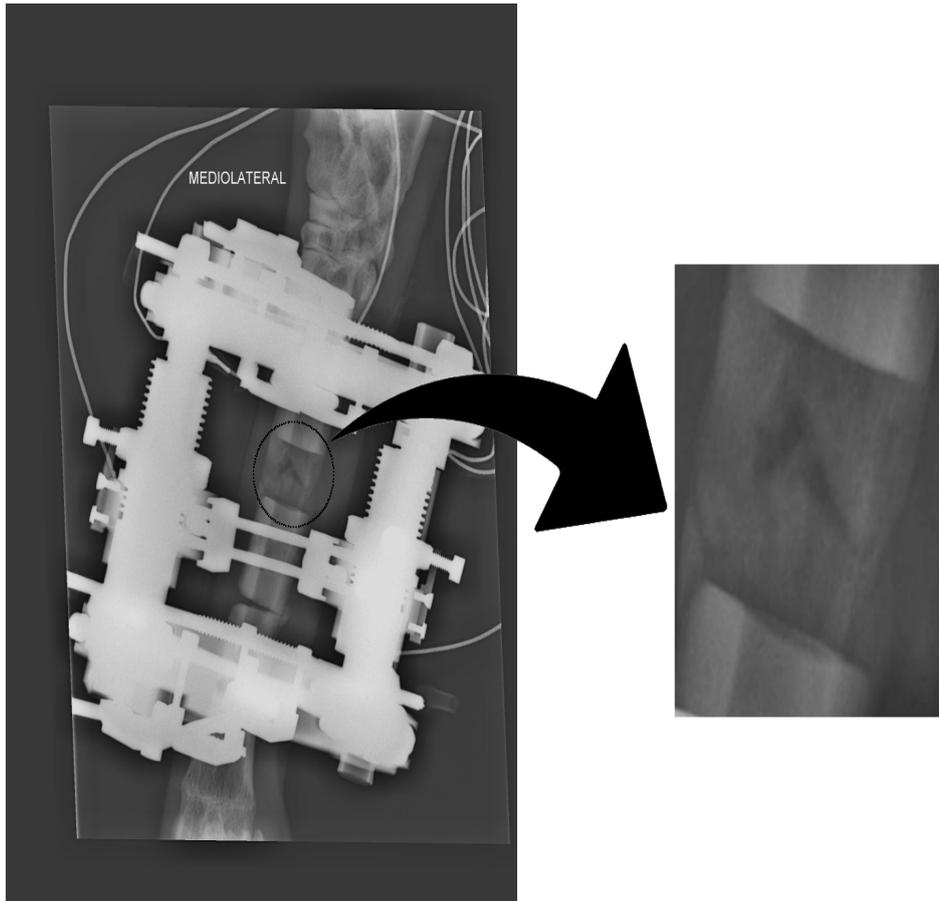


Figura 3.15 Radiografía de la oveja 1 correspondiente a 64 días tras la cirugía.

Una vez seleccionada la región de estudio, inicialmente, se divide en dos zonas delimitadas mediante el programa de edición de imágenes (GIMP), una correspondiente al callo de distracción y otra al hueso de control (figura 3.16). Esta segunda región se utilizaría como referencia para la mineralización pero debido a la no homogeneidad del hueso de control, obtener una buena referencia no es compatible. Por ello se decide cambiar la referencia al aparato distractor, completamente homogéneo. Esta decisión también contiene una problemática, en las ovejas con mayor número de días radiografiados, llegado un momento del proceso, se retira el aparato y por tanto la referencia tomada desaparecería de las radiografías finales y habría que tomar distintas referencias para un mismo proceso.

Finalmente, se toma como referencia genérica una matriz de 20x20 píxeles correspondientes a la esquina superior izquierda de la zona de estudio. Esta referencia mejora las referencias elegidas con anterioridad ya que se mantiene en todas las radiografías independientemente de la oveja y el día del proceso. Además, varía su luminosidad, es decir, su valor de gris, en igual medida que los valores de los píxeles correspondientes al callo de distracción en función de lo clara u oscura que sea la radiografía tomada.

Por otro lado, en algunas radiografías se ha tenido que delimitar la zona del callo evitando cables del distractor ya que, si se incluyeran esos píxeles en el estudio, los resultados no serían fiables.

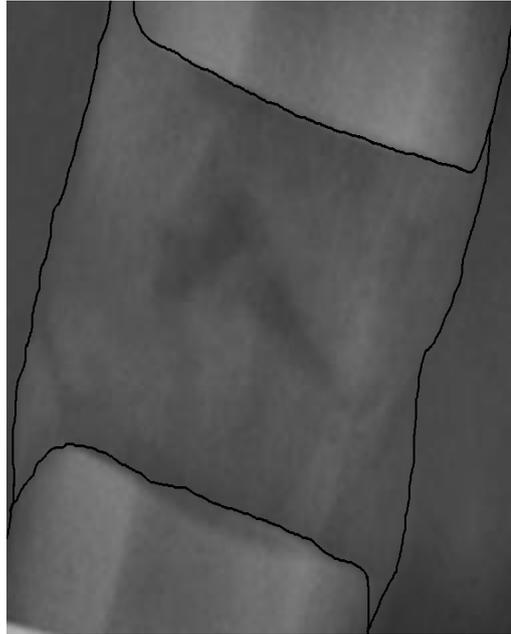


Figura 3.16 Zona delimitada para la radiografía de la oveja 1 correspondiente a 64 días tras la cirugía.

3.3.2 Creación e implementación del programa de cálculo de mineralización en el callo de distracción ósea

En base a las imágenes editadas, se crea un código que permite calcular cómo de mineralizado se encuentra el callo de distracción ósea durante el proceso de regeneración tras la cirugía.

Para dicho cálculo, se ha creado una función de Matlab que, para cada radiografía, obtiene el porcentaje mineralizado del callo mediante la media de la zona de referencia y la media del callo de distracción. Se han utilizado funciones ya definidas en Matlab para el cálculo de los valores de los píxeles en las regiones de estudio.

Partiendo de la radiografía, se crean dos matrices distintas, la primera corresponde a todos los valores de los píxeles de la radiografía en escala de grises, la segunda correspondería a una submatriz de la radiografía que incluye todos aquellos píxeles cuyo valor sea superior a 0. Este paso permite eliminar de la imagen el borde marcado en negro de la región y así mismo indica a la función de Matlab 'regionprops' dónde debe calcular las propiedades indicadas de la radiografía.

La función 'regionprops' mide variables de las regiones de la imagen, indicadas a través de las variables de entrada, siendo estas las dos matrices indicadas con anterioridad y una tercera variable que indica las propiedades a medir. En este caso de estudio, se incluyen dentro de las propiedades, el área y el valor de los píxeles de la región.

El código definido en estos párrafos sería:

```
I = imread('radiografía'); %Matriz de píxeles de la radiografía
BW = I > 0; %Matriz que sólo incluye los bordes de la región.
matriz_de_propiedades = regionprops(BW, I, {'Area', 'PixelValues'}); %
    Estructura de propiedades
```

A partir de los valores obtenidos por la función se obtiene la media de los valores de los píxeles y su desviación estándar. Este mismo proceso se realiza para el submatriz 20x20 de referencia. Una vez obtenida

la media y la desviación estándar, se calcula el porcentaje de mineralización del callo de distracción.

```
media_del_callo_de_distraccion = mean(double(matriz_de_propiedades.PixelValues)
);
media_de_referencia = mean(mean(I(1:20,1:20)));
porcentaje_mineralizacion = media_del_callo_de_distraccion/media_de_referencia;
```

En la figura 3.17 quedan respresentadas la media y la desviación estándar para el callo de distracción ósea de la radiografía del día 51 de la oveja 1.



Figura 3.17 Media y desviación de los valores de los píxeles para la oveja 1 y radiografía de 51 días en el plano Mediolateral.

El método para hallar los resultados definido hasta el momento, así como las radiografías representadas, se corresponden al plano Mediolateral. La única diferencia entre las radiografías del caso Mediolateral y el Dorsoplantar es el cambio de plano a la hora de la toma de la radiografía, por tanto el proceso necesario para obtener los datos se puede considerar idéntico.

La figura 3.18 representa la media y la desviación de los valores de gris del callo en el caso de una radiografía Dorsoplantar.

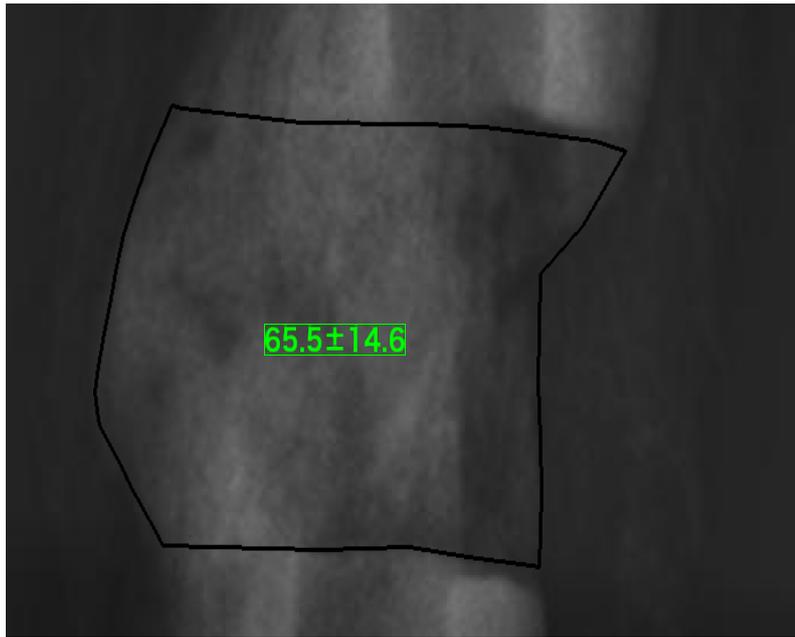


Figura 3.18 Media y desviación de los valores de los píxeles para la oveja 1 y radiografía de 98 días para el plano Dorsoplantar.

4 Resultados

En este capítulo se mostrarán los resultados obtenidos mediante los métodos descritos en el capítulo anterior para ambas vertientes de estudio. Al igual que en el capítulo de métodos, este capítulo estará dividido en dos secciones independientes correspondientes a los estudios de porosidad y mineralización del callo de distracción ósea. Estos resultados serán analizados en el siguiente capítulo.

4.1 Resultados del estudio de las micrografías

Una vez desarrollado el código descrito anteriormente, se procede a compilarlo, obteniéndose los valores de porosidad para las micrografías, en cada uno de los casos de estudio descritos.

4.1.1 Porcentaje de porosidad en el callo de distracción ósea

Porosidad incluyendo zonas de tejido blando como poros

Los resultados obtenidos para este caso de estudio se presentan a continuación en la figura 4.1 y en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Porcentajes de porosidad incluyendo tejido blando como poros en el proceso de distracción ósea.

Días desde la cirugía	Porcentaje de porosidad	Relación respecto al hueso cortical
35 días	76.347 %	0.053
50 días	67.948 %	0.0599
79 días	54.429 %	0.0748
98 días	49.475 %	0.0823
161 días	42.926 %	0.0949
525 días	31.861 %	0.128
Cortical	4.073 %	1

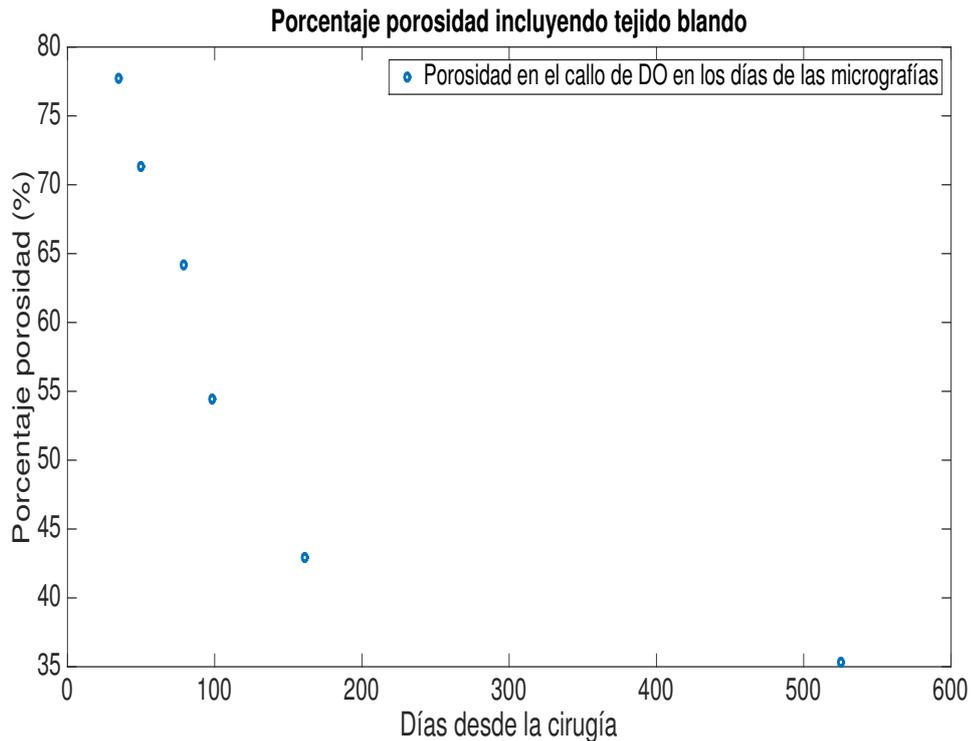


Figura 4.1 Gráfica del avance de la porosidad en el callo de distracción ósea computando el tejido blando.

Los puntos representados en la figura 4.1 son los correspondientes a la porosidad de cada micrografía en los distintos días posteriores a la cirugía.

En la tabla 4.1 se incluyen los valores calculados de la porosidad en función de los días desde la cirugía con cinco cifras significativas además del porcentaje de porosidad para el hueso cortical de referencia.

Tanto en la figura 4.1 como en la tabla 4.1, se observa una disminución de la porosidad con el avance de los días, partiendo de una porosidad próxima al 80% y aproximándose al valor de referencia del hueso cortical, en torno al 30% de porosidad.

Porosidad sin incluir zonas de tejido blando en el análisis

Los resultados obtenidos para este caso de estudio se presentan a continuación en la figura 4.2 y en la tabla 4.2.

Tabla 4.2 Porcentajes de porosidad sin incluir tejido blando como poros en el proceso de distracción ósea.

Días desde la cirugía	Porcentaje de porosidad	Relación respecto al hueso cortical
35 días	73.328 %	0.0555
50 días	63.093 %	0.0645
79 días	59.09 %	0.0689
98 días	49.47 %	0.0823
161 días	42.926 %	0.0949
525 días	31.861 %	0.128
Cortical	4.073 %	1

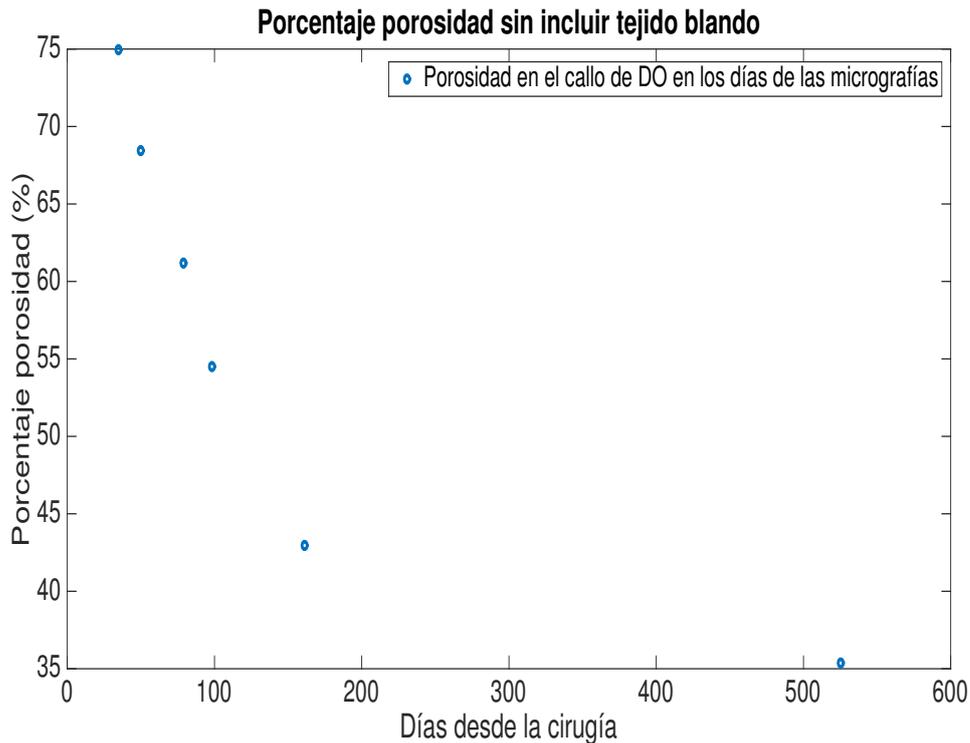


Figura 4.2 Gráfica del avance de la porosidad en el callo de distracción ósea sin computar el tejido blando.

Como se puede observar en la figura 4.2 y en la tabla 4.2, hay valores de la porosidad de algunas micrografías iguales a los valores del caso de estudio anterior. Esto es debido a que dichas micrografías no contenían zonas de tejido blando a excluir del análisis y por tanto su cálculo se mantiene igual en ambos casos. Las micrografías modificadas para este estudio se corresponden con los días 35, 50 y 79.

También se observa que la porosidad correspondiente a los días modificados ha disminuido, resultado lógico teniendo en cuenta que las zonas de tejido blando han sido eliminadas del estudio. En este caso, la porosidad parte de aproximadamente un 75% hasta el mismo valor del apartado anterior, es decir, en torno a un 30%.

4.1.2 Porcentaje de porosidad en el *docking*

Los resultados obtenidos para este caso de estudio se presentan a continuación en la figura 4.3 y en la tabla 4.3.

Tabla 4.3 Porcentajes de porosidad en el *docking*.

Días desde la cirugía	Porcentaje de porosidad	Relación respecto al hueso cortical
35 días	72.217 %	0.0564
50 días	56.668 %	0.0718
79 días	52.543 %	0.0775
98 días	46.093 %	0.0884
161 días	35.693 %	0.114
525 días	25.731 %	0.158
Cortical	4.073 %	1

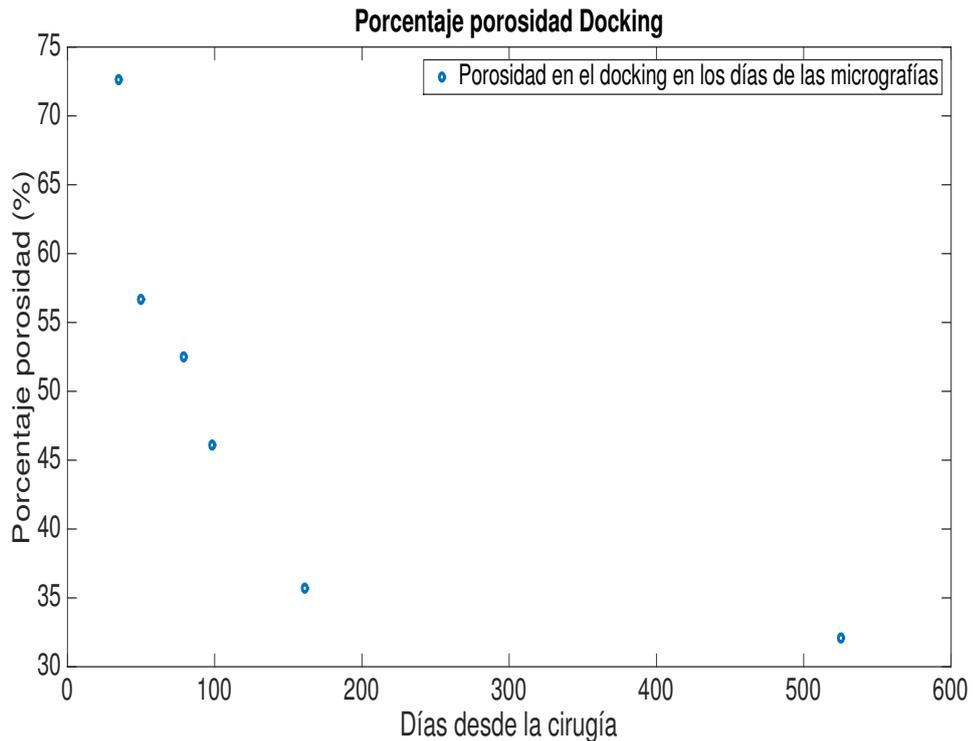


Figura 4.3 Gráfica del avance de la porosidad en el *docking*.

La evolución seguida por la porosidad en los tres casos de estudio es bastante similar. Las repercusiones de estos resultados se analizarán en el siguiente capítulo.

4.1.3 Tamaño de poro en una zona determinada de las micrografías

En la tabla 4.4 se muestran los tamaños de poros correspondientes a las micrografías en una zona determinada.

Tabla 4.4 Tamaño máximo y mínimo de poro así como área porosa total respecto al área ósea total.

Días desde la cirugía	Tamaño máximo de poro	Tamaño mínimo de poro	Área porosa total
35 días	34.29%	0.665%	56.505%
50 días	30.145%	0.0028%	43.789%
79 días	28.831%	0.0107%	41.406%
98 días	13.3190%	0.0115%	38.602%
161 días	26.2623%	0.0616%	37.5924%
525 días	20.8969%	0.0025%	21.0650%

4.2 Resultados del estudio de las radiografías

En este apartado, se han representado los resultados obtenidos para la mineralización del callo de distracción osteogénica en función del plano, ya sea Mediolateral o Dorsoplantar, así como una media de ambos planos.

Se ha utilizado una escala logarítmica en el eje de abscisas para una mejor representación de los datos, siendo éste los días transcurridos desde la cirugía. Así mismo, se han incluido todos los porcentajes de cada radiografía, correspondiente al mismo plano, en la misma figura para poder así visualizar la familia completa de datos, ya que, tal y como se comentó con anterioridad en el capítulo de Métodos al hablar del experimento previo, no todas las ovejas tienen el mismo número de radiografías y por tanto el análisis entre las distintas ovejas por separado conllevaría una dificultad añadida. En la leyenda de la figura viene marcado qué puntos corresponden a cada oveja.

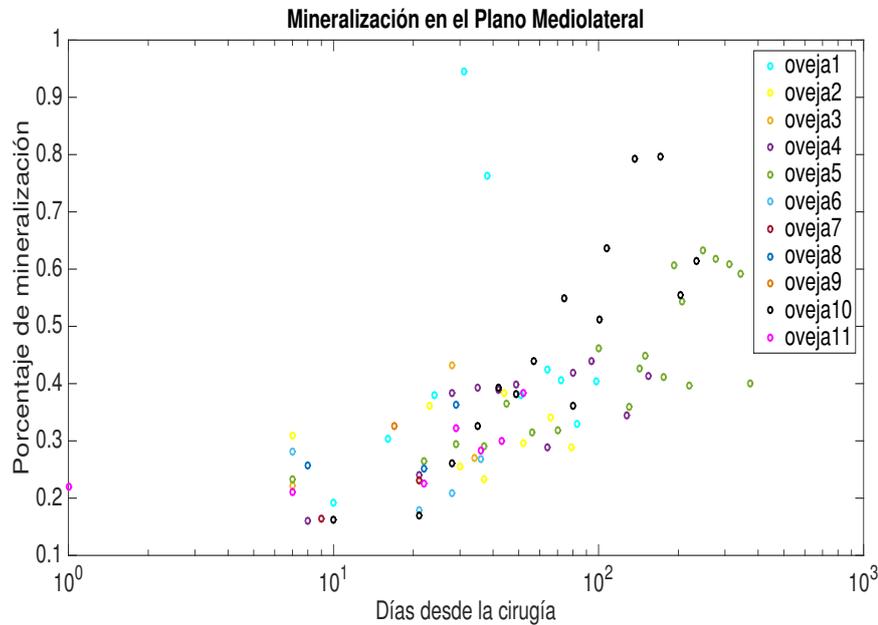


Figura 4.4 Gráfica del avance de la mineralización en el plano Mediolateral.

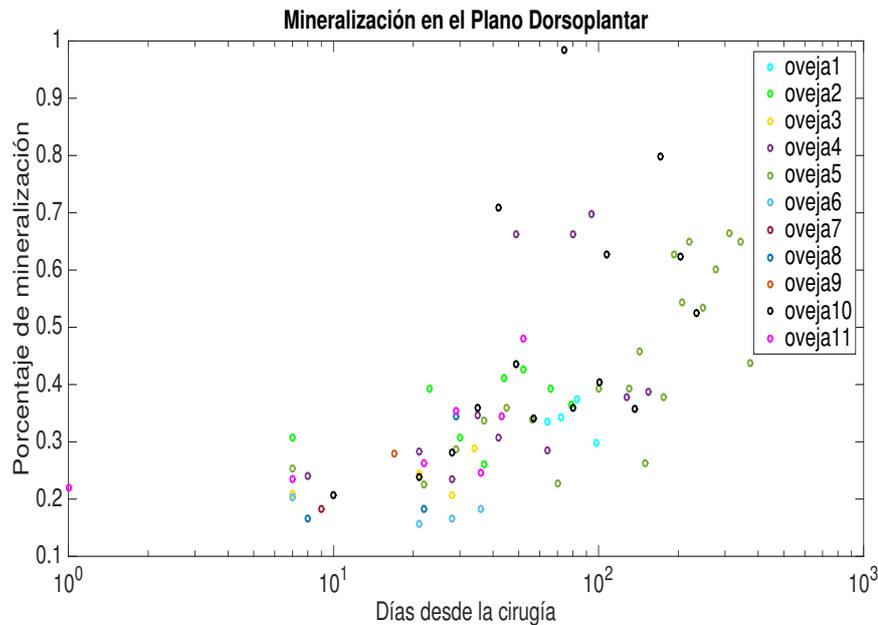


Figura 4.5 Gráfica del avance de la mineralización en el plano Dorsoplantar.

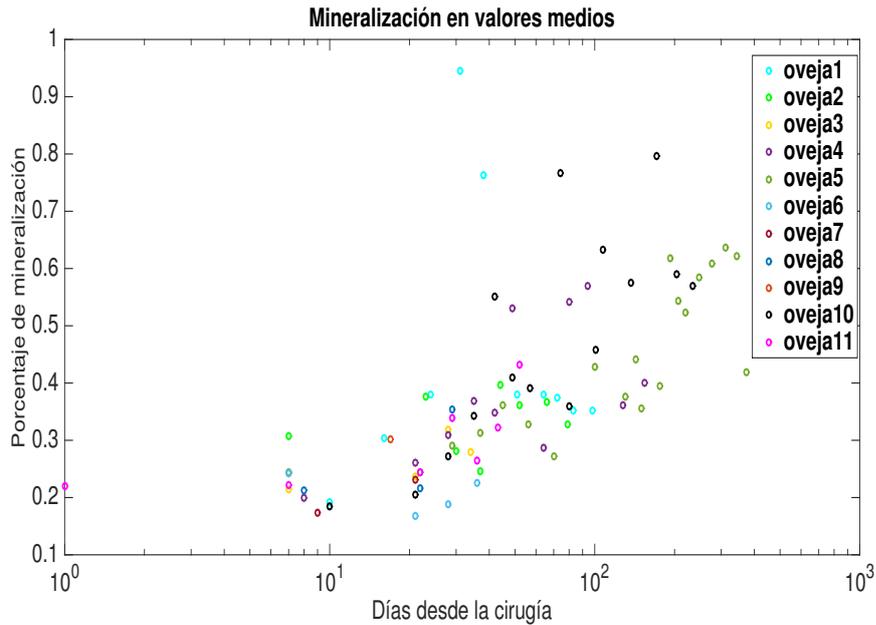


Figura 4.6 Gráfica de la media de los valores de mineralización para los planos mediolateral y dorsoplantar.

En las figuras 4.4, 4.5, 4.6, se pone de manifiesto cómo aumenta la mineralización del callo de distracción ósea a medida que aumentan los días transcurridos desde la cirugía.

Para el plano Mediolateral, se parte de unos valores de mineralización en torno al 20% y al finalizar el estudio se obtienen valores entorno al 70-80%. Para el plano Dorsoplantar, se obtienen valores muy similares de la mineralización, siendo los valores finales del estudio un poco inferiores en media, entorno al 60-70% en la mayoría de los datos. Al realizar la media entre el plano Mediolateral y el plano Dorsoplantar, los valores obtenidos son bastante parejos a los anteriores.

Como puede observarse, los datos extraídos de las radiografías correspondientes a cada oveja, se asemejan bastante unos a otros en días próximos. Es también de interés la evolución seguida al transcurrir los días, se aprecia claramente que, en general, cuanto más lejos del día de la cirugía se encuentre la radiografía, mayor será el porcentaje de mineralización del callo.

Algunos datos del estudio se salen de la evolución general. Debido a que este proyecto está basado en datos experimentales, se supone lógico admitir que estas desviaciones de la norma habitual sean consideradas normales, ya que existen muchos factores externos al cálculo realizado en este proyecto, como puede ser la calidad de la radiografía.

Estos resultados, extraídos del estudio realizado, se analizarán en el siguiente capítulo.

5 Discusión

Durante este capítulo se analizarán los resultados mostrados en el capítulo anterior, manteniendo, como en el resto de este documento, la separación existente entre ambas vertientes de estudio. Además se compararán los resultados obtenidos con los datos preexistentes en la bibliografía. Posteriormente se establecerán unas conclusiones, limitaciones del proyecto y posibles investigaciones futuras.

5.1 Análisis de los resultados

5.1.1 Análisis de los resultados de las micrografías

Para un mejor análisis de los resultados obtenidos, se ha añadido una referencia, correspondiente al hueso cortical de control, que permanecerá constante durante todo el proceso. En las figuras 5.1, 5.2 y 5.3, se muestra la aproximación de este interpolante y la referencia.

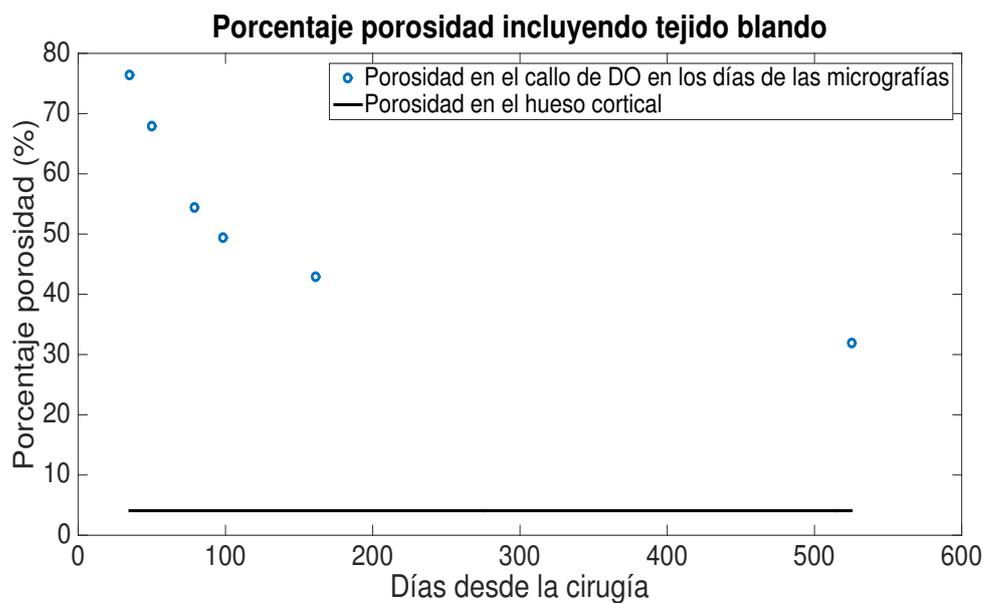


Figura 5.1 Gráfica del avance de la porosidad en el callo de distracción ósea computando el tejido blando.

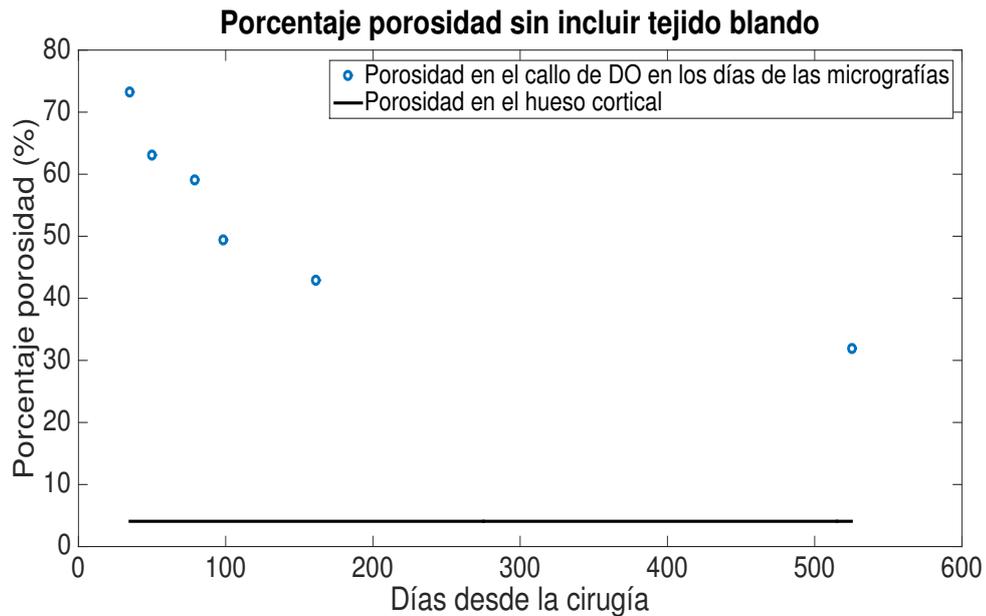


Figura 5.2 Gráfica del avance de la porosidad en el callo de distracción ósea sin computar el tejido blando.

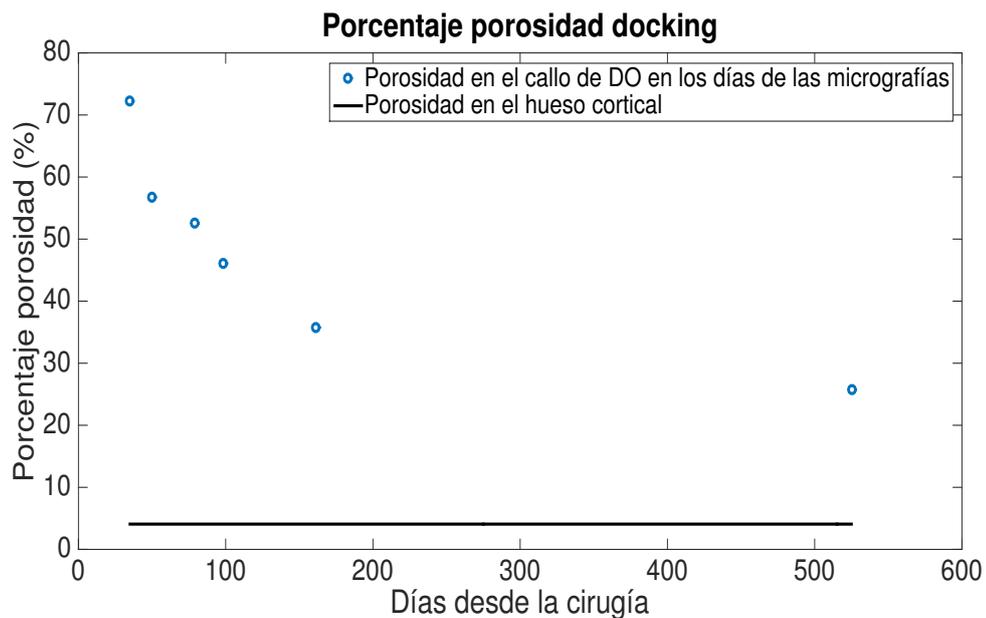


Figura 5.3 Gráfica del avance de la porosidad en el *docking*.

Como se observa en las figuras 5.1, 5.2 y 5.3, la porosidad va disminuyendo hasta aproximarse al valor de referencia, con una disminución de la porosidad considerable en los primeros días tras la cirugía (hasta la micrografía correspondiente al día 161) y posteriormente un avance más lento pero continuo de la disminución de la porosidad. Se podría considerar un avance exponencial en función del paso del tiempo. Para el caso en el que no se incluye tejido blando (ver figura 5.2), la relación exponencial es incluso más plausible.

En la figura 5.4 se han representado todos los datos de las micrografías juntos en una sola gráfica. Se aprecia que los resultados de porosidad son muy similares entre sí, ya sea comparando el caso de estudio que

incluye el tejido blando como poro con el caso que no lo incluye así como las comparaciones entre los dos casos comentados y el estudio del *docking*. El caso del *docking* en el que se obtiene un menor porcentaje de porosidad desde el inicio del estudio. La porosidad en el *docking* en los primeros días de estudio es más cercana al caso en el que no se computa el tejido blando que al correspondiente al cómputo del tejido blando.

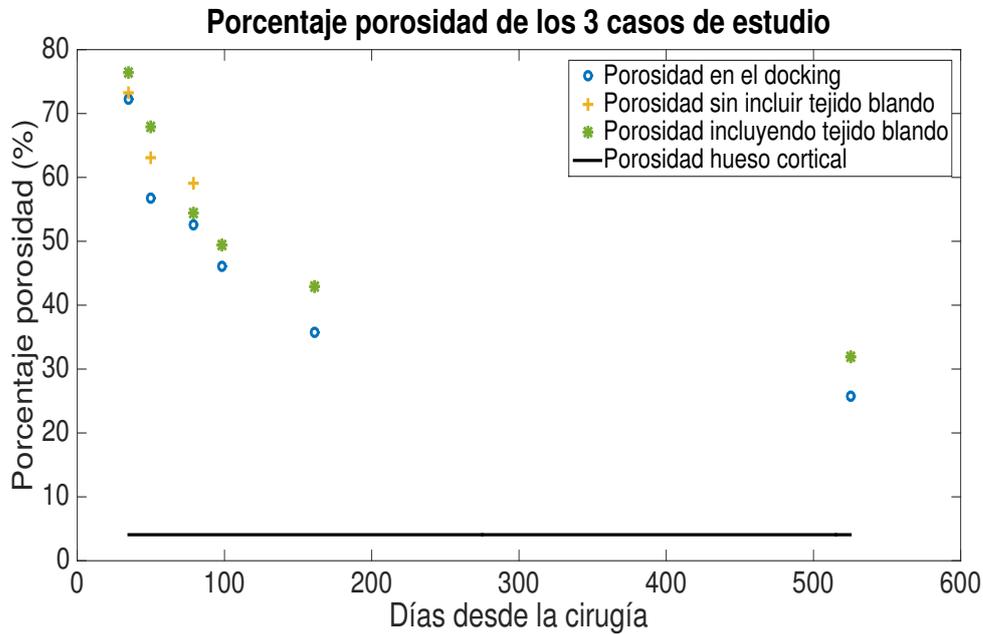


Figura 5.4 Gráfica conjunta del avance de la porosidad en el callo de distracción ósea .

En la figura 5.5, se muestran las micrografías originales, las imágenes transformadas a blanco y negro y un mapa de colores de estas micrografías para los días 35, 161 y 525.

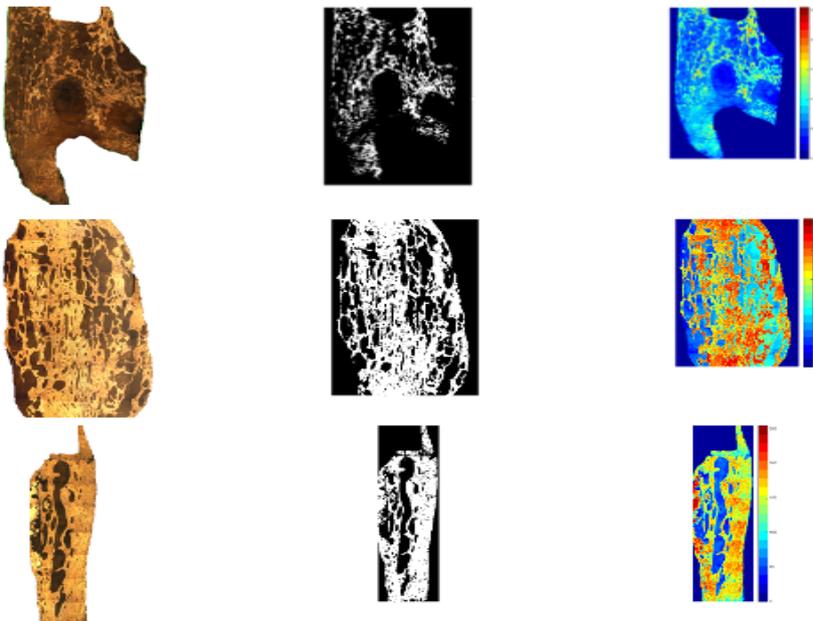


Figura 5.5 Gráfica del avance de la porosidad en el callo de distracción ósea computando el tejido blando.

Gracias al mapa de colores incluido en la figura 5.5, se puede apreciar sin dificultad la disminución considerable de poros a través del tiempo. Los tonos fríos, azules y verdes claros, representan los poros de la imagen mientras que los tonos cálidos representan el tejido óseo. Se aprecia sin dificultad que en el caso de la micrografía correspondiente a 35 días desde la cirugía, predominan los colores fríos, es decir, un alto número de poros (que implica una alta porosidad), mientras que en el caso de la micrografía correspondiente a 525 días desde la cirugía, predominan los tonos cálidos, es decir, un bajo porcentaje de porosidad.

En la bibliografía existente, se utiliza como dato constante para la porosidad del hueso inmaduro un 80%. Como se puede apreciar en las figuras 5.1, 5.2 y 5.3, El valor inicial de la porosidad, correspondiente al día 35 después de la operación, se encuentra en todos los casos entre el 70 y el 80%. Sin embargo a medida que se avanza en el proceso el porcentaje de porosidad disminuye considerablemente, sobre todo en los primeros días de estudio. Es decir, en los días próximos a la cirugía, cuando comienza a formarse el nuevo tejido óseo, la porosidad calculada en este trabajo se asemeja a la estimada en estudios anteriores pero al alejarse de la cirugía inicial esta estimación distaría mucho de los resultados obtenidos y dejaría de ser válida según los resultados obtenidos.

Para verificar los cálculos realizados para la porosidad, se ha utilizado el mismo método para calcular el porcentaje de porosidad existente en el hueso cortical de cada una de las ovejas de las que se han obtenido las micrografías. En la tabla 5.1 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las micrografías del hueso cortical.

Tabla 5.1 Porcentajes de porosidad en el hueso cortical de los objetos de estudio correspondientes a las micrografías.

Días desde la cirugía	Porcentaje de porosidad
35 días	1.935%
50 días	6.838%
79 días	2.1052%
98 días	1.974%
161 días	9.098%
525 días	2.488%
Media Cortical	4.073%

En la bibliografía mencionada en el capítulo de introducción, el porcentaje de porosidad aceptado para el hueso cortical es <10%. Como puede observarse en la tabla 5.1, todos los porcentajes de porosidad calculados se encuentran por debajo del 10% e incluso en la mayoría de los casos por debajo de 5%. Es decir, los resultados obtenidos se asemejan a los estudios realizados con anterioridad.

Respecto al tamaño de los poros en un área determinada con anterioridad, igualmente situada para todas las micrografías, se han representado los valores presentados en una tabla en el apartado anterior en la figura 5.6 para una mejor interpretación de los resultados.

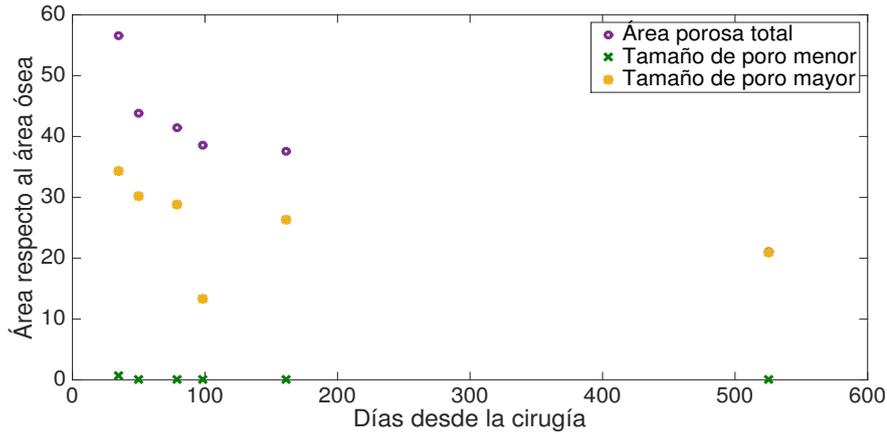


Figura 5.6 Tamaño mínimo y máximo de poro así como porcentaje de porosidad en un área determinada.

Se observa con claridad (figura 5.6) que el porcentaje de porosidad en ese área determinada sigue una tendencia similar a la que sigue el porcentaje de porosidad en la micrografía completa a través del tiempo. Sin embargo, al observar el tamaño máximo y mínimo de poro, aparece un aumento del mismo entre las micrografías correspondientes a los días 98 y 161. Durante la creación del tejido óseo, la porosidad en el hueso inmaduro no es homogénea, variando la posición, cantidad y tamaño de los poros en el tiempo. A partir de un punto del proceso de curación, los poros del tejido óseo inmaduro se van reagrupando para posteriormente ser reabsorbidos. Se podría considerar este proceso como la causa del aumento del tamaño máximo y mínimo de poro entre los días 98 y 161, ya que si comparamos estos mismos datos para los días 161 y 525 se observa que vuelven a descender en tamaño los poros.

Para comprobar si existe una correlación entre la porosidad y la rigidez del callo de distracción se muestran juntas ambas gráficas en la figura 5.7.

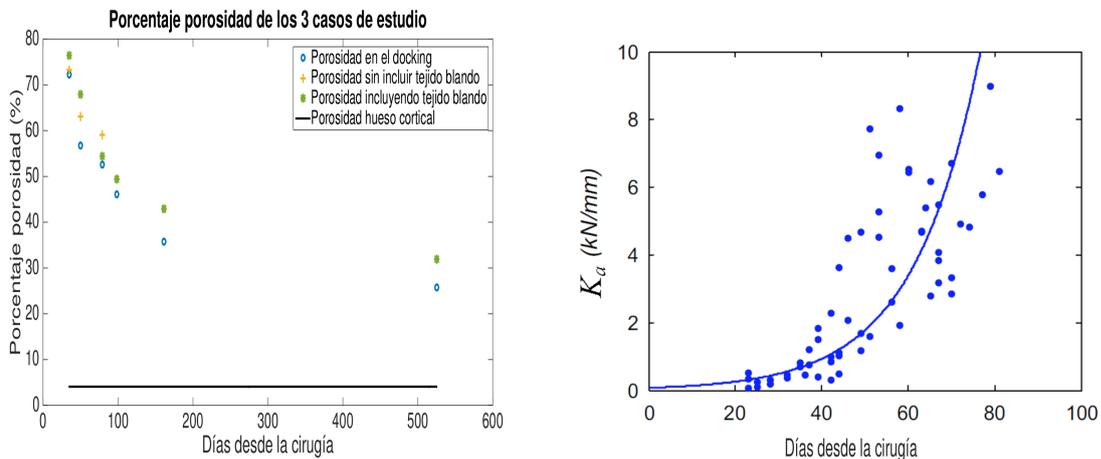


Figura 5.7 Comparativa entre la evolución de la porosidad y la rigidez en el callo de distracción ósea..

Como se observa en la figura 5.7, existe una correlación inversa entre la porosidad y la rigidez del callo de distracción ósea. A medida que avanzan los días desde la cirugía inicial, la porosidad va disminuyendo y la rigidez va aumentando, por tanto, como ya se ha comprobado en estudios anteriores, a mayor porosidad menor rigidez y viceversa.

5.1.2 Análisis de los resultados de las radiografías

En base a los resultados de la mineralización, obtenidos del estudio de las radiografías, se puede afirmar que, a medida que se alejan las radiografías de la cirugía inicial, la mineralización del callo de distracción va aumentando. La evolución se muestra en las figuras 5.8, 5.9 y 5.10.

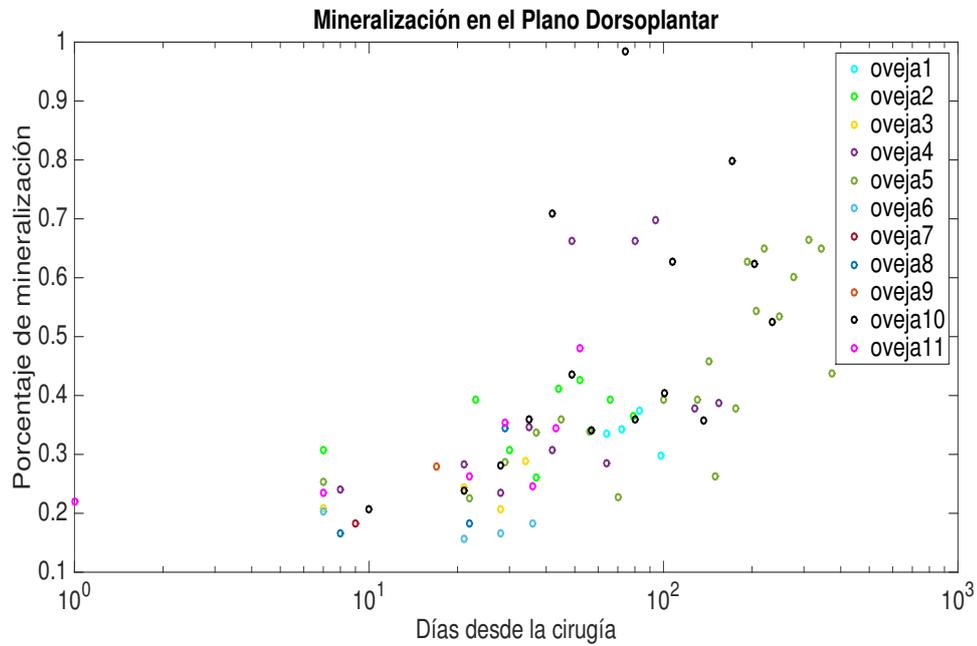


Figura 5.8 Gráfica del avance de la mineralización en el callo de distracción ósea para el plano dorsoplantar.

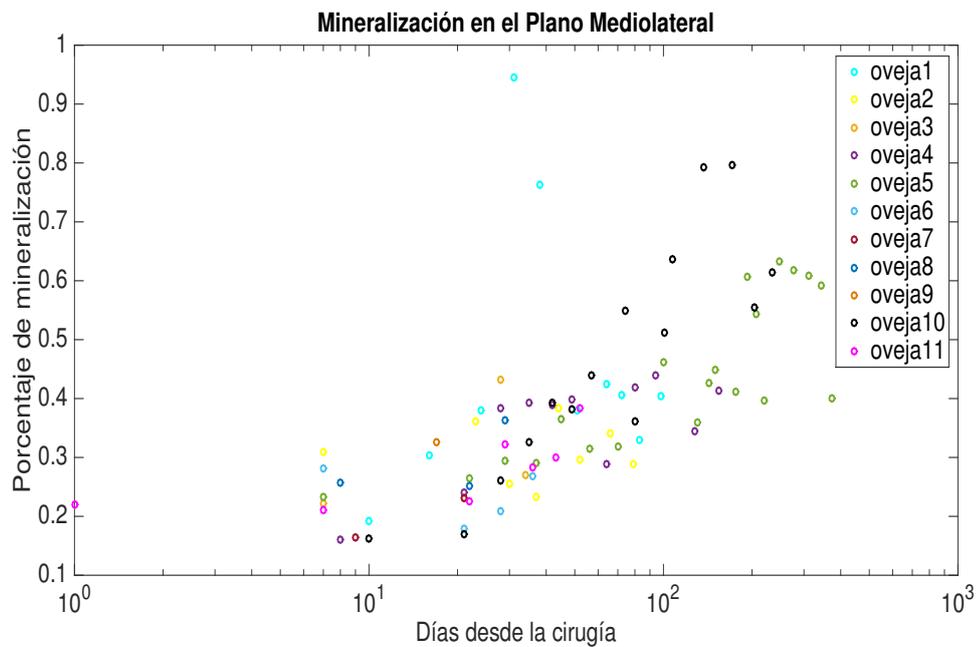


Figura 5.9 Gráfica del avance de la mineralización en el callo de distracción ósea para el plano mediolateral.

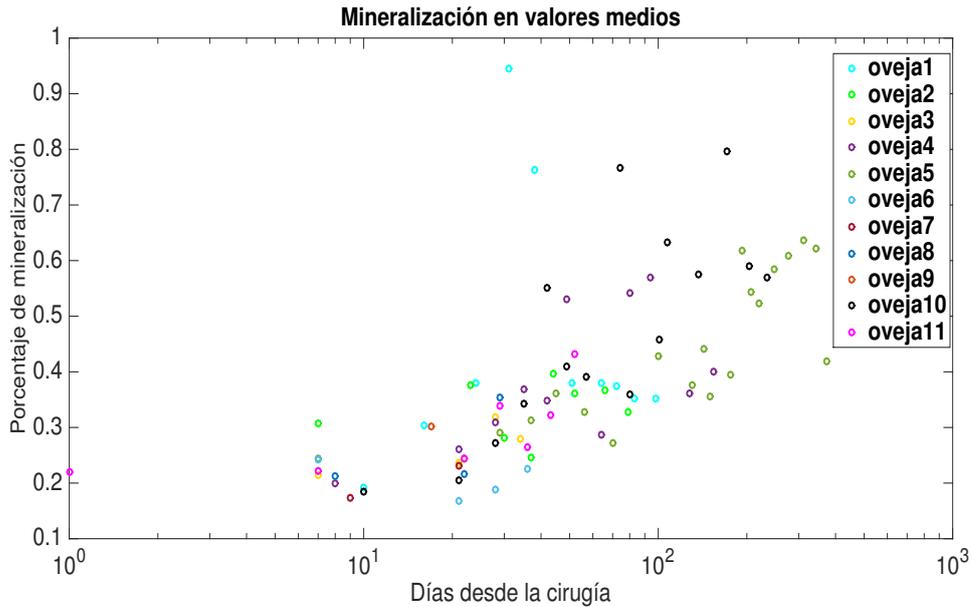


Figura 5.10 Gráfica del avance de la mineralización en el callo de distracción ósea en valores medios.

En los tres casos de estudio (figuras 5.8, 5.9 y 5.10), la mineralización al final del experimento se encuentra entre el 60-80%. El 100% de mineralización implicaría que el hueso de estudio está total y uniformemente mineralizado. Teniendo en cuenta que el hueso cortical no es uniforme en sí mismo ni está compuesto sólo por calcio, un porcentaje de 60-80% de mineralización en el callo de distracción implica un grado de mineral bastante cercano al grado de mineral en el hueso cortical. Como se ha comentado en el capítulo anterior, algunos resultados del estudio se separan de la tendencia general de los datos. Los motivos de estas perturbaciones en los resultados son diversos y al tratarse de un estudio sobre un proyecto experimental anterior, el obtener estas desviaciones es usual.

La evolución del nivel de gris, en el callo de distracción, de las radiografías a través del tiempo se ha representado en las figuras 5.11 y 5.12, mediante histogramas para una mejor interpretación de los datos obtenidos

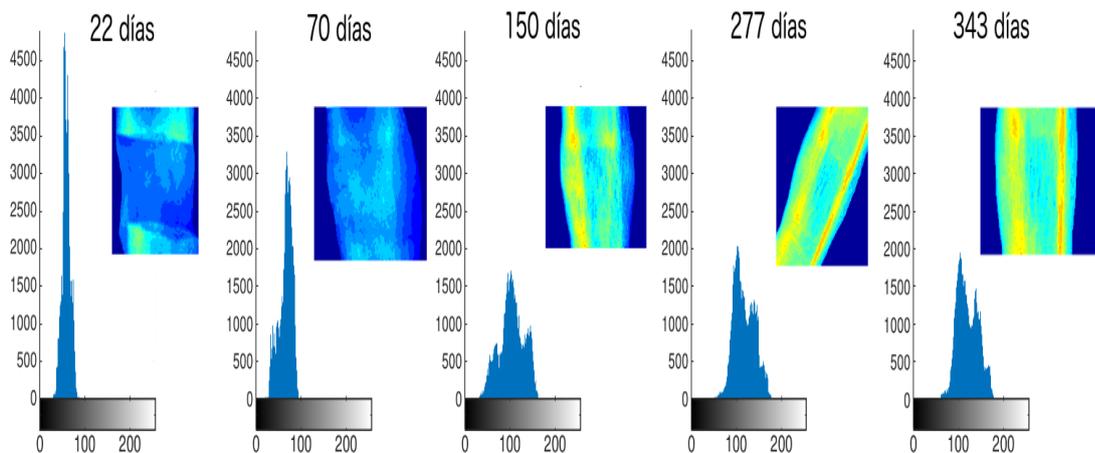


Figura 5.11 Histogramas de diversos días desde la cirugía para la oveja 5 junto con el mapa de colores de la radiografía.

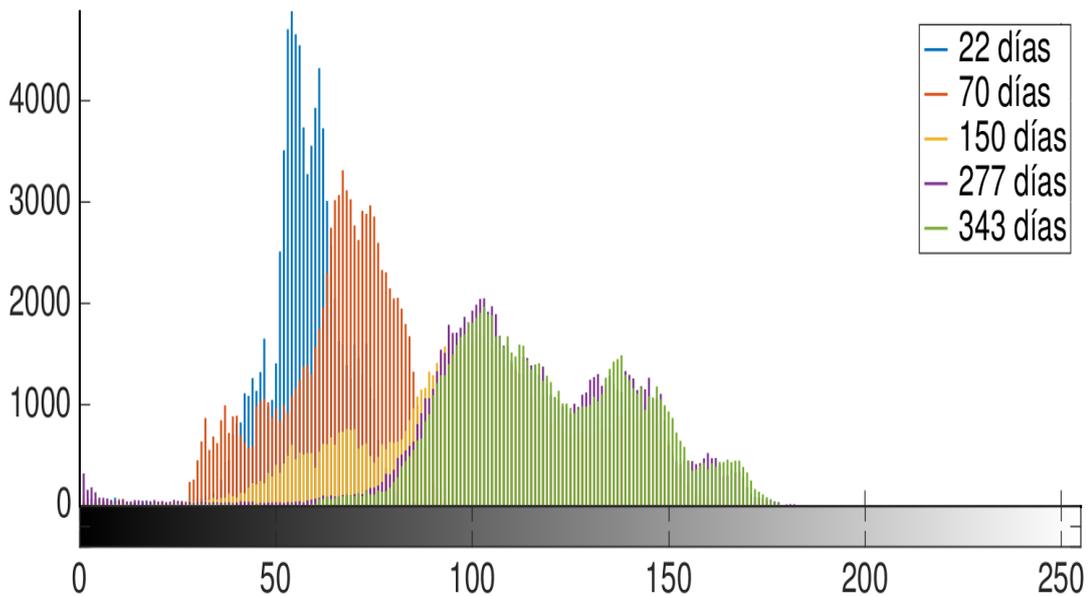


Figura 5.12 Histograma conjunto para varios días del callo de distracción para la oveja 5.

Como puede observarse en la figura 5.11, donde el eje OX representa el nivel de gris y el eje OY el número de elementos que tienen el nivel de gris correspondiente, a medida que avanzan los días desde la cirugía, el número de elementos con un valor de gris cercano a 0, es decir, negro, va disminuyendo, aumentando a su vez el número de elementos con valores de gris cercanos a 255, es decir, blanco. Cuantos más píxeles tengan valores cercanos a 255 mayor será la mineralización del callo de distracción. Así mismo, los mapas de colores que se encuentran junto a los histogramas muestran la misma evolución hacia una mineralización casi idéntica al hueso cortical.

La evolución de los valores de los píxeles de las radiografías correspondientes a los días 22, 70, 150, 277 y 343, ha sido representada en la figura 5.12 de manera conjunta para una mejor apreciación de la variación del valor de gris. En dicha figura se observa claramente la tendencia comentada con anterioridad en este apartado.

En las figuras 5.13 y 5.14, se muestran el grado de mineralización junto a la rigidez a través del tiempo y el grado de mineralización junto a la porosidad a través del tiempo.

En la figura 5.13, se observa como aumentan ambas variables en el proceso de curación, mientras que en la figura 5.14, se aprecia una relación inversa entre la porosidad y el grado de mineralización del callo de distracción ósea. Sin embargo, no se puede extraer de estas gráficas una relación directa entre la disminución de la porosidad y el aumento de la mineralización.

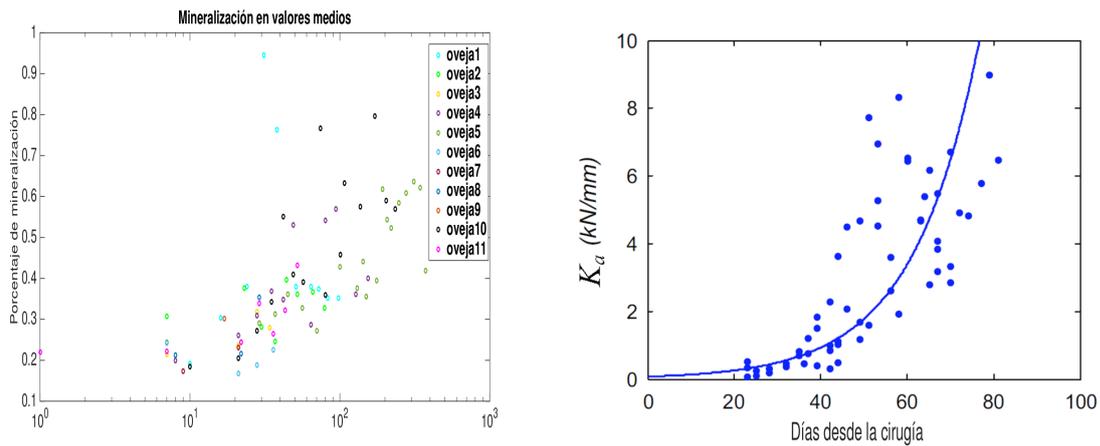


Figura 5.13 Comparativa entre la evolución de la mineralización y la rigidez en el callo de distracción ósea.

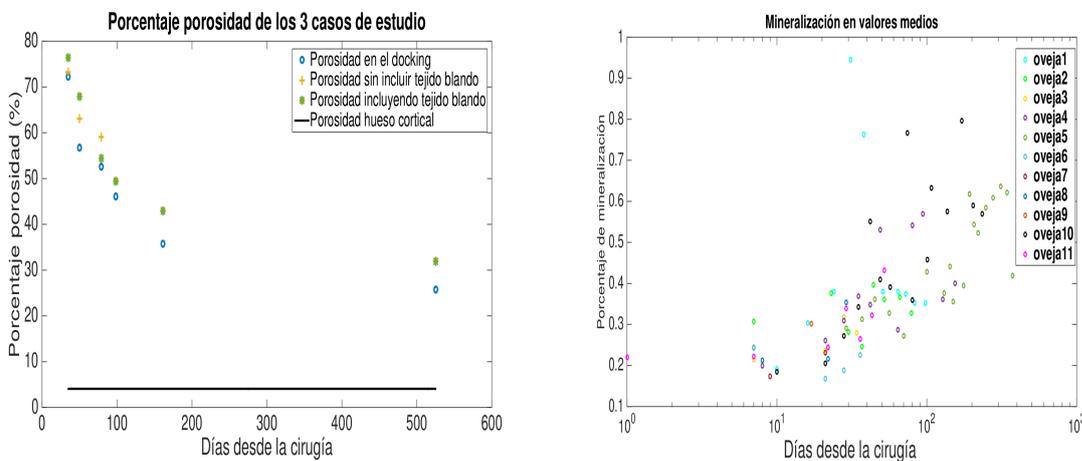


Figura 5.14 Comparativa entre la evolución de la porosidad y la mineralización en el callo de distracción ósea.

5.2 Conclusiones

Como conclusiones al estudio realizado en este proyecto:

- Con el procesamiento de imágenes para el estudio de la porosidad en micrografías del callo de distracción se han obtenido resultados que se pueden validar con los datos de la bibliografía y por tanto se puede establecer una evolución de la porosidad en el hueso inmaduro durante el proceso de curación en los tres casos de estudio.
- Se ha comprobado la existencia de una correlación negativa entre la porosidad y la rigidez del callo de distracción ósea.
- La evolución del tamaño de poro en una zona determinada con anterioridad puede considerarse lógica y se asemeja a la evolución seguida por la porosidad total de las micrografías.

- El grado de mineralización del callo de distracción osteogénica sigue una evolución esperable a través del tiempo.
- La rigidez y el grado de mineralización tienen una evolución positiva en el tiempo tras la cirugía.
- La mineralización y la porosidad son inversamente proporcionales en el proceso de curación.

5.3 Limitaciones del proyecto

Los resultados de este proyecto están sujetos a una serie de limitaciones:

- El estudio realizado se ha desarrollado en 2D. Esto conlleva que la porosidad obtenida será mayor que en un estudio 3D ya que, si se considera un área de 2x2 píxeles para un poro en una matriz bidimensional de 10x10 píxeles se obtendría una porosidad del 4% y realizando la misma aproximación para el caso tridimensional se encontraría un volumen poroso de 2x2x2 píxeles en una matriz de 10x10x10 que implicaría una porosidad del 0.8%.
- El proceso por el que se han obtenido las imágenes analizadas. Poco a poco van apareciendo métodos más precisos que permiten una calidad mayor de las micrografías y las radiografías, que permitiría a su vez un estudio más detallado de la porosidad y la mineralización del hueso inmaduro.

5.4 Líneas de trabajo futuras

El desarrollo de este proyecto así como los resultados obtenidos, permiten continuar el estudio del callo de distracción ósea en diversos campos como puede ser:

- Calcular la porosidad y la mineralización en un estudio 3D.
- Correlacionar los resultados obtenidos con nuevos resultados de otras magnitudes del callo de distracción o del *docking*.

6 Referencias

Aarnes, T., Steen, H., Ludvigsen, P., Waanders, N.A., Huiskes, R., and Goldstein, S.A. (2005). In vivo assessment of regenerate axial stiffness in distraction osteogenesis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 23(2):494-498.

Adams, M. A., Burton, K., Bogduk, N. & Dolan, P. (2006). *The Biomechanics of Back Pain*. Elsevier Health Sciences, ISBN 0443100683.

Augat, P., Merk, J., Genant, H. K., and Claes, L. (1997) Quantitative assessment of experimental fracture repair by peripheral computed tomography. *Calcified tissue international*, 60(2):194-9.

Aronson, J. (1993). Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res*. 301, 124-131.

Aronson, J. (1994). Experimental and clinical experience with distraction osteogenesis. *Cleft Palate Craniofac J*. 31, 473-81.

Aronson, J., Harrison, B. H., Stewart, C. L., and Harp Jr., J. A. (1989). The histology of distraction osteogenesis using different external fixators. *Clinical orthopaedics and related research*, (241)(241):106-116.

Aronson, J. & Shen, X. (1994). Experimental healing of distraction osteogenesis comparing metaphyseal and diaphyseal sites. *Clin Orthop Rel Res*. 301, 25-30.

Aronson, J., Shen, X. C., Skinner, R. A., Hogue, W. R., Badger, T. M., and Lumpkin Jr., C. K. (1997). Rat model of distraction osteogenesis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 15(2):221-226.

Baur, Dale A; Helman, Joseph; Rodriguez, Juan Carlos; Altay, Mehmet Ali (March 8, 2016). Meyers, Arlen D, ed. "Distraction Osteogenesis of the Mandible". *Medscape Emedicine Drugs and Diseases*. Retrieved 31 October 2016.

Burke DP, Kelly DJ. Substrate stiffness and oxygen as regulators of stem cell differentiation during skeletal tissue regeneration: a mechanobiological model. *PLoS One* 2012, 7:e40737.

Claes, L., Augat, P., Schorlemmer, S., Konrads, C., Ignatius, A., and Ehrnthaller, C. (2008). Temporary distraction and compression of a diaphyseal osteotomy accelerates bone healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 26(6):772-7. Claes, L., Veeseer, A., Göckelmann, M., Horvath, D., Dürselen, L., Ignatius, A. (2010). A novel method for lateral callus distraction and its importance for the mechano-biology of bone formation. *Bone*, 47:712-7

- Cooper, D.M.L., Matyas, J.R., Katzenberg, M.A., Hallgrimson, B., 2004. Comparison of microcomputed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. *Calcif. Tissue Int.* 74, 437-447.
- Codivilla, A. (1905). On the means of lengthening, in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Am J Orthop Surg.* 2, 353.
- Cowin, S.C., 1999. Bone poroelasticity. *J. Biomech.* 32, 217-238.
- Currey JD. Changes in the impact energy absorption of bone with age. *J Biomech.* 1979;12:459-69.
- Currey JD. The effect of porosity and mineral content on the Young's modulus of elasticity of compact bone. *J Biomech.* 1988;21(2):131-9.
- Currey J. Incompatible mechanical properties in compact bone. *J Theor Biol.* 2004;231(4):569-80. .
- Currey, J., Shahar, R. (2013). Cavities in the compact bone in tetrapods and fish and their effect on mechanical properties. *J. of Structural Biology* 183, 107-122.
- de Pablos Jr., J., and Canadell, J. (1990). Experimental physal distraction in immature sheep. *Clinical orthopaedics and related research*, (250)(250):73-80.
- Delloye, C., Delefortrie, G., Coutelier, L. & Vincent, A. (1990). Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening: an experimental study. *Clin Orthop.* 250, 34-42.
- Dwyer, J. S., Owen, P. J., Evans, G. A., Kuiper, J. H., and Richardson, J. B. (1996). Stiffness measurements to assess healing during leg lengthening. A preliminary report. *The Journal of bone and joint surgery.* British volume, 78(2):286-289.
- Ebacher, V., Guy, P., Oxland, T.R., Wang, R., 2012. Sub-lamellar microcracking and roles of canaliculi in human cortical bone. *Acta Biomater.* 8, 1093-1100.
- Floerkemeier, T., Thorey, F., Hurschler, C., Wellmann, M., Witte, F., and Windhagen, H. (2010). Stiffness of callus tissue during distraction osteogenesis. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*, 96(2):155-160.
- Forriol, F., Denaro, L., Longo, U. G., Taira, H., Maffulli, N., and Denaro, V. (2010). Bone lengthening osteogenesis, a combination of intramembranous and endochondral ossification: an experimental study in sheep. *Strategies in trauma and limb reconstruction (Online)*, 5(2):71-78.
- Frost, H.M., 1960. Measurement of osteocytes per unit volume and volume components of osteocytes and canaliculi in man. *Henry Ford Hosp. Med. Bull.* 8, 208-211.
- Gong, J.K., Arnold, J.S., Cohn, S.H. The density of organic and volatile and non-volatile inorganic components of bone. *Anat. Rec.* 1964;149:319-324.
- Götzens, C., Castelló, A., Genovard, C. & Badia, M. (2003). Percepciones de profesores y alumnos de ESO sobre la disciplina en el aula. *Psicothema*, 15(3), 362-368.
- Granke, M., Makowski, A.J., Uppuganti, S., and Nyman, J.S. (2016). Prevalent role of porosity and osteonal area over mineralization heterogeneity in the fracture toughness of human cortical bone. *J. Biomechanics* 49, 2748-2755.
- Green, S. A. (1991). The Ilizarov method: Rancho technique. *Orthop Clin North Am.* 22, 677-88. 56
- Green, S. A., Harris, N. L., Wall, D. M., Ishkanian, J. & Marinow, H. (1992). The Rancho mounting technique for the Ilizarov method. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res.* 280, 104-16.
- Hatze, Herbert (1974). "The meaning of the term biomechanics". *Journal of Biomechanics.* 7 (12): 189-190.

Holbein, O., Neidlinger-Wilke, C., Suger, G., Kinzl, L. & Claes, L. (1995). Ilizarov callus distraction produces systemic bone cell mitogens. *J Orthop Res.* 13, 629-38.

Ilizarov, G. A. (1971). Basic principles of transosseous compression and distraction osteosynthesis. *Ortop Travmatol Protez.* 32, 7-15.

Ilizarov, G. A. (1988). The principles of the Ilizarov method. *Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst.* 48, 1.

Ilizarov, G. A. (1989a). The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I: the influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop.* 238, 249-81.

Ilizarov, G. A. (1989b). The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part II: the influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop.* 239, 263-85.

Ilizarov, G. A. (1990). Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res.* 250, 8-26.

Ilizarov, G. A. & Gracheva, V. I. (1971). Bloodless treatment of congenital pseudoarthrosis of the crus with simultaneous elimination of shortening using dosed distraction. *Orthop Traumatol Protez.* 32, 42-6.

Isaksson H, Comas O, van Donkelaar CC, Mediavilla J, Wilson W, Huiskes R, Ito K. Bone regeneration during distraction osteogenesis: mechano-regulation by shear strain and fluid velocity. *J Biomech* 2007, 40:2002?2011.

Kallio, T. J., Vauhkonen, M. V., Peltonen, J. I. & Karaharju, E. O. (1994). Early bone matrix formation during distraction. A biochemical study in sheep. *Acta Orthop Scand.* 65, 46771.

Kaplan, F. S., Hayes, W. C., Keaveny, T. M., A., B., Einhorn, T. A. & Iannotti, J. P. (1994). Form and function of bone, in *Orthopaedic Basic Science*". American Academy of Orthopaedic Surgeons, Columbus, Ohio.

Kojimoto, H., Yasui, N., Goto, T., Matsuda, S., and Shimomura, Y.(1988). Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *The Journal of bone and joint surgery.* British volume, 70(4):543?549.

Krawczyk, A., Kuryszko, J., Wall, A., Dragan, S., Kulej, M. (2007). Experimental studies on the effect of osteotomy technique on the bone regeneration in distraction osteogenesis. *Bone,* (40):11.

Jazrawi, LM., Majeska, RJ., Klein, ML., Kagel, E. (1998). Bone and cartilage formation in an experimental model of distraction osteogenesis. *Journal of Orthopaedic Trauma,* 12(2):111-6.

Lacroix D, Prendergast P. A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading. *J Biomech* 2002, 35:1163?1171.

Lanyon, L. E. (1987). Functional strain in bone tissue as an objective, and controlling stimulus for adaptive bone remodelling. *J Biomech.* 20, 1083-93.

Leong PL, Morgan EF. Correlations between indentation modulus and mineral density in bone-fracture calluses. *Integr Comp Biol.* 2009; 49: 59-68.

Li, G., Simpson, AHRW., Kenwright, J., Triffitt, JT. (1999) Effect of lengthening rate on angiogenesis during distraction osteogenesis. *Journal of Orthopaedic Research,* 17(3):362-7.

Manjubala I, Liu Y, Epari DR, Roschger P, Schell H, Fratzl P, Duda GN. Spatial and temporal variations of mechanical properties and mineral content of the external callus during bone healing. *Bone.* 2009; 45(2): 185-92.

Martin B., Ishida, J.(1989). The relative effects of collagen fiber orientation, porosity, density and mineralization on bone strength. *J. Biomechanics* Vol. 22, No. 5, pp. 419-426.

Martin, B., 1993. Aging and strength of bone as a structural material. *Calcified Tissue International* 53, S34?39; discussion S39?40.

McCalden, R.W., McGeough, J.A., Barker, M.B., Court-Brown, C.M., 1993. Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure. *Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 75, 1193?1205.

Mizuta, H., Nakamura, E., Mizumoto, Y., Kudo, S., Takagi, K. (2003). Effect of distraction frequency on bone formation during bone lengthening. A study in chickens. *Acta Orthopædica Scandinava*, 74(6):709-13.

Mora-Macías, J., Reina-Romo, E and Domínguez, J. (2015a). Distraction device to estimate the axial stiffness of the callus in vivo. *Med. Eng. Phys.* 37, 969?978.

Mora-Macías, J., Reina-Romo, E., López-Pliego, M., Giráldez-Sánchez, M. A., and Domínguez, J. (2015b). In Vivo Mechanical Characterization of the Distraction Callus During Bone Consolidation. *Annals of biomedical engineering*. 43, 2663?2674.

Mora-Macías, J., Reina-Romo, E., Morgaz, J., and Domínguez, J. (2015c). In vivo gait analysis during bone transport. *Annals of Biomedical Engineering*, 43 (9), 2090?2100.

Mora-Macías J, Pajares A, Miranda P, Domínguez J, Reina-Romo E. Mechanical characterization via nanoindentation of the woven bone developed during bone transport. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017; 74: 236-244

Mosheiff, R., Cordey, J., Rahn, B. A., Perren, S. M. & Stein, H. (1996). The vascular supply to bone in distraction osteoneogenesis: an experimental study. *J Bone Joint Surg Br*. 78, 4978.

Murray, J. H. (1996). Distraction histiogenesis: principles and indications. *J Am Acad Orthop Surg*. 4, 317-327.

Ohyama, M., Miyasaka, Y., Sakurai, M., Yokobori Jr, A. M., and Sasaki, S. (1994). The mechanical behavior and morphological structure of callus in experimental callotaxis. *Bio-medical materials and engineering*, 4(4):273?281.

Okazaki, H., Kurokawa, T., Nakamura, K., Matsushita, T., Mamada, K., and Kawaguchi, H. (1999). Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotaxis bone lengthening of rabbits. *Calcified tissue international*, 64(6):542?546.

Patel, Pravin K; Zhao, Linping; Ellis, Marco F (January 6, 2015). de la Torre, Jorge I, ed. "Distraction Osteogenesis: Background, History of the Procedure, Pathophysiology". *Medscape Emedicine: Drugs and Diseases*.

Pietrzak, W. S. (2008). *Musculoskeletal Tissue Regeneration: Biological Materials and Methods*. Humana Press, ISBN 1588299090.

Renders, G.A.P., Mulder, L., van Ruijven, L.J. y van Eijden, T.M.G.J. (2007). Porosity of human mandibular condylar bone. *J. Anat.* 210, pp239-248.

Richards, M., Goulet, J. A., Schaffler, M. B., and Goldstein, S. A. (1999). Temporal and spatial characterization of regenerate bone in the lengthened rabbit tibia. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 14(11):1978?1986.

Riddle, R. C. & Donahue, H. J. (2009). From streaming-potentials to shear stress: 25 years of bone cell mechanotransduction. *J Orthop Res*. 27, 143-9.

Robling, A. G., Castillo, A. B. & Turner, C. H. (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 8, 455-98.

Roschger P, Fratzl P, Eschberger J, Klaushofer K. Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. *Bone* 1998;23:319-26.

Rossini, G; Vinci, B; Rizzo, R; Pinho, TM; Deregibus, A (November 2016). "Mandibular distraction osteogenesis: a systematic review of stability and the effects on hard and soft tissues.". *International journal of oral and maxillofacial surgery.* 45 (11): 1438-1444.

Samchukov, M. L., Cope, J. B. & Cherkashin Mosby, A. M. (2001). *Craniofacial Distraction Osteogenesis*. Heidelberg: Springer-Verlag. Inc. St. Louis. 22-23.

Schaffler, M.B., Burr, D.B., 1988. Stiffness of compact bone: effects of porosity and density. *Journal of Biomechanics* 21, 13-16.

Seaward, James; Kane, Alex (2013). "Distraction Osteogenesis". In Kountakis, Stilianos E. *Encyclopedia of Otolaryngology, Head and Neck Surgery*. Springer. pp. 700-710. ISBN 978-3-642-23499-6.

Sencimen, M., Auydintug, YS., Ortakoglu, K., Karlioglu, Y., Gunhan, O., Gunaydin, Y. (2007). Histomorphometrical analysis of new bone obtained by distraction osteogenesis and osteogenesis by periosteal distraction in rabbits. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 36:235-42.

Shefelbine, S. J., Simon, U., Claes, L., Gold, A., Gabet, A., Bab, I., Müller, R. and Augat, P. (2005). Prediction of fracture callus mechanical properties using micro-CT images and voxel-based finite element analysis. *Bone*, 36(3):480-8.

Shipov, A., Zaslansky, P., Riesemeier, H., Segev, G., Atkins, A., et al., 2013. Unremodeled endochondral bone is a major architectural component of the cortical bone of the rat (*Rattus norvegicus*). *Observaciones sin publicar...*

Voide, R., Schneider, P., Stauber, M., van Lenthe, G.H., Stampanoni, M., et al., 2011. The importance of murine cortical bone microstructure for microcrack initiation and propagation. *Bone* 49, 1186-1193.

Wachter, N.J., Krischak, G.D., Mentzel, M., Sarkar, M.R., Ebinger, T., Kinzl, L., Claes, L., Augat, P., 2002. Correlation of bone mineral density with strength and microstructural parameters of cortical bone in vitro. *Bone* 31, 90-95.

Yasui, N., Kojimoto, H., Shimizu, H. & Shimomura, Y. (1991). The effect of distraction upon bone, muscle and periosteum. *Orthop Clin North Am.* 22, 563-567.

Yasui, N., Kojimoto, H. Sasaki, K., Kitada, A., Shimizu, H. & Shimomura, Y. (1993). Factors affecting callus distraction in limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res.* 293, 55-60.

Ying, J. Y. (2001). *Nanostructured Materials: Applications to Sensors, Electronics, and Passivation Coatings*. Academic Press, ISBN 0127444513.

Índice de Figuras

2.1	Partes del hueso	7
2.2	Proceso de osificación intramembranosa	8
2.3	Proceso de osificación endocondral	9
2.4	Fases de la distracción osteogénica	12
2.5	Distractor de Ilizarov	13
3.1	Proyección Mediolateral de una extremidad inferior	16
3.2	Proyección Dorsoplantar de una extremidad inferior	16
3.3	Zonas diferenciadas de una micrografía	17
3.4	Micrografía correspondiente a 161 días tras la cirugía	18
3.5	Delimitación de la sección del callo en la micrografía correspondiente a 79 días tras la cirugía: a) Micrografía sin modificar, b) Micrografía modificada incluyendo tejido blando, c) Micrografía modificada sin incluir tejido blando.	19
3.6	Delimitación de la sección del callo en la micrografía correspondiente a 161 días tras la cirugía: a) Micrografía sin modificar, b) Micrografía modificada.	19
3.7	Zona seleccionada para el estudio de la evolución de los poros en las micrografías	20
3.8	Proceso seguido de manipulación de las micrografías para el cálculo de la porosidad: a) Micrografía sin modificar; b) Micrografía una vez eliminados bordes y tejido blando; c) Micrografía en escala de grises; d) Micrografía binarizada	20
3.9	Micrografía correspondiente a 161 días tras la cirugía	21
3.10	Micrografía correspondiente a 79 días tras la cirugía incluyendo tejido blando	22
3.11	Micrografía correspondiente a 79 días tras la cirugía sin incluir tejido blando	22
3.12	Micrografía correspondiente al <i>docking</i> 98 días tras la cirugía	23
3.13	Ejemplo de funcionamiento 'bwboundaries'	24
3.14	Proceso seguido para la delimitación de los poros en las micrografías correspondientes a 35 y 525 días después de la cirugía: a) Imagen binarizada; b) Imagen binarizada inversa; c) Imagen binarizada con los poros bordeados	24
3.15	Radiografía de la oveja 1 correspondiente a 64 días tras la cirugía	26
3.16	Zona delimitada para la radiografía de la oveja 1 correspondiente a 64 días tras la cirugía	27
3.17	Media y desviación de los valores de los píxeles para la oveja 1 y radiografía de 51 días en el plano Mediolateral	28
3.18	Media y desviación de los valores de los píxeles para la oveja 1 y radiografía de 98 días para el plano Dorsoplantar	29
4.1	Gráfica del avance de la porosidad en el callo de distracción ósea computando el tejido blando	32
4.2	Gráfica del avance de la porosidad en el callo de distracción ósea sin computar el tejido blando	33
4.3	Gráfica del avance de la porosidad en el <i>docking</i>	34
4.4	Gráfica del avance de la mineralización en el plano Mediolateral	35
4.5	Gráfica del avance de la mineralización en el plano Dorsoplantar	35
4.6	Gráfica de la media de los valores de mineralización para los planos mediolateral y dorsoplantar	36

5.1	Gráfica del avance de la porosidad en el callo de distracción ósea computando el tejido blando	37
5.2	Gráfica del avance de la porosidad en el callo de distracción ósea sin computar el tejido blando	38
5.3	Gráfica del avance de la porosidad en el <i>docking</i>	38
5.4	Gráfica conjunta del avance de la porosidad en el callo de distracción ósea	39
5.5	Gráfica del avance de la porosidad en el callo de distracción ósea computando el tejido blando	39
5.6	Tamaño mínimo y máximo de poro así como porcentaje de porosidad en un área determinada	41
5.7	Comparativa entre la evolución de la porosidad y la rigidez en el callo de distracción ósea.	41
5.8	Gráfica del avance de la mineralización en el callo de distracción ósea para el plano dorsoplantar	42
5.9	Gráfica del avance de la mineralización en el callo de distracción ósea para el plano mediolateral	42
5.10	Gráfica del avance de la mineralización en el callo de distracción ósea en valores medios	43
5.11	Histogramas de diversos días desde la cirugía para la oveja 5 junto con el mapa de colores de la radiografía	43
5.12	Histograma conjunto para varios días del callo de distracción para la oveja 5	44
5.13	Comparativa entre la evolución de la mineralización y la rigidez en el callo de distracción ósea	45
5.14	Comparativa entre la evolución de la porosidad y la mineralización en el callo de distracción ósea	45

Índice de Tablas

3.1	Número de radiografías separadas por ovejas y plano	25
4.1	Porcentajes de porosidad incluyendo tejido blando como poros en el proceso de distracción ósea	31
4.2	Porcentajes de porosidad sin incluir tejido blando como poros en el proceso de distracción ósea	32
4.3	Porcentajes de porosidad en el <i>docking</i>	33
4.4	Tamaño máximo y mínimo de poro así como área porosa total respecto al área ósea total	34
5.1	Porcentajes de porosidad en el hueso cortical de los objetos de estudio correspondientes a las micrografías	40

