



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE CIRURGIA

EFECTO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN LA OSTEOGÉNESIS A DISTRACCIÓN

Memoria presentada por Alberto Hernández Fernández para
la obtención del grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Directores:
Dr. Marius Aguirre i Canyadell
Dr. Joan Nardi Vilardaga

BARCELONA – 2011

Trabajo experimental financiado por el
Fondo de Investigaciones Sanitarias



A mis padres Luis y Juana
A mi hermano Miguel

A Lara

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Marius Aguirre i Canyadell, director de este proyecto. Su ánimo y esfuerzo constante por la investigación y realización de este trabajo han sido un estímulo excepcional. Sus enseñanzas y consejos sobre la investigación y el ejercicio de la Medicina han sido de un valor inestimable. Su amistad es un auténtico privilegio.

Al Dr. Joan Nardi Vilardaga, codirector de este proyecto, Jefe de Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Por el apoyo recibido durante la residencia para la realización de este proyecto.

Al Dr. Martínez Ibáñez, Jefe de Procesos Quirúrgicos del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por el interés mostrado por este trabajo y el apoyo recibido para su realización.

Al Profesor Cañadell, maestro de mi maestro, por haber apoyado la realización de este trabajo prestando su consejo y la colaboración de su laboratorio de Ortopedia Experimental en la Universidad de Navarra.

Al Dr. Roberto Vélez Villa, compañero de residencia y gran amigo, por su ayuda y entrega en la fase experimental, por lo agradable que hizo el trabajo en equipo, por su comprensión y compañía en los momentos difíciles.

Al Dr. Francisco Soldado Carrera, compañero y amigo que me mostró lo que es la investigación en nuestra especialidad.

Al Dr. Ignasi Barber, por su paciencia y tenacidad en la realización del estudio con Tomografía Computerizada.

A la Dra. Amaia Massó, por su colaboración en la fase experimental y el estudio de radiología simple.

A Marta Rosal y Marielee Estevez, veterinarias del Estabulario del Institut d'Recerca del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por su gran trabajo y dedicación, por el respeto y cariño con el que trataban a los animales de experimentación, no sólo expreso mi gratitud sino también mi admiración.

Al Dr. Iñigo Izal y a Purificación Ripalda, del Laboratorio de Ortopedia Experimental de la Universidad de Navarra, por el procesamiento de las piezas y preparación de la histología.

A Merche Fernández, del Quirófano de Cirugía Experimental de la Universidad de Navarra, que desinteresadamente se prestó a ayudarnos y enseñarnos en las primeras fases de este proyecto.

Al Dr. Juan Carlos Saénz, especialista en Anatomía Patológica de aparato locomotor del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Donostia, por su detallado trabajo de estudio de la histología.

A todos mis compañeros del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología, del Hospital Universitario Vall d'Hebron, adjuntos y residentes, por todo lo que aprendí de ellos, por todo lo compartido, por todos los recuerdos de cinco años entre vosotros.

Al Dr. Adolfo López de Munáin neurólogo del Servicio de Neurología de Hospital Donostia e investigador del Centro Bionostia, por su apoyo y haber depositado en mi su confianza.

Al Dr. Enrique Moreno, compañero traumatólogo del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Donostia, por su ayuda en la corrección de este texto, por el interés mostrado en este trabajo y por su consejo.

A Miren Pérez Eguireun, por su inestimable ayuda y consejo en la corrección y estilo del texto.

Al Dr. Mikel González Ruiz de Eguino, Profesor de Economía en la Universidad del País Vasco, amigo mío, por haberme transmitido el entusiasmo por realizar un trabajo de este tipo, por su amistad y buenos consejos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

13

| | |
|--|-----|
| 1. ELONGACIÓN ÓSEA | |
| 1.1. Precedentes de la elongación ósea | 17 |
| 1.2. Técnicas de elongación ósea | 29 |
| 1.3. Osteogénesis a distracción | 32 |
| 1.4. Aspectos biológicos de la osteogénesis a distracción | 38 |
| 1.5. Complicaciones de la osteogénesis a distracción | 44 |
| 2. OSTEOGÉNESIS | |
| 2.1. Esqueletogénesis: osteogénesis intramembranosa y endocondral | 56 |
| 2.2. Reparación de las fracturas y factores influyentes | 63 |
| 2.3. Injertos óseos, sustitutos de injerto óseo y estimuladores de la osteogénesis | 67 |
| 2.4. Estimulación de la osteogénesis a distracción | 77 |
| 3. PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP) | |
| 3.1. Biología de la plaqueta | 82 |
| 3.2. Factores de crecimiento | 85 |
| 3.3. PRP: conceptos generales y técnicas de obtención | 99 |
| 3.4. Experiencia del PRP en hueso | 106 |
| 3.5. El PRP en la osteogénesis a distracción | 118 |
| 3.6. Evidencia científica actual sobre el PRP: revisiones sistemáticas | 125 |
| 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO | 128 |

| | |
|---|-----|
| 1. MATERIAL | |
| 1.1. Animal | 135 |
| 1.2. Sistema de fijación-distracción | 136 |
| 1.3. Infraestructura del procedimiento quirúrgico | 137 |
| 2. MÉTODO | |
| 2.1. Preoperatorio | 140 |
| 2.2. Anestesia | 141 |
| 2.3. Técnica quirúrgica | 142 |
| 2.4. Postoperatorio inmediato | 148 |
| 2.5. PRP | 149 |
| 2.6. Estudio de radiología simple | 153 |
| 2.7. Procedimientos durante la estabulación | 154 |
| 2.8. Tomografía Computerizada de las piezas | 158 |
| 2.9. Técnica histológica | 159 |
| 2.10. Análisis histomorfométrico | 161 |
| 3. GRUPOS DEL ESTUDIO Y CRITERIOS DE EXCLUSIÓN | 162 |
| 4. EVALUACIÓN DE RESULTADOS | |
| 4.1. Examen clínico | 164 |
| 4.2. Estudio de radiología simple | 164 |
| 4.3. Estudio con Tomografía Computerizada | 166 |
| 4.4. Estudio de histología simple | 169 |
| 4.5. Estudio histomorfométrico | 172 |

| | |
|---|------------|
| RESULTADOS | 175 |
| 1. CONFIGURACIÓN DE LOS GRUPOS | 177 |
| 2. VALIDACIÓN DEL PRP | 180 |
| 3. EXAMEN CLÍNICO | |
| 3.1. Apoyo de la Extremidad | 182 |
| 3.2. Infecciones | 185 |
| 3.3. Complicaciones mecánicas | 187 |
| 4. ESTUDIO DE RADIOLOGÍA SIMPLE | |
| 4.1. Radiología en fase de latencia | 190 |
| 4.2. Radiología en fase de elongación | 192 |
| 4.3. Radiología en fase de consolidación | 196 |
| 5. ESTUDIO CON TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA | |
| 5.1. Estudio morfométrico del fémur | 201 |
| 5.2. Estudio morfométrico del callo de elongación | 205 |
| 5.3. Estudio de densidad ósea del callo de elongación | 215 |
| 6. ESTUDIO DE HISTOLOGÍA SIMPLE | |
| 6.1. Estudio histológico descriptivo del callo | 218 |
| 6.2. Estudio histológico de la madurez del callo | 234 |
| 7. ESTUDIO DE HISTOMORFOMETRÍA | 244 |
| DISCUSIÓN | 247 |
| 1. MODELO EXPERIMENTAL | 249 |
| 2. PROCEDIMIENTOS DEL PRP | 254 |
| 3. EFECTOS DEL PRP EN LA OSTEOGÉNESIS A DISTRACCIÓN | 258 |
| 4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO | 269 |
| CONCLUSIONES | 271 |
| BIBLIOGRAFÍA | 275 |

INTRODUCCIÓN

La regeneración ósea es un aspecto trascendental de diversas patologías osteo-articulares y tratamientos quirúrgicos de la Traumatología y Cirugía Ortopédica.

La osteogénesis a distracción es un proceso biológico, en el que se forma nuevo tejido óseo a partir de la generación de una solución de continuidad en el hueso y posterior tracción de éste en sentidos opuestos mediante un dispositivo mecánico.

La técnica quirúrgica que más se ha valido de la osteogénesis a distracción es la elongación de extremidades, procedimiento que permite restituir o incrementar la longitud de un hueso largo. Es una técnica quirúrgica que puede presentar determinadas complicaciones y que en ocasiones se prolonga en el tiempo. Basándose en la osteogénesis a distracción han nacido otras técnicas como el alargamiento de huesos planos craneofaciales o los transportes óseos empleados en la reparación de defectos postraumáticos, infecciosos o tumorales.

Durante varias décadas los estudios sobre esta materia estuvieron encaminados a dilucidar qué variables mecánicas o qué aspectos técnicos influían positivamente sobre la regeneración del nuevo tejido óseo.

En el momento actual la osteogénesis a distracción sigue planteando cuestiones sin resolver. Las actuales líneas de investigación están encaminadas a dilucidar los factores biológicos y celulares que influyen en esta peculiar forma de generar tejido óseo. Se han ensayado varios agentes biológicos para su estimulación.

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) está presente desde hace algunos años en la comunidad médica de distintas especialidades médico-quirúrgicas. Su disponibilidad, fácil obtención, origen autólogo y bajo coste han generalizado su uso en diversos campos y tejidos corporales, como tendinoso, ligamento periodontal, cartílago articular, músculo y hueso, tanto el craneofacial como el de extremidades. Se han publicado numerosos trabajos relacionados con el papel del PRP en la regeneración de diversos tejidos, con diversos resultados.

Ningún estudio experimental ha respondido a si el PRP estimula la formación de tejido óseo durante la osteogénesis a distracción. Consecuentemente, deben realizarse nuevos estudios bien diseñados que respondan a esta cuestión.

1. ELONGACIÓN ÓSEA

1.1. Precedentes de la elongación ósea

La disimetría de extremidades es una patología del aparato locomotor que se ha tratado con una gran variedad de métodos a lo largo de la historia, en ocasiones sin demasiado éxito. Métodos como la implantación subepifisaria de cuerpos extraños, estimulación del periostio, osteotomías de repetición, curetajes y perforaciones, estimulación diatérmica, realización de fístulas arterio-venosas, redistribución de la vascularización ósea o simpnectomías fueron empleados para la elongación de huesos largos. La variabilidad en sus resultados, muchas veces imprevisibles, así como su alta morbilidad llevaron al abandono de muchas de estas técnicas.

En su inicio, el tratamiento de las disimetrías se centraba en las secuelas de poliomielitis, fracturas y complicaciones de heridas de guerra. Los primeros intentos de elongación ósea, con una osteotomía como primer paso, se llevaron a cabo a finales del siglo XIX. Von Langenbeck (1869), Hopkins y Penrose (1889) y Eiselsberg (1897) fueron algunos de los iniciadores de esta técnica (1). El desconocimiento de la biología y la máxima elongación como objetivo llevaron a una serie de fracasos que impidieron la popularización de este método.

El italiano Alessandro Codivilla (1861-1912), director del Instituto Rizzoli (Bologna), fue el iniciador de un tratamiento pionero para las disimetrías mediante elongación de huesos largos (Figura 1). En 1904 describió en Atlantic City su técnica de elongación ósea, que él denominaba “extensión continua”, pese a realizarse en una única fase. El paciente era colocado en decúbito supino en una mesa ortopédica. Un clavo de 5-6 mm se introducía en el calcáneo y a través de él se ejercía una tracción de 25-75 Kg, después de haberse realizado una osteotomía abierta y oblicua del tercio proximal del fémur. La tracción se llevaba a cabo súbitamente y una sola vez, tras lo que se colocaba un yeso desde el tórax a la pierna intervenida (Figura 2).

El procedimiento se podía repetir si se consideraba que la elongación era insuficiente. Llevó a cabo elongaciones de 3 a 8 cm, algunas acompañadas de neuroapraxias del nervio ciático y de otras complicaciones derivadas del dolor no controlado. La gran contribución de Codivilla fue la idea de realizar una tracción transósea

tras la osteotomía, concepto que permitía posteriormente realizar una gran fuerza de tracción y permitió prescindir ulteriormente del soporte externo del yeso.



Figura 1. Alessandro Codivilla (1861-1912).

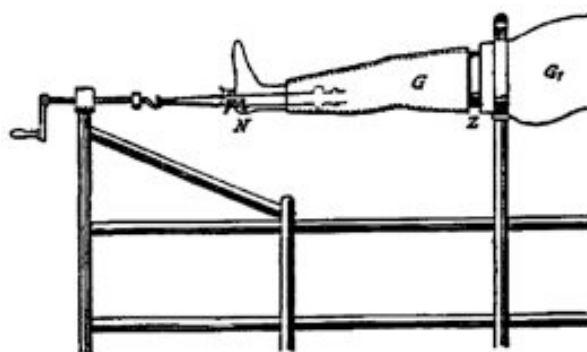


Figura 2. Sistema de tracción transcalcánea y yeso a tracción de Codivilla (1).

Uno de los aspectos que preocupaba a Codivilla era poder superar la resistencia de los tejidos para conseguir la distracción sin comprometer la función fisiológica de la extremidad (2). Durante los siguientes años el método de Codivilla fue difundido y empleado en Europa y América.

En 1911 el francés Oscar Lambret trataba fracturas diafisarias mediante una técnica consistente en tracción y trasfixión de la diáfisis con dos clavos unidos a un dispositivo (1). El trabajo de Albert E. Freiberg (Chicago), publicado en 1912, preconizaba la realización de esta técnica en varias sesiones, para vencer con éxito el acortamiento de las partes blandas, problema que estos cirujanos se encontraban frecuentemente con pacientes afectados de poliomielitis (1).

En 1913 Paul B. Magnusson (Chicago) publicó los resultados de un estudio experimental realizado en perros (3). Llevaba a cabo osteotomías en tibias con elongaciones de 5 a 7,5 cm. La particularidad de estas osteotomías era su forma de Z, llevada a cabo mediante varias perforaciones con una broca. Este autor observó el potencial beneficio de dañar mínimamente el endostio y periostio, así como de conseguir una mayor superficie de contacto óseo para la consolidación de la osteotomía. Este tipo de osteotomía se popularizó entre los cirujanos que realizaban elongaciones óseas.

En 1913 Fred J. Fasset (Seattle) comenzó a usar una variante de estas técnicas. Realizaba una elongación de 3 cm en un solo tiempo, rellenando el espacio de la osteotomía con injerto de hueso y estabilizando la osteotomía con una placa (4). En 1918 comunicó sus resultados, reconociendo una incidencia de complicaciones muy importante en su serie.

En 1916 R. Tustall Taylor (Seattle) comunicó su método de elongación ósea (5). Consistía en la realización de una osteotomía en forma de Z, tras lo que se colocaba un yeso pélvico y de la extremidad intervenida. El yeso era abierto transversalmente, con un dispositivo de varillas roscadas se realizaba distracción mediante la separación de las dos partes del yeso. Solía colocar bloques de magnesio o marfil en el foco de osteotomía. Las complicaciones derivadas de esta técnica, tanto infecciones como pseudoartrosis, inclinaron a este cirujano a la realización de acortamientos de la extremidad más larga.

Vittorio Putti (1880-1940), discípulo de Codivilla en el Instituto Rizzoli (Bologna), desarrolló las ideas de su maestro sobre la elongación ósea (Figura 3) (1,5). En 1921 comunica en Boston varios de sus casos tratados de elongación femoral, destacando la necesidad de realizar una osteotomía lo menos traumática posible y con una técnica de elongación gradual y progresiva. El primer paso de su técnica era la colocación de 1 o 2 clavos proximales y distales a la osteotomía, atravesando dos corticales. Se llevaba a cabo una osteotomía a cielo abierto en forma de Z y se colocaba un tubo telescópico acoplado a los clavos, lateralmente al segmento óseo a elongar. A través de este tubo se realizaban fuerzas de distracción, elongando la osteotomía durante 30 días, unos 2 o 3 mm diarios. Este aparato de elongación fue denominado “Osteotomo” (Figura 4).



Figura 3. V. Putti (1880-1940).

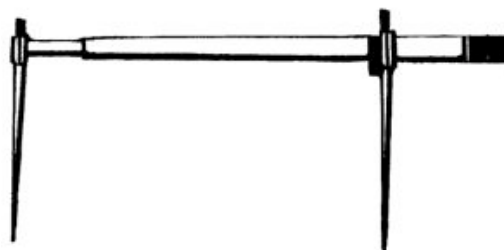


Figura 4. “Osteotomo” de Putti (1).

Tanto el aparato como la técnica de Putti se asemejaban bastante a la empleada en la actualidad con marcos unilaterales. Esta técnica no acabó de gozar de la aceptación de otros colegas cirujanos, la dificultad de este aparato para mantener el control axial de la elongación y la facilidad que tenían los clavos para aflojarse llevaron a Putti a abandonar la técnica.

Entre 1920 y 1930 Klapp y Block desarrollaron en Europa diversos dispositivos de tracción para el tratamiento de fracturas de tibia y fémur. Éstos habían sido alumnos de August Bier (1861-1949), el cual había constatado a principios del siglo XX la

importancia del hematoma como precursor del callo de fractura y de elongación. En esos años comenzó el interés por esta técnica en Estados Unidos de América.

Leroy C. Abbot inició en St. Louis sus estudios para la realización de elongaciones óseas (6). En 1924 llevó a cabo la primera cirugía de elongación ósea. Uno de los aspectos que destacó Abbot fue la necesidad de reequilibrar las partes blandas de la extremidad elongada, gran parte de sus pacientes estaban afectados de poliomielitis y tenían acortamientos de algunos grupos musculares. Los primeros casos intervenidos por él eran tratados con el “osteotomo” de Putti, que posteriormente fue modificado por él mismo al percibir los problemas que presentaba este aparato de fijación unilateral. En el nuevo diseño los clavos eran conectados a ambos lados de la extremidad al sistema telescópico, venciendo la debilidad del sistema unilateral y consiguiendo un mejor control de la elongación en planos axiales (Figura 5).

Su método fue haciéndose popular en la comunidad ortopédica de Estados Unidos de América. En 1930 había operado a 73 pacientes, registrando una gran cantidad de complicaciones relacionadas con las partes blandas. Lo que le llevó a practicar fasciotomías y desperiostización ampliadas, desinserción de grupos musculares y apertura de la membrana interósea, dejando para un segundo tiempo la osteotomía y colocación del aparato de elongación. Practicaba en todos los casos una elongación extemporánea de 1 o 2 cm. Antes del inicio de la elongación continua esperaba una o dos semanas, ya que reconocía que la presencia de un callo óseo en esa fase podía ser beneficioso, concepto que desarrollaría más adelante De Bastiani.

La excesiva popularización de la técnica de Abbott condujo a ésta hacia el fracaso y abandono. Una serie de malas indicaciones y de mala selección de los pacientes generaron complicaciones que en ocasiones fueron fatales. Esto llevó a Abbot a recomendar la técnica sólo para cirujanos de amplia experiencia y a recordar la posibilidad de realizar epifisiodesis de la extremidad contralateral (1,6).

Con un vacío de instrumental adecuado fueron llevándose a cabo multitud de elongaciones. Necesariamente se desarrollaron distintos dispositivos para realizar distracciones. En 1930 White colocaba dos clavos de Steinmann transóseos en la diáfisis (7). Posteriormente colocaba un yeso circular en la extremidad, dividido transversalmente e incluyendo los clavos en el mismo. Realizaba una osteotomía y colocaba dos barras telescópicas conectadas a los clavos de Steinmann, realizando una elongación durante 30 días.

Una de las principales ventajas del método de White era la posibilidad de que el paciente estuviese fuera de la cama.

En 1932, F.D. Dickson y R.L. Diviley empleaban unas agujas de Kirschner conectadas a soportes semicirculares unidos a barras telescópicas (1). La aportación de este sistema fue la mayor estabilidad y control axial de la elongación (Figura 6).

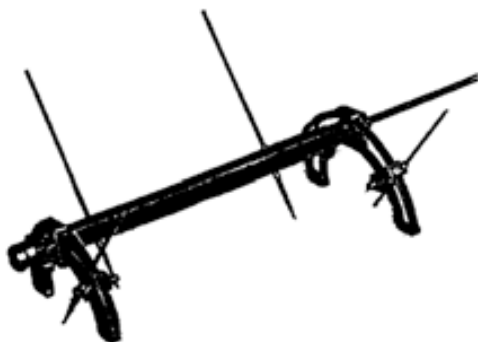


Figura 5. Aparato de Abbot (1).

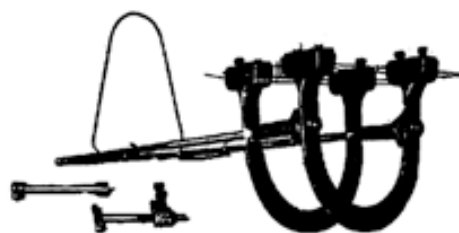


Figura 6. Sistema de elongación de F.D. Dickson y R.L. Diviley (1).

En 1932 Edward J. Haboush y Harry Filkenstein en New York emplearon sistemas parecidos con agujas de Kirschner (1). Además describieron numerosas complicaciones con el sistema de Abbott, llegando a la conclusión de que la disección profunda de las partes blandas no aportaba beneficios en las deformidades remanentes. También destacaron los potenciales beneficios de la conservación del periostio.

En 1935 en Seattle, Roger Anderson diseñó un sistema que contenía unas piezas en forma de herradura unidos a agujas de Kirschner (1). El objetivo de estas piezas era mejorar el control axial de la elongación. Sin embargo este sistema volvía a dejar postrado al paciente en la cama, puesto que las barras telescópicas estaban montadas en un panel que debía reposar en la cama.

D.M. Bosworth fue el primer cirujano que empleó el término “Distracción Ósea” (1). En sus trabajos, publicados en 1931 y 1938, destacaba la necesidad de que el sistema de elongación fuese lo suficientemente rígido como para evitar la deformación del segmento óseo elongado. Llegó a sugerir la posibilidad de realizar osteotomías a dos niveles del mismo hueso para dividir la distancia de elongación por cada osteotomía. Respecto a la técnica de Abbott, no creía necesario realizar una disección profunda de las partes blandas.

Reflexionando sobre estas técnicas, Edward L. Compere publicó en Journal of Bone and Joint Surgery en 1936 un artículo en el que estudiaba las distintas complicaciones existentes en la elongación de extremidades (1,8). Describía una serie de casos

desafortunados y clasificaba en tres grupos las complicaciones posibles durante una distracción ósea. Las complicaciones podían ser: 1) por distracción excesiva, 2) por disminución del aporte sanguíneo a los fragmentos óseos o 3) por mala consolidación de los fragmentos distraídos. Proponía una técnica para prevenir la mala consolidación de la osteotomía. Consistía en una barra de autoinjerto de tibia en el lugar de la osteotomía (Figura 7).

En 1942 A. Brockway y S.B. Fowler comunicaron una serie de más de cien casos intervenidos de elongación ósea (1). En ella analizaban los resultados, con un 13% de casos que estaban clínicamente peor que antes de la cirugía. Como aportación a la técnica de Abbott, añadían un clavo en el fragmento proximal y distal, con la intención de disminuir la tendencia a desalinearse (Figura 8).

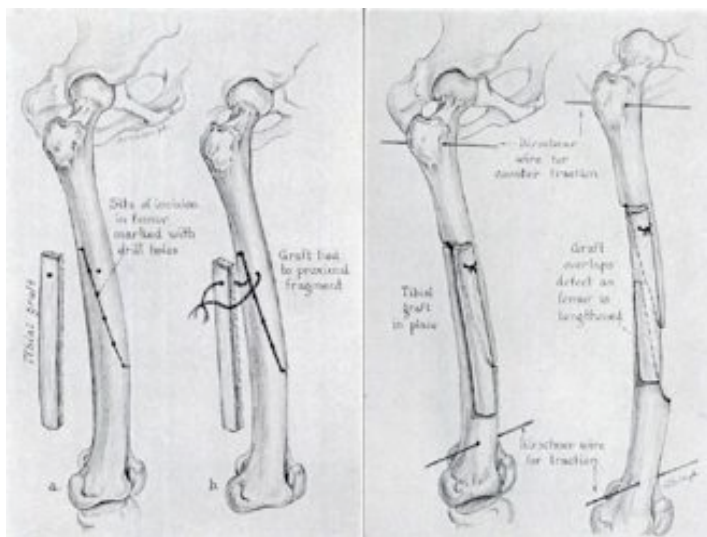


Figura 7. Técnica de Edward L. Compere (1,8) .

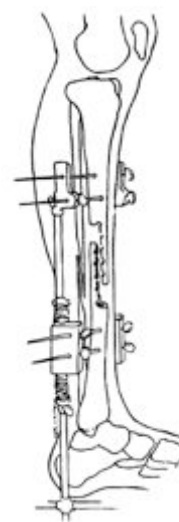


Figura 8. Sistema de A. Brockway y S.B. Fowler (1).

En 1942 A. Gluckmann publica en *Journal of Anatomy* los hallazgos de un estudio experimental de distracción ósea (1,9). Concluye que la distracción continua promueve la formación de hueso y la reorganización microscópica de la estructura ósea.

En 1952 W.V. Anderson realizó modificaciones a la técnica de Abbott (10). Publicó un método de elongación ósea con un aparato de distracción transfixiante, modificación del de Abbott. El procedimiento constaba de dos tiempos quirúrgicos; el primero era lograr una sinostosis tibio-peronea a nivel del tercio distal de la pierna a fin de producir un descenso uniforme de los dos huesos durante la distracción y evitar las deformidades en valgo del tobillo. Consolidada la sinostosis se realizaba el segundo tiempo quirúrgico, consistente en una osteotomía-resección del peroné y posterior osteotomía percutánea de

la tibia en la unión de su tercio proximal y medio. Se colocaba un aparato distractor y se iniciaba la distracción a los 5 días. Se llevaba a cabo una distracción de 1 o 1,5 mm cada día. Estas modificaciones consolidaron el método de Anderson como el método óptimo de elongación de la época. De esta manera, durante la década de 1950 y 1960, Anderson adquirió una gran experiencia, superando a sus colegas americanos y europeos en casuística y resultados. Su método fue difundido mundialmente, pese a lo poco manejable de su aparato de distracción y a la necesidad de largos ingresos por los dos tiempos quirúrgicos del procedimiento.

Westin publicó en 1967 una serie de 26 casos a los que les realizaba un colgajo circunferencial de periostio para cubrir el segmento elongado y favorecer la consolidación de éste (Figura 9) (5,11). Se servía de unos clavos elásticos endomedulares para evitar las desviaciones femorales.

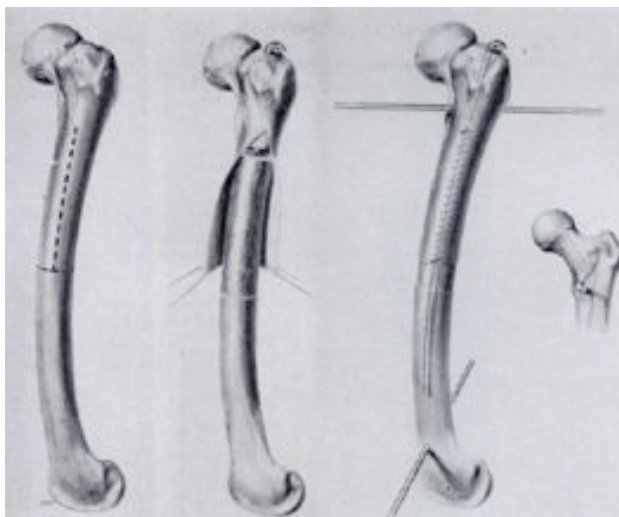


Figura 9. Técnica de Westin (11).

Después de la Segunda Guerra Mundial Gavril Abramovic Ilizarov (Kurgan, Rusia) inició una serie de trabajos que serían considerados pioneros en el campo de la regeneración ósea y su biología (Figura 10) (1,5,12-14). Su técnica fue empleada por primera vez en 1951, para el tratamiento de los defectos óseos que producía la osteomielitis por tuberculosis. Desarrolló un dispositivo de fijación-elongación externa modular constituido por varios anillos alrededor de la extremidad, unidos a ésta mediante agujas transfixiantes y unidos entre sí por barras distractoras (Figura 11).

Sus principios y técnica influyeron notablemente en la práctica clínica de muchos cirujanos ortopédicos llegando hasta nuestros días. Sin embargo los principios de Ilizarov fueron poco difundidos fuera de Rusia, hasta que Wagner desarrollara su técnica con

fijador monolateral. Los principios de Ilizarov son descritos en el Capítulo 1.3. Osteogénesis a distracción.



Figura 10. G.A. Ilizarov (1921-1992).

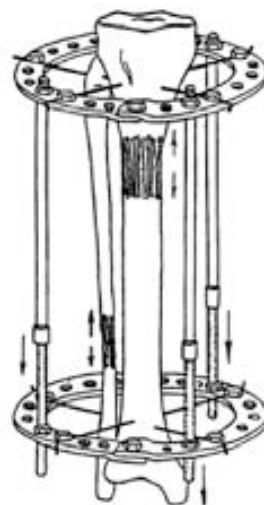


Figura 11. Fijador externo de Ilizarov (1).

En la década de los años 1970 desde la República Federal Alemana se difunde la técnica de elongación de Heinz Wagner (15) (Figura 12). Su procedimiento contaba con alguna diferencia respecto a sus predecesores. Consistía en la realización de una osteotomía, distracción diafisaria, fijación interna con una placa y aporte de injerto de esponjosa. Sin embargo la modificación que más significativa fue el aparato de distracción. El mismo aparato permitía la elongación del fémur, la tibia e incluso el húmero. La osteotomía era a cielo abierto en el tercio medio de la diáfisis tras la colocación del aparato distractor. La distracción se iniciaba al día siguiente de la colocación del aparato distractor. La distracción se iniciaba al día siguiente de la osteotomía a una vuelta de la rosca de elongación cada día, equivalía a 1 cm por semana. Realizada la elongación se reintervenía al paciente para colocar una placa y hueso autógeno (Figura 13). Se requería una tercera cirugía para retirar el material de osteosíntesis.



Figura 12. Heinz Wagner.

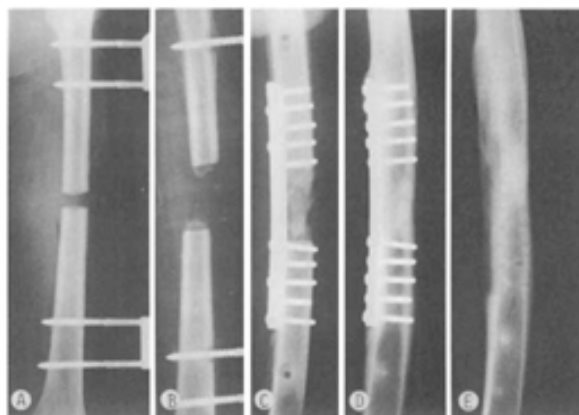


Figura 13. Técnica de Heinz Wagner (15).

El distractor de Wagner poseía unas características de versatilidad y facilidad de manejo que lo hicieron rápidamente popular, no sólo en elongaciones sino como fijador externo para fracturas y otros procedimientos de cirugía ortopédica. El fijador de Wagner era monolateral, permitiendo una fácil colocación y permitiendo al paciente salir de la cama con el fijador, e incluso deambular con él. El distractor constaba de dos piezas telescópicas de sección cuadrangular que se distraían con un sistema de rosca y tornillo elongador (Figura 14). Aunque el distractor era lo suficientemente estable para soportar las sollicitaciones mecánicas del procedimiento seguía presentando complicaciones. La desproporción que existía entre la rigidez del aparato distractor y los clavos convertía a éstos en el punto débil, pudiéndose dar deformidades en varo y valgo.

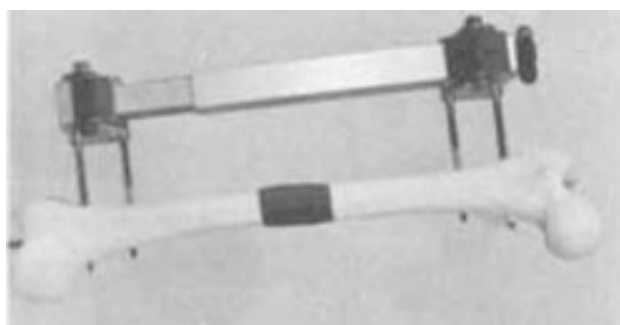


Figura 14. Aparato distractor de Wagner.

En la década de los 1970 De Bastiani (Verona, Italia), desarrolló una técnica de elongación mediante un sistema monolateral dinamizable pero desde los principios de Ilizarov (16). Adoptó el término “callodiastasis” o “distracción del callo”, basándose en el hecho de que se iniciaba la distracción tras un reposo de 15 días desde la osteotomía, tiempo en el que se desarrollaba el callo de consolidación inmaduro. El sistema de fijación externa de De Bastiani, ha llegado hasta nuestros días y ha motivado el desarrollo de otros dispositivos, basándose en el principio de dinamización y los potenciales beneficios que tiene la distracción-compresión en la osteogénesis. Otra de las aportaciones de De Bastiani fue la elongación de extremidades mediante la distracción del cartílago fisario (36), que previamente había sido estudiada por Ring en 1958 y por Ilizarov en 1969.

Además de sistemas de fijación externa también se emplearon dispositivos intramedulares para realizar elongaciones. En 1946 Pais describió la elongación de extremidades sirviéndose de un clavo endomedular (1). Küntscher empleó un fragmento de fémur sano de la pierna contralateral a la afectada para utilizarlo como autoinjerto intercalar (1). En 1948 Pierre Bertrand, en Paris, empleaba dos agujas intramedulares

para evitar la pérdida de alineación de los fragmentos (1). En 1956 Bost y Larson emplearon clavos de Rush intramedulares para sus elongaciones (1). Wasserstein llevaba a cabo elongaciones progresivas con un clavo, para en un segundo tiempo realizar el aporte de injerto intercalar diafisario.

A partir de los años 1980 el Profesor Cañadell, en España, dirigió una serie de trabajos clínicos y experimentales sobre elongación ósea (Figura 15) (17-24). Estos trabajos, realizados en la Universidad de Navarra (Pamplona), proporcionaron nuevos datos sobre la osteogénesis a distracción y la elongación de extremidades y fueron plasmados en diversas Tesis doctorales, revistas nacionales e internacionales.



Figura 15. El Profesor Cañadell.

Entre las investigaciones realizadas por el grupo del Profesor Cañadell se realizaron estudios experimentales en corderos para evaluar la influencia del tipo de osteotomía en la osteogénesis a distracción (25). En este trabajo se concluyó que la modalidad de la osteotomía influía notablemente y que la mayor capacidad osteogénica de un foco de distracción se consigue con una osteotomía percutánea a nivel metafisario. Se concluyó también que el callo fibroso de las osteotomías a cielo abierto presentaba una mayor desestructuración y menor vascularización que en las percutáneas.

Se llevaron a cabo otros estudios experimentales en corderos en los que se ponderó el efecto de diferir unos días la distracción tras la osteotomía, en comparación con iniciar la distracción inmediata a la osteotomía (21). Se concluyó que la distracción diferida favorece la reconstrucción del foco de elongación, con una osificación más rápida, abundante y homogénea.

Se evaluó en estudios experimentales similares con corderos el papel de la vascularización, mediante la lesión de la vascularización endomedular o la lesión de la

circulación perióstica (26). Los resultados mostraron que la preservación del periostio como variable aislada favorece la reconstrucción del foco de elongación con una osificación más rápida, abundante y homogénea. La circulación endomedular parece no ser imprescindible para la osteogénesis a distracción. Con estos resultados se concluyó que la preservación del periostio era más importante que la realización de una corticotomía muy cuidadosa que no dañe el endostio.

Se llevó a cabo un estudio experimental que evaluaba el efecto de la dinamización axial sobre la consolidación del callo de elongación (27). Se realizó en corderos con sistemas de fijación-distracción en distintos regímenes, de neutralización (sin movimiento alguno del foco), con biocompresión (permitía un movimiento libre del foco) y dinamización (se incorporaba un muelle en el sistema que permite un movimiento elástico). El estudio se completaba con la utilización de un transductor inductivo de desplazamientos axiales, que enviaba la información de los movimientos entre los clavos del sistema a un sistema de registro gráfico. Se observó que el sistema en régimen de neutralización y de biocompresión libre apenas tenía movimiento, ya que el sistema de biocompresión se colapsaba y no progresaba el micromovimiento. El sistema en régimen de dinamización elástica con un sistema de baja fricción y un sistema anticlapso presenta movimiento axial oscilatorio durante la marcha del cordero. Se concluyó que en régimen de neutralización la consolidación ósea del foco de elongación no es completa a las seis semanas de concluir la distracción, mientras que en el sistema de biocompresión es completa y está en fase de remodelación. En el régimen de dinamización elástica, a las seis semanas la consolidación era completa, se encontraba en remodelación y con un callo hipertrófico. Por lo que la conclusión más importante era que los sistemas con dinamización elástica promovían una mayor eficacia y maduración del regenerado óseo.

En 1986 el Profesor Cañadell publicó una modificación del sistema de fijación externa de Wagner, que incluía como aspecto relevante un sistema de dinamización axial, con ciertas similitudes al Lazyr® de Lazo-Zbikowski (24). Fruto de aquello resultó el sistema Monotube®, sistema de fijación-distracción con opción a dinamización axial y de gran versatilidad. Este sistema de fijación-distracción es el que ha sido empleado en este trabajo (Material y Métodos).

La mayoría de las aportaciones de las últimas décadas han venido de la mano de las ciencias básicas, que han permitido el mejor entendimiento de la biología ósea. Los estudios experimentales llevados a cabo en los últimos años para la mejoría del

regenerado óseo han dilucidado el papel de algunas macromoléculas involucradas en la regeneración de los tejidos. Las líneas actuales de investigación discurren por la línea de optimización de las circunstancias biológicas y celulares.

Sin embargo la evolución de los dispositivos de elongación no ha cesado. Se han hecho incorporaciones tecnológicas tanto a dispositivos de fijación externa (Taylor Spatial Frame®)(28,29) como a clavos endomedulares (clavo Fitbone®)(30), que persiguen un mayor control en la distancia distraída, así como de las desviaciones en cada plano (Figura 16 y 17).



Figura 16. Sistema de fijación externa y distracción multiplanar controlable informáticamente Taylor Spatial Frame® (28,29).

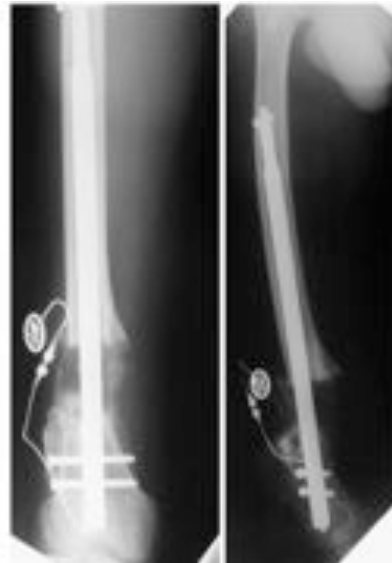


Figura 17. Sistema endomedular distraible controlable electrónicamente Fitbone® (30).

1.2. Técnicas de elongación ósea

Las técnicas de elongación de huesos largos se basan en tres pasos fundamentales: la creación de una solución de continuidad en el hueso, la distracción progresiva de dicha solución de continuidad con formación de un nuevo tejido o callo y la consolidación del callo, hasta reproducir las características morfológicas y biomecánicas del hueso nativo. Se podrán describir las distintas técnicas de elongación dependiendo del lugar en que se realiza la solución de continuidad, y el sistema por el que se gane longitud del segmento óseo.

1.2.1. Distracción fisaria

En el esqueleto inmaduro del niño el cartílago de crecimiento o fisis produce el crecimiento en longitud de los huesos largos. El crecimiento se lleva a cabo por aposición celular en un sistema columnar. La distracción fisaria consiste en emplear la fisis como solución de continuidad para conseguir crecimiento del segmento óseo, para ello debe realizarse una fuerza de distracción de la fisis que consiga romperla.

Como desventaja presenta que la epifisiolisis y epifisiolistesis debe ser súbita, lo que puede tolerarse mal por el dolor. Y que la fisis puede ser lesionada excéntricamente, circunstancia que puede complicar una dismetría añadiendo una deformidad angular. Los clavos de la epífisis se colocan paralelos a la fisis e intraarticulares, lo que puede acarrear complicaciones articulares, como rigideces y artritis sépticas. Las complicaciones descritas son elevadas (17,31). Para minimizar las complicaciones surgidas por problemas de la fisis, el momento óptimo para realizar esta técnica es el paciente se encuentra cercano al cierre de sus fisis (32).

Pese a su dificultad técnica, y a la cantidad de complicaciones que presenta, la distracción fisaria ha encontrado su papel en la cirugía de los tumores óseos en la edad pediátrica. Debido a la distinta vascularización de la epífisis y la diáfisis con la metáfisis la fisis funciona como una barrera física que puede ser empleada para el tratamiento de los tumores metafisarios, y así salvar la articulación nativa (17).

La primera descripción de la técnica fue a cargo de Ring en 1958. Posteriormente otros autores han estudiado sus propiedades e inconvenientes (Figura 18) (33-37). En la Clínica Universitaria de Navarra el grupo del Profesor Cañadell empleó esta técnica en el

contexto de tumores metafisarios infantiles. También se llevaron a cabo varios estudios experimentales animales para evaluar las propiedades del procedimiento (17,38,39,40).

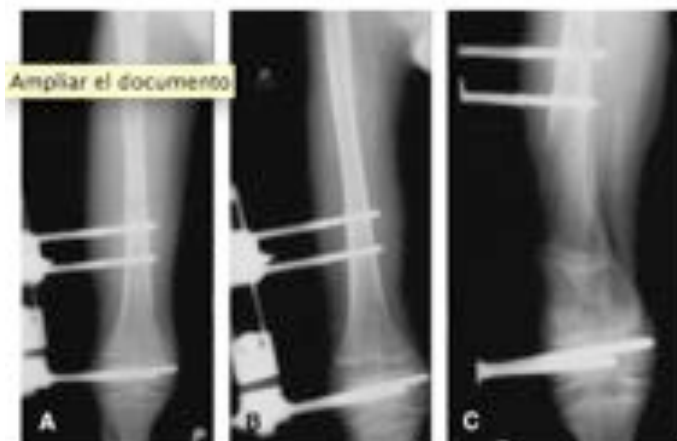


Figura 18. Distracción fisaria femoral distal que sufrió una deformidad en varo por un puente fisario medial (33).

1.2.2. Osteogénesis a distracción

La osteogénesis a distracción puede realizarse mediante tres variantes técnicas que se describen a continuación. El fundamento de la Osteogénesis a Distracción es la creación de una osteotomía y llevar a cabo un estiramiento del callo situado en la solución de continuidad. Las dos primeras variantes se diferencian por el dispositivo de elongación. La primera es empleando dispositivos internos, la segunda mediante fijadores externos. La tercera variante hace referencia al tipo de solución de continuidad del hueso, que en vez de ser una osteotomía es una fractura o una artrodesis.

a) Mediante fijación interna

En 1956 Bost y Larsen proponían realizar un sistema híbrido, fijación externa para la distracción y emplear un clavo endomedular para la consolidación del regenerado (41). Durante los años 70 otros autores exploraron la posibilidad de realizar todo el procedimiento mediante la implantación de clavos telescópicos (42). En las décadas siguientes se sucedieron nuevos intentos de realizar todo el procedimiento mediante fijación interna, ya que los problemas derivados de los clavos en la fijación externa eran de cierta entidad. Los resultados de elongaciones con clavos endomedulares telescópicos de nueva generación han mostrado elongaciones eficaces sin mucha comorbilidad (Figura 19) (43). Recientemente se ha desarrollado un clavo intramedular telescópico con control externo de la distracción (30).



Figura 19. Sistema de distracción intramedular Albizzia® (43).

b) Mediante fijación externa

La mayoría de los procedimientos de osteogénesis a distracción se llevan a cabo mediante fijación externa. El dispositivo fijador-distractor suele consistir en un sistema de anclaje al hueso, bien en serie o circular y un sistema telescópico para la realización de la distracción progresiva. En el resto de este trabajo siempre que mencione la osteogénesis a distracción será de osteogénesis a distracción mediante fijación externa.

c) Otros (fracturas y artrodesis)

Tanto durante la consolidación de una fractura como durante una artrodesis puede seguirse los principios de la osteogénesis a distracción. Sin embargo suelen ser circunstancias excepcionales las que inviten a realizar estos procedimientos (Figura 20) (19).



Figura 20. Osteogénesis a Distracción a partir de una artrodesis de rodilla (19).

1.3. Osteogénesis a distracción

La osteogénesis a distracción es un proceso biológico por el cual se forma hueso nuevo debido a la inducción mecánica entre dos segmentos óseos estabilizados a los que se les somete a una separación gradual (12,14). El principio en el que se basa es la capacidad del tejido óseo de repararse ante una solución de continuidad, y remodelarse dependiendo de las fuerzas mecánicas a las que se somete (44,45).

Como proceso de osteogénesis comparte características biológicas con la esquelotogénesis durante la fase embrionaria y fetal, y con la consolidación de las fracturas. Las dos modalidades fisiológicas que tiene el organismo para formar hueso, la osificación intramembranosa y la endocondral, también están presentes en este proceso terapéutico. Para algunos autores el modo en que la osteogénesis a distracción crea hueso nuevo es exclusivamente mediante la osificación intramembranosa (12,14,46). Otros autores sostienen que es mediante osificación endocondral (49,62). Para un tercer grupo de autores los dos tipos de osificación coexisten durante la osteogénesis a distracción (47,48).

1.3.1. Descripción histológica y radiológica de la osteogénesis a distracción

Tras la realización de la osteotomía, se forma un hematoma como en las fracturas, que atrae a numerosos fibroblastos y células mesenquimales. Este hematoma, tras darse la cascada de la coagulación, formará un coágulo que seguidamente se reorganizará en una red fibrosa ocupando el espacio interfragmentario.

Al iniciar la distracción se producen fuerzas de tensión a lo largo de la solución de continuidad, que inducen a que el colágeno sintetizado por los fibroblastos se reorganice en fibras longitudinales (14,44,45). En el callo de fractura estas fibras no presentan ninguna disposición longitudinal. Al igual que en el cartílago de crecimiento se crea una estructura que crece en longitud (49). La llegada de yemas vasculares procedentes de la circulación perióstica y endóstica dará lugar a la aparición de osteoblastos. Éstos iniciarán la síntesis de de hueso entre las fibras de colágeno dispuestas en columnas, lo que es posible observar con radiología simple (14,44,50).

Avanzada la distracción se puede observar en radiología simple la presencia de una línea radiolúcida central dividiendo en dos el espacio distraído, a la que se le denomina zona central de crecimiento (Figura 21 y 22) (44,51,52).

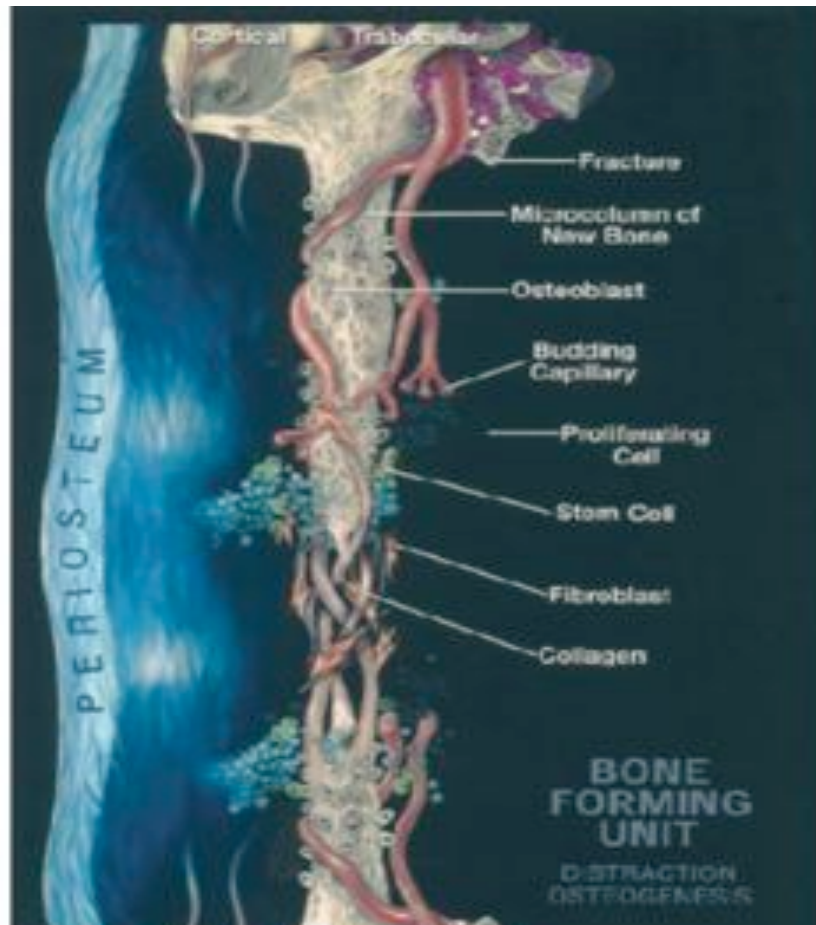


Figura 21. Esquema que muestra la unidad básica formadora de hueso, en la que por la fuerza de tensión se distribuyen longitudinalmente las fibras de colágeno y entre ellas se disponen las células osteoprogenitoras y los vasos (51).

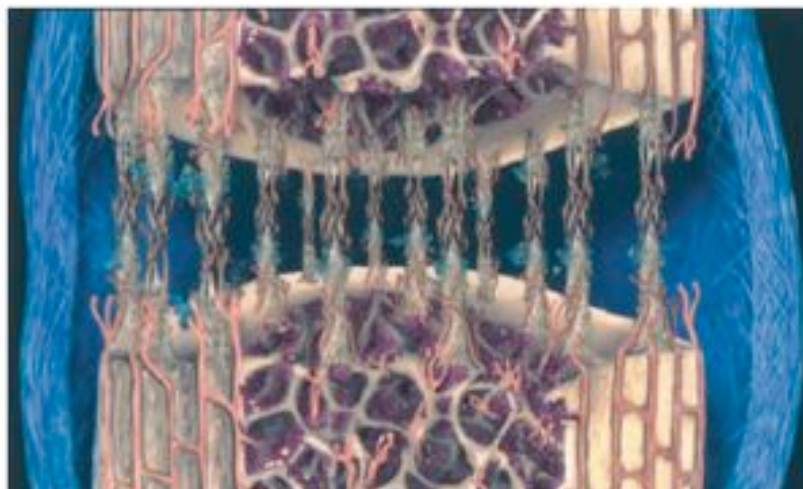


Figura 22. Esquema que muestra un corte coronal de un callo de elongación con sus distintas unidades formadoras de hueso debido a la fuerza de tensión (51).

La zona central de crecimiento está formada por tejido fibroso mal vascularizado (46,52). Mientras dura la distracción la zona central de crecimiento presenta un grosor de 2 a 4 mm, y se imbrica en el tejido mineralizado adyacente. Cuando se detiene la distracción tiende a estrecharse, por aumento de la vascularización y progresión de la mineralización, hasta que llega a cerrarse por completo cuando se mineraliza la totalidad del callo de elongación (Figura 23) (13,44).



Figura 23. Esquema de las fases de maduración del callo de elongación.

En la zona adyacente al fragmento óseo proximal y distal se encuentra una fase del callo de elongación que está compuesta por columnas de hueso fibrorreticular orientadas según la dirección de la distracción y en distinta fase de mineralización. Esta zona del callo de elongación, denominada zona de mineralización, representa el anclaje del callo de elongación a los dos segmentos óseos (44). Esta zona se divide a su vez en un “Frente primario de mineralización” y una “Zona de formación de microcolumnas” (52). En esta zona se da el crecimiento por aposición de nuevas células en las columnas. Entre las columnas óseas hay tejido no calcificado y vasos sanguíneos neoformados que avanzan hacia el centro del callo. La mineralización de esta zona se da desde las corticales originales hacia la zona central de crecimiento (14,45,50,52). El hueso recién formado entre las columnas de colágeno se mineralizará dando lugar a columnas óseas visibles con radiología simple a partir de la semana de haber iniciado la distracción (44,50).

La zona de remodelación aparece pasado un tiempo de la distracción entre la zona de mineralización y el segmento óseo donde se realizó la osteotomía. Consiste en la convergencia de las trabéculas longitudinales y posterior remodelación, sustituyendo el hueso fibrorreticular inmaduro por hueso lamelar y cortical (44). Conforme madura el callo de elongación, va creciendo la zona de mineralización y la de remodelación.

Cuando la línea radiolúcida desaparece, las zonas de remodelación proximal y distal se unen, dando lugar a la consolidación del callo de distracción. La tubulización, o remodelación con formación de cortical y medular, se da a los 2-3 meses de concluir la distracción en animales a los 4-6 meses en humanos. La remodelación completa del callo de elongación concluye a los 6 meses en animales, y a los 12 meses en el ser humano (44).

1.3.2. Principios de la osteogénesis a distracción

Gran parte de los conceptos y principios de la osteogénesis a distracción son debidos a los trabajos de Ilizarov (14,53). Aunque no fue el primer autor en estudiar los aspectos biológicos de la elongación ósea (54), ni el primer cirujano en emplear un fijador de diseño circular (55), fue pionero en ordenar y describir con sistemática los principios técnicos y biológicos de la osteogénesis a distracción.

El diseño del fijador de Ilizarov consistía en múltiples anillos, unidos al hueso mediante varias agujas a tensión. La complejidad del montaje del fijador otorgaba una gran versatilidad al sistema, ya que permitía una gran variedad de posibilidades e incluso la fijación de dos segmentos óseos. Una de sus ventajas es que distribuye la elongación en varios puntales alrededor de la extremidad y de los anillos, esto permite la elongación asimétrica y de este modo la corrección progresiva de deformidades angulares en varios planos.

Sin embargo la mayor aportación de Ilizarov a la Cirugía Ortopédica fue destacar la importancia de los tejidos blandos circundantes al hueso y los aspectos relacionados con la biología ósea en la elongación. Estos principios son independientes del fijador empleado (56). Entre los aspectos que Ilizarov destacaba estaba la preservación de la circulación endomedular, y el cuidado de las parte blandas circundantes, para lo que proponía realizar una corticotomía en vez de osteotomía, y realizarla de modo percutáneo.

Para realizar la corticotomía empleaba un osteotomo de 5mm, que empleaba para realizar el corte de la cortical de modo circunferencial, con el objetivo de lesionar el menor periostio posible. En muchas ocasiones no se producía una corticotomía completa, por lo que la cortical remanente se rompía por osteoclasia (57,58). Este era un paso de gran dificultad técnica y que ha intentado ser obviado por otros autores que han afirmado que la circulación endomedular se reestablece rápidamente si es dañada al llevar a cabo una osteotomía ordinaria (59). Para Ilizarov debía esperarse unos días tras la realización de la osteotomía antes de iniciar el alargamiento, con el objetivo de que el hueso ya haya

iniciado el proceso de osteogénesis y curación de la corticotomía. Ilizarov recomendaba una elongación de 1 mm diario, pudiendo enlentecerse si la imagen radiológica no era satisfactoria. También recomendaba fraccionar la longitud a elongar cada día, de modo que mejor que una distracción de 1 mm de una vez sería 0,25 mm cada 6 horas, a este concepto se le denomina ritmo de distracción.

Otro de los aspectos en los que fue pionero fue en la importancia que dio a mantener la función articular realizando fisioterapia pasiva y activa, y en que autorizaba la carga completa de peso sobre la extremidad intervenida. Defendía la deambulacion precoz del paciente, ya que le daba un gran valor a la estimulación de la osteogénesis que podía suponer una carga cíclica sobre el tejido de regeneración (60).

Para evitar complicaciones y nuevas cirugías Ilizarov recomendaba mantener el fijador hasta tener la certeza de que el segmento alargado había consolidado (Tabla 1) (60).

- La corticotomía debe ser percutánea, para preservar el potencial regenerador del periostio.
- Después de la cirugía se mantiene la corticotomía sin realizar distracción.
- Los anillos son atravesados por agujas Kirschner pretensadas y bloqueadas al anillo. Esto permite un control de los planos de distracción muy superior a la distracción monolateral. Permite la corrección multidireccional de deformidades.
- La distracción es progresiva y diaria, en torno a 1mm/día.
- Se realiza distracción y compresión, al permitir la carga de peso.
- La conservación de la movilidad articular y la carga de peso permite la deambulacion precoz, el tratamiento fisioterápico y la mejoría de partes blandas.
- Se mantiene el fijador hasta que el hueso está completamente consolidado.

Tabla 1. Principios de la osteogénesis a distracción de Ilizarov.

De Bastiani adaptó algunos de los principios de Ilizarov. Basándose en los principios biológicos de Ilizarov utilizó un sistema de fijación-distracción monolateral (16). Este sistema de fijación-distracción, denominado Orthofix®®, consiste en un cuerpo distractor unido al hueso por dos grupos de hasta 3 clavos roscados. El anclaje de los clavos al cuerpo se realiza mediante una mordaza, que en los fijadores para fracturas tiene movilidad bloqueable, pero que en los sistemas para alargamientos está incluida en el cuerpo del fijador-distractor, para aumentar la estabilidad del sistema (16).

La segunda modificación respecto al método de Ilizarov fue en relación a la corticotomía. De Bastiani optó por realizar una osteotomía en vez de corticotomía, mediante perforaciones múltiples sin perforar la medular, y unir los orificios con un osteotomo.

El tiempo de espera hasta el inicio de la distracción fue alargado a 10 días en niños y 15 días para adultos, frente a la semana que esperaba Ilizarov. Según De Bastiani, esperar más días daría lugar a un callo de fractura inmaduro, y en su alargamiento basaría la distracción del segmento óseo. A este concepto lo denominó callostasis. Según la escuela de De Bastiani la espera de más días hasta la elongación restauraría la circulación endomedular lesionada con la osteotomía (16).

En la actualidad la osteogénesis a distracción está basada fundamentalmente en estos conceptos de Ilizarov y De Bastiani, independientemente del fijador que sea empleado.

1.4. Aspectos biológicos de la osteogénesis a distracción

1.4.1. Factores que influyen en la osteogénesis a distracción

Durante el procedimiento de la osteogénesis a distracción existe una serie de circunstancias que pueden determinar la calidad del regenerado óseo, e influir en el desarrollo o no de algunas de las complicaciones típicas. Estas circunstancias o factores pueden tener repercusión tejidos y estructuras adyacentes al segmento elongado. Se describen a continuación estos factores por orden de aparición en el procedimiento habitual.

a) La osteotomía

La calidad y volumen del callo de distracción depende de las capacidades regenerativas del segmento a distraer. La osteotomía metafisaria aporta mayor potencial regenerador que la diafisaria. El fundamento teórico es la más rica vascularización de la región metafisaria y en que la superficie de la sección transversal es mayor, lo que contribuye positivamente a la estabilidad (13,46,61). También puede influir el hueso en el que se realiza, osteotomías femorales tienen mejores tiempos de consolidación que las tibiales según Fischgrund (61).

El grupo del Profesor Cañadell estudió la influencia del tipo de osteotomía en la calidad de la osteogénesis a distracción (25). Emplearon un modelo de osteogénesis a distracción en corderos, a los que realizaron cuatro modalidades de osteotomía: percutánea metafisaria, percutánea diafisaria, a cielo abierto diafisaria y a cielo abierto metafisaria. Los resultados del estudio mostraron que la técnica idónea era la osteotomía percutánea metafisaria seguida de la elongación mediante osteotomía percutánea diafisaria.

Otra variable a tener en cuenta es la técnica de osteotomía. Ilizarov preconizó el uso de la corticotomía, como técnica en la que se realizaba la sección del hueso cortical sin dañar la circulación endóstica y diferenciándola de la osteotomía, en la que siempre se dañaba dicha circulación (14). Sin embargo la corticotomía por un único abordaje no permitía el acceso a toda la circunferencia cortical, por lo que se precisaba de un gesto que consiguiera romper la cortical posterior. Este gesto era la osteoclasia, que consistía en realizar una fractura del puente óseo remanente mediante torsión de la extremidad. Otros autores han dado más importancia a la circulación perióstica, por lo que han realizado osteotomías en vez de corticotomías (16,46,49,50,57,59).

En esta misma línea algunos autores defienden que tanto el periostio como el endostio tienen importancia en la formación del callo de elongación (14,49,59). Otros le dan más importancia a la preservación del endostio y su circulación (12,50). Ante esta cuestión autores japoneses estudiaron el valor del periostio y endostio en un modelo animal de elongación (49). Realizaron elongaciones tibiales en conejos, con tres modalidades de osteotomía. En el primer grupo se llevaban a cabo una osteotomía en la que se suturaba el periostio tratando de lesionarlo lo menos posible. En el segundo grupo se realizaba una desperiostización alrededor de la osteotomía. En el tercer grupo se llevaba a cabo un legrado de la medular para lesionar el endostio. Los resultados mostraron que los casos con mejor osteogénesis eran los del primer grupo y seguidamente los del tercero, los del grupo de desperiostización presentaban los peores resultados. Como conclusión describían que la conservación del periostio es esencial en el proceso de osteogénesis a distracción, no tanto la del endostio.

b) La fase de latencia

Se trata del período de tiempo que transcurre desde que se realiza la osteotomía hasta que se inicia la distracción. Durante esta fase, se produce la formación y reorganización de un hematoma en la osteotomía y la aparición de una vascularización temprana en el callo fibroso o blando (62).

La prolongación de esta fase no es idéntica en todos los individuos, sino que depende de la capacidad de regeneración del hueso, la cual viene determinada por factores como la edad del paciente, la localización de la osteotomía, la preservación de los tejidos blandos durante la cirugía o la existencia de enfermedades concomitantes. Si no se ajusta el tiempo de latencia a las circunstancias del paciente se puede dar o un retraso de la formación de hueso o por el contrario una consolidación precoz de la osteotomía, circunstancia que impediría la correcta distracción (44,62,63).

c) La velocidad de distracción

Se define como la longitud total de elongación que se realiza por día. Las velocidades habitualmente aplicadas se encuentran entre 0.75 y 2 mm diarios, en ser humano y animales de experimentación (65). Igual que en la fase de latencia, velocidades muy altas pueden producir un retraso de consolidación, pero también influir en los tejidos circundantes con contracturas musculares y subluxaciones articulares. Velocidades muy lentas pueden dar lugar a consolidaciones precoces.

d) El ritmo de distracción

Se define como el número de incrementos de longitud que se llevan a cabo por día para una velocidad de distracción dada. Tal y como afirma Ilizarov (14), este parámetro influye en la calidad y cantidad de hueso nuevo formado. Aunque sostiene que cuanto mayor es el ritmo de distracción, mejor es la calidad del callo formado, a los pacientes les resulta difícil aplicar ritmos demasiado elevados. Sin embargo Welch describió que la aplicación de diferentes ritmos de distracción no producía demasiadas diferencias histomorfométricas en el hueso regenerado (44).

e) La estabilidad del fijador-distractor

La estabilidad proporcionada por el sistema de fijación-distracción es de gran importancia en la formación del callo de distracción, del mismo modo a lo que sucede en la consolidación de fracturas (13,14). Durante la reparación de una fractura la diferenciación de las células mesenquimatosas pluripotenciales en células cartilaginosas, u óseas, depende del aporte sanguíneo y de la estabilidad del foco de fractura. En condiciones de estabilidad reducida se formarían condroblastos y en condiciones de estabilidad elevada osteoblastos. La presencia de uno u otro tejido determina el tipo de osificación (66). Es posible establecer cierto paralelismo entre el mecanismo de consolidación de una fractura y el fenómeno de osteogénesis a distracción

Ilizarov observó que la aplicación de un fijador poco estable daba lugar a la presencia de cartílago en el callo de distracción, hallazgo para él desfavorable (14).

1.4.2. Efectos de la osteogénesis a distracción sobre los demás tejidos

Aunque se ha descrito la posibilidad de elongar experimentalmente un segmento óseo más del 100% de su longitud (67), no es factible en las situaciones clínicas cotidianas. El hueso no se encuentra aislado, sino existen tejidos circundantes al hueso, como músculos, tendones, vasos sanguíneos, nervios y articulaciones, que no tienen la misma capacidad que el hueso para adaptarse a la distracción (12,68,69).

a) Sobre la vascularización

Ippolito sostiene que las arterias son más resistentes a la distracción que las venas, ya que comienzan a mostrar alteraciones puntuales cuando se alcanza una elongación del 20% de la longitud del hueso, mientras que las venas presentan mayores modificaciones

en esta fase (68). En su estudio observaron que cuando se obtenía una elongación del 8%, no se producían cambios morfológicos de estas estructuras, pero con un 20% de elongación, comenzaban a visualizarse alteraciones estructurales de los vasos. Las capas vasculares se adelgazaban, las células se afinaban y alargaban, se perdían proteínas contráctiles (actina y miosina) y comenzaba la vacuolización intracelular. Estas modificaciones se hacían más evidentes con la obtención de una elongación del 30%. En este momento se agravaba la presencia de vacuolas intracelulares y se producía la degeneración y separación de las células endoteliales respecto a la membrana basal. Respecto a las estructuras venosas, las lesiones desarrolladas daban lugar a un edema difuso, consecuencia tanto de la insuficiencia venosa como de la alteración de los vasos linfáticos. A los dos meses, los cambios estructurales descritos habían desaparecido, pudiendo observarse tejido normal.

Un estudio experimental de Ilizarov, mostró que a medida que se aumentaba la velocidad de distracción, disminuía la actividad biosintética de las células arteriolares, mientras que cuanto mayor era el número de distracciones que se realizaban diariamente mayor era dicha actividad celular (12). Asimismo, las células musculares lisas de la pared de los vasos presentaban una actividad sintética aumentada, indicativa de crecimiento tisular. También pudo observar que utilizando ritmos de elongación elevados se formaba un mayor número de capilares que se anastomosaban entre ellos, es decir, tenía lugar una elevada actividad angiogénica.

Otros autores estudiaron el papel de la membrana basal vascular durante la osteogénesis a distracción, demostraron que la angiogénesis se iniciaba con la degradación de la membrana basal endotelial de los vasos originales y la migración de células del endotelio en la dirección del estímulo. Estos brotes vasculares se extendían, invadiendo y remodelando la matriz que les rodeaba. En ellos, se producían numerosas divisiones celulares, formando el lumen vascular, y mediante la anastomosis de todos estos brotes se permitía la circulación de la sangre (70).

Los estudios realizados por Aronson de la afectación de la vascularización durante la osteogénesis a distracción con técnicas de gammagrafía mostraron que se producía un aumento de la vascularización sanguínea no sólo en la región de la distracción, sino también en zonas del hueso alejadas de la elongación (71). Este aumento era muy marcado durante las dos primeras semanas para posteriormente disminuir pero manteniéndose todavía elevado durante todo el proceso de elongación. Durante la fase de consolidación

del callo de distracción, la vascularización se reducía de nuevo, pero permanecía más elevada que en el hueso no elongado. Las regiones del hueso alejadas del punto de distracción mostraban también un aumento del flujo sanguíneo, pero en menor proporción que la región elongada. Aronson pudo observar que este aumento del flujo se prolongaba durante el mismo período de tiempo, 17 semanas, independientemente de la duración de la fase de distracción.

b) Sobre el tejido nervioso

Tal y como ocurría con la vascularización, la velocidad, el ritmo y la elongación total obtenida pueden influir en el tejido nervioso (14,68,69).

La influencia que la velocidad y el ritmo de distracción ejercían sobre los cambios estructurales que las fibras nerviosas desarrollaban durante la elongación, fue estudiada por Ilizarov (14). En este estudio experimental, Ilizarov pudo comprobar que el ritmo de distracción ejercía un papel más importante en las alteraciones estructurales nerviosas que los factores restantes. De esta forma, sugiere que la utilización de ritmos de distracción bajos causaban una reducción en el diámetro axonal. Por el contrario, la realización de un mayor número de distracciones diarias causaba alteraciones mínimas o incluso permitía observar fibras nerviosas neoformadas en diferentes estadios de diferenciación.

Ippolito observó que si la elongación obtenida correspondía a menos del 10% de la longitud del nervio, las lesiones eran únicamente visibles a través del microscopio electrónico (68). En este caso, las imágenes tomadas mostraban signos de fragmentación y depósitos granulares en la vaina de mielina. A medida que se aumentaba la elongación, los cambios eran más evidentes. Con un 20% de distracción, las alteraciones ya eran visibles a través del microscopio óptico, pudiendo observarse el engrosamiento e inflamación de la vaina de mielina y la reducción en el grosor del axón. Estos signos eran más evidentes cuando se alcanzaba una elongación de más del 30% de la longitud total.

La modificación de la función nerviosa durante la elongación ósea fue estudiada por Mizumoto (69). El procedimiento experimental que llevaron a cabo en conejos demostró que aunque la conducción nerviosa se veía retrasada a medida que aumentaba la longitud elongada, se podía reducir esta alteración mediante el uso de ritmos más elevados de distracción.

c) Sobre el músculo

Algunas de las complicaciones más frecuentes de la elongación ósea son las contracturas musculares, la anquilosis y disminución del rango de movimiento de las articulaciones adyacentes al hueso elongado. Tanto la velocidad y ritmo de distracción como la proporción de elongación producen alteraciones musculares (12,67).

Durante la distracción ósea, el tejido muscular se adapta a la elongación mediante la existencia de fenómenos degenerativos y regenerativos de las fibras musculares. Mientras que algunas fibras muestran necrosis y atrofia, otras presentan fenómenos anabólicos y aumento del número de sarcómeros y mioblastos que permiten la elongación muscular (14,72). Este equilibrio depende de la velocidad, ritmo y distancia de elongación. La alteración del tejido muscular es directamente proporcional a la velocidad de distracción pero inversamente proporcional al ritmo, a medida que aumenta la velocidad de distracción se produce una mayor degeneración muscular, mientras que llevar a cabo numerosas distracciones diarias da lugar a menor número de lesiones musculares (14,72). Respecto a la distancia elongada, las alteraciones musculares se incrementan conforme aumenta la proporción de tejido elongado, sin embargo, existe un punto crítico a partir del cual el riesgo de complicaciones aumenta, entre el 20 y el 30% de elongación (72,73).

Algunos autores sostienen que la elongación del músculo tiene lugar principalmente a nivel de la osteotomía (72,73), sin embargo Yasui comprobó experimentalmente que las fuerzas distractoras se distribuyen a lo largo de todo el músculo (67).

1.5. Complicaciones de la osteogénesis a distracción

La elongación de extremidades mediante osteogénesis a distracción es un procedimiento que puede presentar complicaciones, algunas de las cuales son más frecuentes cuanto más tiempo dura el procedimiento completo.

Uno de los primeros autores en observar la distinta implicación de estos problemas en un resultado insatisfactorio en la elongación ósea fue Wagner (15), que diferenció entre problemas y complicaciones. Para Wagner los problemas son intrínsecos al procedimiento de elongación y son la mayoría de las veces inevitables, las complicaciones son extrínsecas al tratamiento y debe haber especial cautela por evitarlas.

Para Paley existen tres tipos incidencias durante el tratamiento, los problemas, los obstáculos y las complicaciones (74). Los problemas y los obstáculos descritos por Paley son equivalentes a los problemas descritos por Wagner. La diferencia según Paley es que los problemas se podrían resolver con tratamiento ortopédico y los obstáculos precisarían de un nuevo procedimiento quirúrgico. Para Paley las complicaciones serían aquellas que tienen consecuencias tras concluir el procedimiento, pudiendo necesitar o no de nuevas cirugías.

El grupo del Profesor Cañadell dividió las complicaciones sufridas en alargamientos en cuatro tipos (75). El Tipo 1 no requería detener el procedimiento ni afectaban al resultado final. El Tipo 2 requería interrumpir temporalmente el procedimiento o precisaban una nueva cirugía. El Tipo 3 era una complicación que podía influir en el resultado final. En el Tipo 4 se requería interrumpir definitivamente la elongación.

Los problemas surgidos durante las elongaciones óseas se pueden describir según la estructura afectada, como las del fijador, las complicaciones del callo, de articulaciones adyacentes, músculo-tendinosas o neurovasculares (74,75). El grupo del Profesor Cañadell describió que el 45% de las complicaciones se producían en el callo y el 34% en las articulaciones adyacentes (75). El resto de complicaciones descritas eran en el hueso, en el fijador y las partes blandas. Las complicaciones más frecuentes eran la rigidez articular, la desviación axial del hueso y el aflojamiento de los clavos, mientras que las subluxaciones, las fracturas y los retrasos de consolidación se dieron más raramente.

Debido a la disparidad de criterios en la literatura a la hora de describir lo que es una complicación, las series retrospectivas muestran una variabilidad en la incidencia de complicaciones. Eldridge y Bell realizaron una revisión de la bibliografía en 1991,

recogiendo las complicaciones de 388 alargamientos con el método de Wagner, 72 con el de De Bastiani y 192 con el de Ilizarov (76). La incidencia de complicaciones fue del 95%, 18% y 33% respectivamente. La incidencia de complicaciones con el fijador circular de Ilizarov tiende a ser algo más elevada que con el fijador monolateral cuando se realiza osteogénesis a distracción, pero inferior a las observadas con la técnica de Wagner (77). Como en muchos procedimientos quirúrgicos la curva de aprendizaje influye en la incidencia de complicaciones (77,78). Parece ser que la incidencia de complicaciones mayores es la que más disminuye con la experiencia del cirujano, mientras que las complicaciones menores es constante (Figura 24) (78).

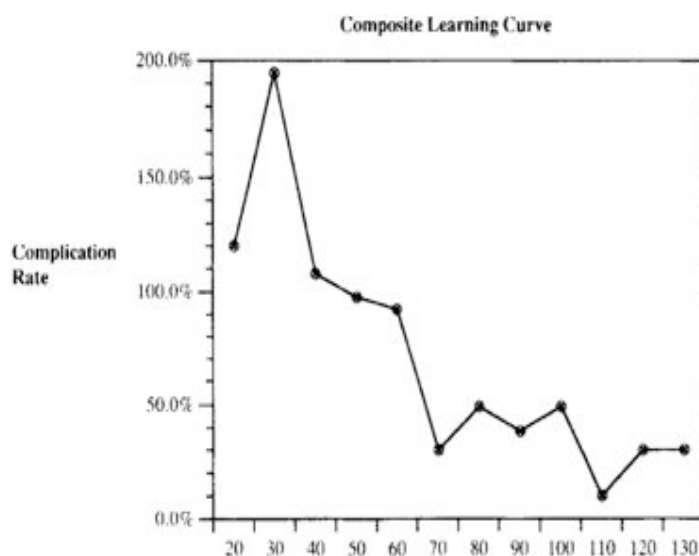


Figura 24. Gráfica que muestra el porcentaje de complicaciones mayores en función del número de cirugías acumuladas (78).

1.5.1. Complicaciones del sistema de fijación-distracción

Las complicaciones relacionadas con el fijador externo pueden darse en el sistema de distracción del fijador o en los clavos y su punto de inserción. Las complicaciones más frecuentes son las que afectan a los clavos, el aflojamiento del clavo y la infección de la entrada del clavo (75,76,78). Son menos frecuentes las rupturas de clavos. Tampoco son frecuentes las complicaciones del sistema de distracción o de los anclajes del clavo al sistema distractor.

a) Complicaciones de los clavos

El aflojamiento de los clavos de la fijación externa supone la pérdida de fuerza de sujeción en la interfase hueso-clavo. La situación ideal es que el clavo se enrosque en

hueso cortical maduro (79). El aflojamiento del clavo está provocado por circunstancias que empeoran el anclaje primario a hueso sano. La interfase clavo-hueso puede dañarse durante la inserción del clavo, debido a la necrosis térmica o a la mala adaptación de la rosca del clavo al labrado de la terraja (80).

El micromovimiento entre el hueso y el clavo provoca que el espacio entre el metal y el hueso se rellene con tejido fibroso. Este tejido fibroso es colonizado por osteoclastos, fibroblastos y condroblastos (81). Esta reacción biológica puede contribuir al aflojamiento. En situación de estabilidad mecánica el espacio metal hueso se coloniza por células osteogénicas que mantendrán anclado clavo.

La repercusión biomecánica del aflojamiento de un clavo durante la elongación ósea es el aumento de la inestabilidad, lo que aumenta sus posibilidades de fracaso del montaje de fijación externa. En un modelo experimental con fijación externa de cuatro clavos se estudió la rigidez del fijador durante la carga axial cíclica, durante fuerzas de flexión y fuerzas de torsión, variando la configuración del fijador y simulando aflojamiento de distintos clavos (82). Se observó que si se produce un aflojamiento de 1 clavo existe una pérdida de la rigidez del montaje de un 23% y una sobrecarga para el siguiente clavo del 60%, circunstancia que puede incrementar sus posibilidades de aflojamiento y fracaso. Si son dos los clavos aflojados el montaje pierde un 57% de su rigidez axial.

El aflojamiento de los clavos puede ser evaluado mediante radiología simple (Figura 25). Las reacciones observables por radiología simple pueden ser formación de más hueso, reacción perióstica, osteolisis o la combinación de las anteriores. La presencia de un halo radioluciente alrededor en un clavo traduce una situación de reabsorción ósea y por tanto una movilización o infección (83).

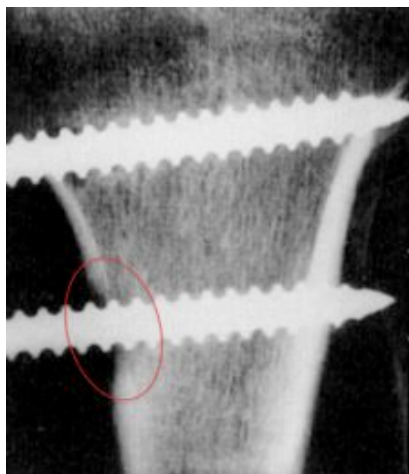


Figura 25. Osteolisis en la entrada de un clavo roscado aflojado.

Una radiolucencia igual o mayor de 0.5 mm alrededor del clavo es la medida más sensible del fallo de la interfase metal-hueso (79).

La infección de los puntos de entrada del clavo es la complicación más frecuente de la fijación externa (76). La incidencia de infección es muy variable dependiendo de las series (80), estando muy relacionada con la duración de la fijación. La incidencia de infecciones de los clavos es del 22% con la técnica de Wagner, 2% con la técnica de De Bastiani y del 10% en fijación externa circular (76). Está descrita una incidencia de 5% de infección en las fijaciones de menos de 3 semanas de duración (84). La acumulación de detritus epiteliales en la interfase clavo-piel deteriora el drenaje de ese espacio y aumenta la posibilidad de infectarse (80).

La rotura de los clavos se produce por fatiga del material tras la aplicación de cargas cíclicas repetidas, su incidencia es relativamente baja (76). La ruptura suele suceder en la unión de la porción lisa y la roscada (80).

b) Complicaciones en el sistema de distracción

En el fijador pueden producirse fallos en las mordazas o anclajes de los clavos. En fijadores con sistema de anclaje móvil móviles, como el de Orthofix®, el Wagner o el Lazo-Cañadell, se pueden dar movimientos de entre el sistema de anclaje de los clavos y el sistema de distracción o cuerpo (85). Algunos fijadores incorporan el anclaje de los clavos al propio sistema de distracción, como el Orthofix®, para evitar el aflojamiento por sollicitación mecánica entre piezas móviles. La rotura del sistema distractor es un fenómeno infrecuente (80).

1.5.2. Complicaciones músculo-tendinosas

La incidencia de complicaciones relacionadas con el músculo y los tendones es elevada. El estiramiento y tracción de los grupos musculares, así como la transfixión por los clavos de fijador pueden ser causa de estas complicaciones. Se pueden dar dos variantes de complicaciones músculo-tendinosas. La primera de ellas es la contractura progresiva muscular por la distracción, la segunda es el aumento de la fibrosis del tejido muscular alargado. Las contracturas musculares son las complicaciones más frecuentes, y se relacionan con la velocidad y con el ritmo de alargamiento (86). Los músculos largos biarticulares se ven especialmente afectados, debido a la diferente longitud de sus fibras (87).

La consecuencia más frecuente es que el músculo va quedando relativamente corto respecto al segmento óseo elongado (74). Entre los factores que se han estudiado como causa de este fenómeno está la velocidad de alargamiento y la longitud total elongada, Además la técnica quirúrgica es importante, la transfixión de fáscias y tendones provoca más contracturas (87).

Ante determinadas contracturas como la del tríceps sural, que puede conllevar un pie equino, se pueden planificar tenotomías en el mismo procedimiento (Figura 26), durante la elongación o al final de la misma (88,89).

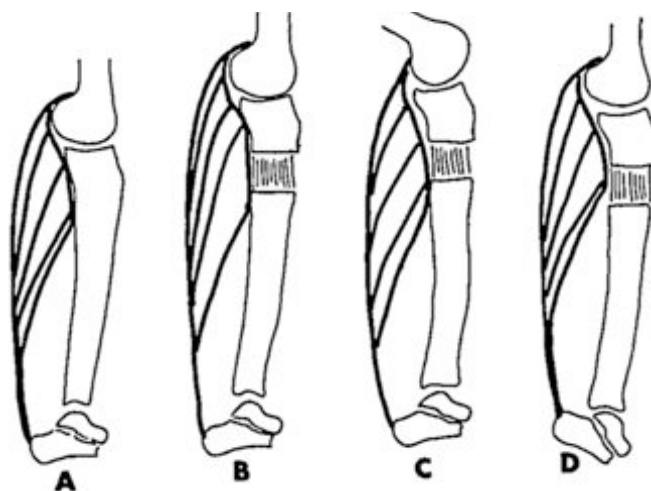


Figura 26. Mecanismo del equinismo en alargamientos tibiales.

En el muslo la contractura de los músculos isquiotibiales son causa del flexo de rodilla y los responsables de la verticalización de la pelvis en el alargamiento femoral de los pacientes acondroplásicos. La contractura de los aductores puede provocar una adducción progresiva del fémur, lo que puede contribuir a luxar la cadera. El recto anterior contracturado puede ser causa de flexo de cadera. Las pérdidas de balance articular en la rodilla son más frecuentes al utilizar fijaciones circulares en el fémur distal. Autores como Vilarubias han propuesto tenotomías y fasciotomías profilácticas para evitar la aparición de estas contracturas (90), sin embargo otros autores han propuesto la deambulación precoz y fisioterapia intensa para prevenirlas (77). Además de la contractura existen unos cambios histológicos en el músculo que sufre una elongación, con velocidades de elongación superiores a 1mm/día se producen cambios histológicos y fibrosis muscular (91). Según algunos estudios experimentales la función y fuerza muscular de la extremidad elongada puede no recuperarse del todo (92).

1.5.3. Complicaciones neurovasculares

Tanto durante la cirugía como durante la elongación pueden producirse lesiones neurovasculares. Las lesiones intraoperatorias más frecuentes pueden producirse por las agujas o clavos al lacerar estructuras neurovasculares (76), o al realizar la osteotomía (74).

La incidencia de estas lesiones nerviosas varía entre el 5 y el 30%. Estas lesiones suelen estar relacionadas con los clavos o agujas, más frecuentemente al utilizar múltiples agujas transfixiantes (76). El nervio radial presenta riesgo de lesión en los alargamientos humerales durante la colocación de los clavos más distales (57,74). Durante el procedimiento de alargamiento se han registrado alteraciones electromiográficas sin traducción clínica, especialmente en el nervio ciático poplíteo externo (93). Cuando son sintomáticas suelen presentarse como dolor, seguida de hipoestesia, posteriormente paresia, y finalmente parálisis (74). La causa puede ser el choque del clavo con el nervio durante la elongación, el estiramiento del nervio, o formas subagudas de síndrome compartimental de la extremidad (94).

Las complicaciones vasculares son más infrecuentes. En la cirugía pueden ser debidas a la laceración de un vaso con el clavo o aguja. Cuando se dan tras la cirugía pueden ser debidas a que la punta de un clavo o aguja ha provocado una erosión que puede causar una ruptura del vaso o un pseudoaneurisma (76). El edema de la extremidad es relativamente frecuente (74,76). Los sistemas circulares con agujas transfixiantes presentan una mayor incidencia de complicaciones vasculares por el mayor número de elementos metálicos atravesando compartimentos musculares (77).

1.5.4. Complicaciones articulares

A nivel articular las complicaciones que pueden surgir son de dos tipos. El primer tipo es la tendencia a la inestabilidad articular que puede llegar a subluxar la articulación, debida a la contractura asimétrica de grupos musculares agonistas y antagonistas. El segundo tipo es la lesión del cartílago articular, debida a presiones excéntricas sobre la superficie articular y producidas por el desequilibrio de fuerzas musculares (Figura 27) (95).

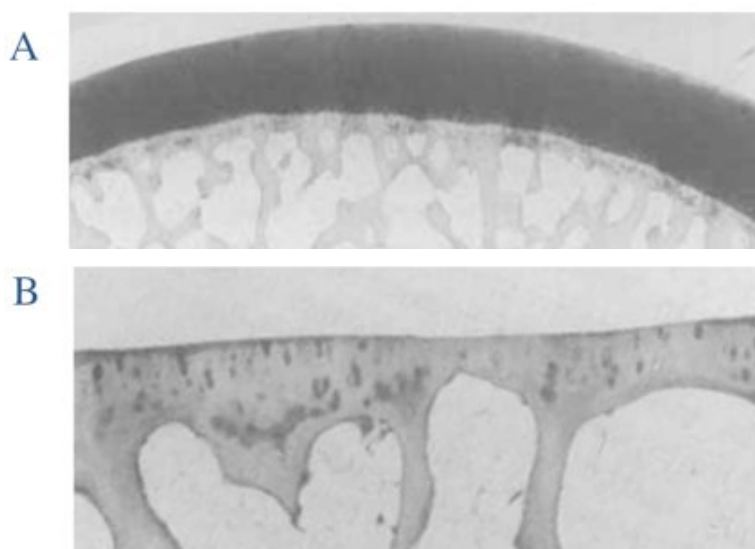


Figura 27. Histología del cartílago articular de la rodilla de perro. En el corte A se observa la estructura del cartílago sano, y en el B la vacuolización del cartílago tras la elongación femoral (95).

La articulación que se ha descrito con mayor incidencia de complicaciones durante los alargamientos es la rodilla. Es debido a que es una articulación relativamente inestable, pero también es debido a la influencia de grupos musculares biarticulares (96). La rodilla está a riesgo de sufrir complicaciones tanto en los alargamientos tibiales como femorales, sin embargo está más a riesgo cuando se realizan importantes alargamientos femorales (97). En los alargamientos femorales se puede perder tanto flexión como extensión, esta última es de mayor trascendencia ya que además de que cuesta más recuperarla se asocia a subluxación posterior de la rodilla (74). Se recomienda detener la elongación si se detecta una contractura con un déficit de extensión de -10° o una flexión menor a 30° (32). Para evitar la subluxación algunos autores recomiendan mantener la pierna en extensión durante la elongación, ya que atribuyen el efecto de la subluxación a la potente contractura de los isquiotibiales (Figura 28) (86,89). Para el tratamiento de la subluxación se pueden realizar tratamientos ortopédicos de ferulización, pero en ocasiones debe ser corregida quirúrgicamente con tenotomías o con fijadores que puenteen la rodilla (96).

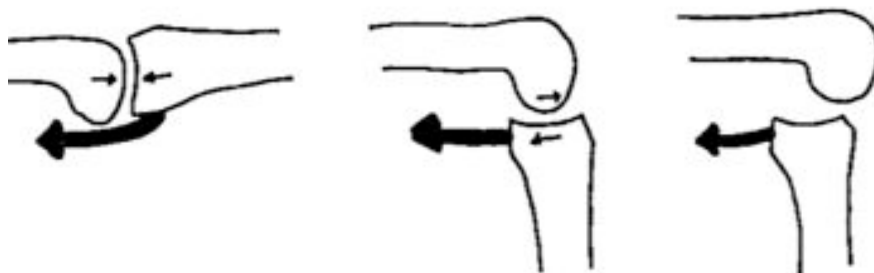


Figura 28. Mecanismo por el que se puede producir la subluxación de la rodilla.

Dada la estabilidad de la articulación coxo-femoral son menos frecuentes los fenómenos de subluxación, aunque si esa estabilidad está deteriorada por una displasia acetabular o ya está subluxada antes del alargamiento pueden darse complicaciones relacionadas con la cadera (40).

El tobillo también es susceptible de sufrir complicaciones durante un alargamiento tibial. Sus potenciales complicaciones se deben a la contractura que sufre el tríceps sural durante la elongación, a la que se suma la contractura del músculo tibial posterior, teniendo como efecto el equinismo y varo. También puede surgir una subluxación lateral del astrágalo por ascenso del maleolo peroneal, que sufre un acortamiento relativo en relación a la tibia que está siendo alargada. Los casos de alargamiento tibial a los que se les practica tenotomías del Aquiles profilácticas junto con atornillado transindesmótico distal presentan menor incidencia de complicaciones articulares del tobillo (63).

Cuando se lleva cabo un alargamiento femoral se pueden afectar la cadera y la rodilla. De los grupos musculares que influyen en la cadera, sólo los aductores carecen de un origen por encima de la articulación coxo-femoral, circunstancia que condiciona que osteotomías femorales proximales creen más hiperpresión en la articulación que si se hiciesen distales a la inserción de los aductores. Si se realiza una osteotomía femoral distal, debido a que parte de los músculos del cuádriceps tienen su origen en la diáfisis femoral el fenómeno de hiperpresión se sufrirá en la rodilla (98). La recomendación es evitar osteotomías proximales si se sospecha subluxación o inestabilidad de la cadera (98).

Se sabe que elongaciones femorales importantes producen un deterioro del cartílago articular por las cargas excéntricas debidas a la contractura asimétrica de los distintos grupos musculares (95).

1.5.5. Complicaciones de la osteotomía y del callo de elongación

El procedimiento de la osteogénesis a distracción implica la formación de un callo de elongación sin que se produzca una consolidación precoz de la osteotomía. Sin embargo una maduración más lenta de lo debido puede conducir a una consolidación tardía y una prolongación de la duración del procedimiento. Durante el procedimiento se pueden dar desviaciones axiales por mala alineación de los fragmentos o mala realización de la osteotomía. Bien durante el procedimiento como tras la retirada del fijador se pueden sufrir fracturas de hueso neoformado, lo que se suele deberse a una precaria maduración ósea.

a) Consolidación precoz de la osteotomía

La osteotomía puede consolidar precozmente como una fractura, debido a una osteotomía incompleta, a un período de latencia prolongado o a una velocidad de elongación insuficiente (16,76,77). Otro factor es la edad del paciente, ya que el potencial regenerador de la edad pediátrica puede condicionar una consolidación precoz (97). Para evitar esta complicación debe asegurarse la correcta realización de la osteotomía y debe adaptarse tanto el período de latencia como la velocidad de elongación a la edad biológica del paciente.

b) Retraso de consolidación

El retraso de consolidación puede atender a causas técnicas o biológicas (97). Para el grupo del Profesor Cañadell el retraso de consolidación supone un 5% de los casos, y la pseudoartrosis entre el 1 y el 2%. No existe una clara definición temporal del retraso de consolidación. El tiempo medio que se considera necesario para una consolidación es de 36 días por centímetro alargado para el fémur y 40 días para la tibia (16). Hay autores que consideran el retraso de consolidación cuando se superan los 50 días por centímetro (99). La actitud inicial cuando se observa una escasa formación de callo es disminuir la velocidad de distracción (74). El empleo de campos electromagnéticos parece no haber resuelto este problema (100). El empleo de sistemas de dinamización axial parece disminuir los retrasos de consolidación y aumentar la maduración del callo de elongación (27). Las escasas pseudoartrosis suelen requerir cirugía abierta con aporte de injerto y osteosíntesis (76,97).

c) Fracturas del regenerado

Debido a los largos períodos de inmovilización y restricción de la carga, junto con las peores propiedades biomecánicas del segmento alargado estos pacientes presentan riesgo de sufrir fracturas una vez se ha retirado el fijador (97). La fractura puede darse de modo agudo, como una desviación axial progresiva o como una pérdida de longitud del segmento elongado (75,77,89,97). Existen descritas diversas incidencias de fracturas tras un alargamiento, dependiendo de las series revisadas las incidencias son del 0 al 10% (16,76,78). Las fracturas descritas son casi todas precoces, apareciendo la mayoría durante la semana después de la retirada del fijador. Entre algunos de los factores que se han

relacionado con las fracturas tras la retirada del fijador se encuentra la deformidad en varo del hueso elongado, la rigidez de rodilla y situaciones de osteoporosis u osteopenia (75).

Los patrones de fractura descritos son diversos, fracturas en el callo de elongación, en la unión entre el callo y la diáfisis o colapso progresivo de la zona alongada. Aunque la mayoría de las fracturas se dan en las semanas siguientes a la retirada del fijador conviene advertir al paciente y su familia sobre la mayor fragilidad de la extremidad durante meses, puesto que se han descrito fracturas tardías (Figura 29) (24,32).



Figura 29. Fractura a los 13 meses tras la retirada de fijador (24).

La causa más importante por la que se producen estas fracturas es la retirada precoz del fijador, presentando el callo una situación de insuficiencia biomecánica. Aspectos que deben evitarse son las deformidades axiales, la osteopenia y la rigidez articular, debiéndose realizar carga sobre la extremidad afectada (101). El criterio radiológico de retirada del fijador suele ser la presencia de tres corticales en proyecciones anteroposterior y lateral o la corticalización de tres cuartas partes del callo (32,76). Entre las pruebas complementarias que se pueden emplear adicionalmente se encuentra la Tomografía Computerizada, que además de definir mejor la morfología cortical del callo puede estimar la densidad mineral ósea (102,103). Aldegheri proponía demorar la retirada de los clavos una vez se ha retirado el sistema de fijación-distracción, para comprobar la estabilidad entre los segmentos óseos y poder corregir alguna desviación axial que apareciese en las siguientes semanas (104).

d) Deformidades angulares

Uno de los problemas más frecuentes en los alargamientos es la tendencia a la desviación axial. Se siguen presentando desviaciones axiales pese al uso de dos o tres clavos por fragmento o el uso de fijadores circulares (Figura 30) (23,24,47,74-76,101).

La deformidad angular que se observe depende especialmente del tipo de osteotomía y del hueso en el que se ha realizado. Las osteotomías femorales a nivel proximal tienden a deformarse en varo en el plano coronal y en antecurvatum en el plano sagital. Cuando se realizan a nivel distal la deformidad suele ser en valgo y antecurvatum. La osteotomía tibial proximal tiende a desviarse al valgo y antecurvatum, mientras que las distales tienden a deformarse en varo y antecurvatum (74-76). Las osteotomías humerales distales a la V deltoidea la tendencia angular es al varo (57).

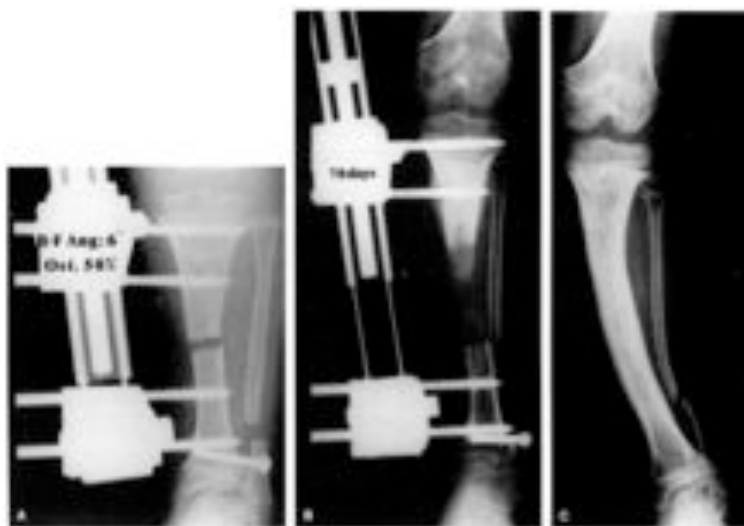


Figura 30. Deformidad en valgo por angulación y translación (23).

Aunque la desviación angular se da con más frecuencia con fijadores monolaterales también están descritos en circulares (86,88,99). Sin embargo el fijador circular permite la corrección angular de un modo más eficaz durante el mismo procedimiento de elongación, puesto que se puede realizar distracción asimétrica. Aunque la mayoría de las deformidades angulares se dan durante el proceso de la distracción, también se pueden dar tras la retirada del fijador, como se ha comentado en el anterior apartado (85).

Al igual que el resto de complicaciones la incidencia varía de las deformidades angulares varía con las series, estando descritas incidencias desde el 0 al 58% (77,85,86,95). De las series realizadas con fijador circular se ha publicado una incidencia del 10% con deformidades angulares de 5 a 10° (95), aumentando la incidencia hasta el

45% en otra serie publicada en la que se habían llevado a cabo elongaciones de mayor magnitud (105). Con fijador monolateral se publicó una incidencia de deformidades angulares del 29% en fémur, todas en varo, y del 22% de deformidades en tibia, todas en valgo (24). Sin embargo Leyes calculó una incidencia superior a la citada en tibia con fijador monolateral, del 54% en 93 pacientes (23).

Algunos autores consideran deformidades angulares significativas angulaciones superiores a 5° en el plano coronal (74), otros establecen el límite en 10° (23,85,101). Uno de los argumentos a favor de establecer el límite entre las angulaciones citadas viene de los trabajos de Sarmiento del tratamiento conservador de las fracturas de tibia, en los que afirmaba que deformidades de 5° no alteraban la función de la extremidad (106). Otros autores establecen el límite tolerable en 10° de varo y 15° de valgo.

Se han ido desarrollando distintas medidas para prevenir las deformidades angulares. Algunos autores han propuesto colocar los clavos con una inclinación entre 5 y 10° contraria a la deformidad esperada para esa osteotomía y segmento óseo (74,76). Otros autores han propuesto fijar tras la tibia en leve varo y el fémur en valgo (47). El fijador de alargamientos de Orthofix® ha incluido las mordazas de anclaje de los clavos dentro del cuerpo, para evitar el micromovimiento entre piezas móviles de la mordaza y el cuerpo, y así aumentar la rigidez del montaje (99). También se han propuesto dobles osteotomías y elongación a dos niveles, que pueden aumentar la complejidad del procedimiento (107).

2. OSTEOGÉNESIS

2.1. Esqueletogénesis: osificación intramembranosa y endocondral

El esqueleto de los animales vertebrados está dividido en el esqueleto apendicular y el esqueleto axial. El esqueleto axial está compuesto por los huesos que forman el cráneo, la columna vertebral, el esternón y las costillas, mientras que el esqueleto apendicular es el formado por los huesos de las extremidades (108). A su vez el cráneo se divide en dos subunidades. El condrocraqueo está formado por huesos que se desarrollan a partir de cartílago, e incluye la base del cráneo y los huesos que forman el oído interno. La bóveda craneal y los huesos faciales se desarrollan a partir de células mesenquimales indiferenciadas, que se transforman directamente en hueso sin pasar por ningún estadio cartilaginoso.

Las células que formarán el esqueleto durante la embriogénesis provienen de tres linajes celulares distintos. La cresta neural contribuye con las células que formarán el esqueleto cráneo-facial. Las células que formarán parte del esqueleto axial provienen del esclerotomo. El esqueleto apendicular se desarrollará a partir de la placa lateral del mesodermo. Estas células de tres linajes distintos contribuyen en el proceso de la embriogénesis del esqueleto en cuatro fases. La primera fase es la migración de estas células a los lugares donde debe darse la embriogénesis ósea. La segunda fase es la interacción entre células de distinto origen (epitelial y mesenquimal). La tercera fase es la formación de condensaciones de células. La cuarta y última fase es la diferenciación de estas condensaciones celulares, a condroblastos u osteoblastos (Figura 31) (109).

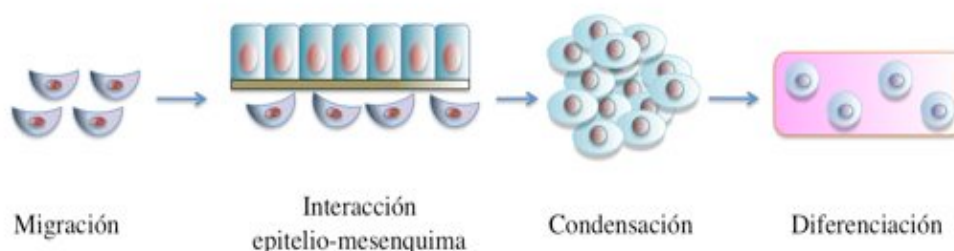


Figura 31. Fases del desarrollo del esqueleto.

La formación del hueso que es debida a la maduración de un molde formado inicialmente por cartílago se denomina osificación endocondral. Este proceso consta de diversos pasos que incluyen la inicial formación de un molde cartilaginoso y posterior

degradación de la matriz para ser sustituida por hueso. Es un proceso que se da tanto en la embriogénesis como en la vida adulta durante la reparación de las fracturas y el crecimiento postnatal. La osificación intramembranosa difiere de la endocondral en que se produce en ausencia de blastema cartilaginosa, mediante la osificación producida por osteoblastos directamente transformados de condensaciones celulares mesenquimales.

La organización y morfología del esqueleto viene determinada por una serie de fenómenos inductivos. Estos fenómenos inductivos regulan la formación de matriz extracelular por parte de poblaciones celulares selectivas.

2.3.1. Migración e interacción de las células de las distintas hojas blastodérmicas

a) Esqueleto axial

En la embriogénesis del esqueleto axial se produce un fenómeno de segmentación de las estructuras musculo-esqueléticas y neuromusculares. El origen de este plan embriológico es la segmentación del mesodermo paraxial (110). Este mesodermo paraxial dará lugar en los animales vertebrados al esqueleto axial, la pared torácica y abdominal y la musculatura axial y de extremidades. Estas dos barras simétricas de mesodermo axial sufren una serie de cambios moleculares y morfogenéticos que conducirán a la segmentación simétrica de pares de bloques mesodérmicos, denominados somitas (Figura 32).

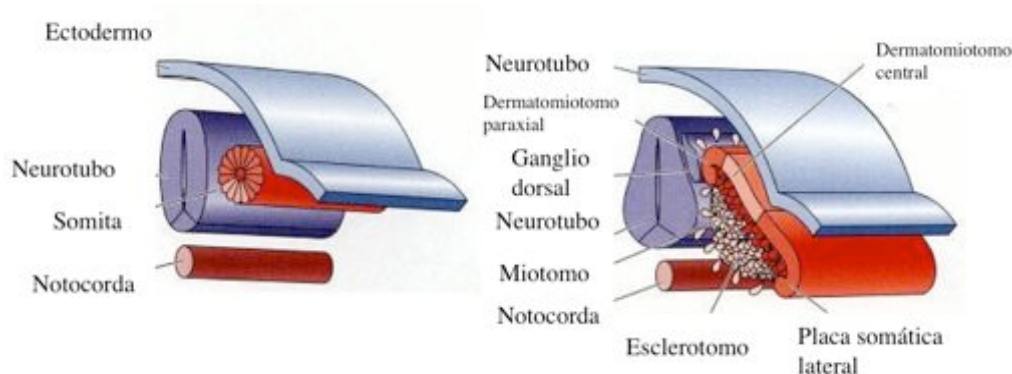


Figura 32. Embriogénesis del esqueleto axial y formación del esclerotomo.

La somitogénesis, ocurre secuencialmente en dirección cráneo-caudal. La regulación de la segmentación y somitogénesis viene determinada por el mesodermo presomítico, que expresa unas determinadas moléculas a un determinado ritmo, lo que se ha denominado

“reloj de la segmentación” (111). Otro de los mecanismos reguladores de la segmentación es el sistema Notch/Delta (112).

La correcta diferenciación según el nivel axial depende de la integración de dos niveles de información (110), uno son las señales locales, el otro está contenido en la familia de genes HOX. Todos los animales vertebrados, incluidos los mamíferos, presentan múltiples genes HOX. En los vertebrados se han identificado cuatro agrupaciones de genes HOX (HOXA, HOXB, HOXC y HOXD) y concretamente en el ser humano hay 39 genes HOX. De este modo la formación de unidades segmentarias con características morfológicas distintas es posible mediante la acción de los distintos genes HOX (113).

En la semana cuarta del desarrollo en el mamífero, las células de los somitas migran a la región más ventral, junto a la notocorda, formando el esclerotomo ventral. Estas células mesenquimales se diferenciarán hacia precondrocitos y formarán el cuerpo vertebral y las costillas. La molécula SHH (Sonic hedgehog) producida por la notocorda, señala y realiza una función inductiva sobre el tubo neural y la formación del esclerotomo (114). La segmentación se inicia mediante la condensación de células del esclerotomo en lo que serán los futuros discos intervertebrales. En el espacio entre dos discos degeneran las células notocordales, prácticamente desapareciendo y dando lugar al cuerpo vertebral, mientras que dichas células notocordales permanecerán en el núcleo pulposo del disco intervertebral.

El esqueleto craneofacial se desarrolla a partir de células pluripotenciales de los arcos branquiales procedentes de la cresta neural. Estas células de la cresta neural migran a la región craneo-facial formando condensaciones mesenquimales que darán lugar a cartílago o hueso dependiendo de la región. No existe una descripción de biología molecular tan rica como la de la embriología del raquis para la embriogénesis craneo-facial. La mayoría de las descripciones son de la fisiopatología de las malformaciones craneo-faciales (115). El hecho de que impere la osificación intramembranosa en el cráneo facial parece explicarse por su origen en las células pluripotenciales de la cresta neural.

b) Esqueleto apendicular

Junto al mesodermo de los somitas se encuentra el mesodermo intermedio, que dará lugar a la formación del sistema urogenital. A partir del segundo mes el embrión

presenta un desarrollo de las placas laterales del mesodermo, donde las células se encuentran en proliferación para formar las extremidades (Figura 33).

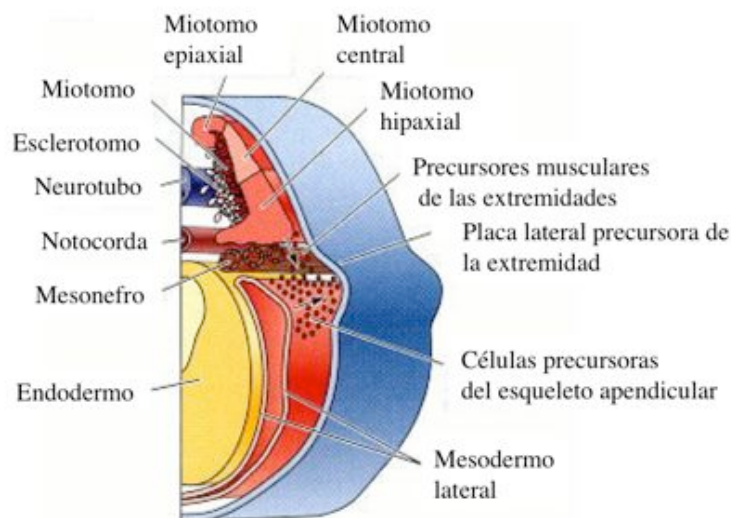


Figura 33. Desarrollo de las placas laterales.

El desarrollo de las extremidades en los vertebrados se produce en tres ejes. Una gran variedad de factores de transcripción, factores de crecimiento y moléculas de adhesión participan en el orquestado desarrollo de las extremidades del mamífero. El primer paso es el inicio y desarrollo del lugar donde la extremidad se desarrollará, y depende estrechamente del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF). En la placa lateral de mesodermo se expresa FGF-10, que hace sensible a receptores específicos para el FGF-2 en el ectodermo adyacente. Este paso parece ser esencial para el inicio de la formación de la extremidad, como muestran estudios en los que la desactivación del FGF-10 impide el desarrollo de la extremidad (116). La función del FGF-4 y FGF-8, expresado por la banda ectodérmica apical, estimula al mesodermo subyacente a seguir expresando el FGF-10, gracias a lo cual la extremidad se desarrolla en longitud. Las células mesenquimales que se encuentran bajo la banda ectodérmica apical mantiene su carácter indiferenciado, denominándose zona de progresión, y como la extremidad inicia el crecimiento en longitud la células proximales a la zona de progresión se condensan y se diferencian a cartílago. Los genes *HOXA* y *HOXD* determinan la localización e identidad de la extremidad (117).

2.1.2. Condensación mesenquimal

La condensación de células mesenquimales tendrá como consecuencia la formación de un molde de cartílago y posterior osificación endocondral o la directa osificación intramembranosa a partir de la condensación de células mesenquimales sin pasar por el

estadio cartilagenoso. Estas condensaciones celulares condicionan no solo la posición de los distintos elementos óseos sino también su forma. La formación de estas condensaciones se produce tras la agregación de las células mesenquimales dispersas previamente, y con la participación esencial de las familias de genes SHH, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-7, FFG y HOX. La fase de la condensación puede entenderse como la consecución de distintos pasos entre los que se encuentran la iniciación, proliferación, adherencia, crecimiento y finalmente diferenciación (109).

La iniciación del proceso tiene lugar como resultado de la interacción entre las células epiteliales y mesenquimales, que desencadena la expresión de un número de moléculas relacionadas con las condensaciones precondrogénicas y preosteogénicas como la tenascina, la fibronectina, N-CAM y la N-cadherina. El factor transformante del crecimiento TGF- β y otras moléculas de la superfamilia del TGF- β regula muchos de los aspectos del crecimiento y diferenciación en este proceso. Tanto el TGF- β en sus distintas isoformas, como otras moléculas relacionadas como activinas e inhibinas o las BMP potencian la condensación mediante la promoción de interacciones célula-célula y célula-matriz (118). La adhesión de células a la superficie de otras células o a proteínas de la matriz extracelular constituye el paso previo en la condensación para la formación anclajes intercelulares que permitan la supervivencia y la diferenciación ulterior. Las moléculas denominadas integrinas proporcionan anclaje a la membrana bilipídica celular y a la matriz extracelular, pudiendo no sólo realizar anclajes célula-célula o célula-matriz sino también desencadenar respuestas intracelulares e incluso modificar la expresión del material genético. Existen integrinas que tienen una expresión precoz en la fase de condensación, como la $\alpha 5$ - $\beta 1$ (se ancla a fibronectina), la $\alpha 1$ - $\beta 1$, la $\alpha 2$ - $\beta 1$, la $\alpha 10$ - $\beta 1$ (se anclan al colágeno tipo II y IV), $\alpha 6$ - $\beta 1$ (se ancla a la laminina) o la $\alpha 6$ - $\beta 1$ (se ancla a vitronectina y osteopontina) (119).

Tras producirse la interacción y anclaje entre células, y orquestado por la expresión de genes condrogénicos, se incrementa el AMPc intracelular. La transcripción del factor SOX-9 es un potente inductor de la activación de los genes requeridos para la formación del cartílago como el del colágeno tipo II y agregano,. La transcripción del SOX-9 se inicia con la fosforilación de su cebador mediante Proteína Kinasa A (PKA).

La expresión de SOX-9 se inicia en las células mesenquimales precondrogénicas y encuentra su nivel más elevado en los condrocitos diferenciados. Las células deficientes

en SOX-9 son excluidas del cartílago pero se disponen alrededor de la masa de cartílago como mesenquima.

Cuando cesa la condensación se inicia la fase de diferenciación, proceso en el que se expresa el RUNX-2, factor de transcripción presente en poblaciones celulares precondrogénicas y preosteogénicas. Una vez se inicia la diferenciación la expresión del RUNX-2 se ve limitada a las células preosteogénicas, siendo menor en los linajes condrogénicos (120). La condensación celular mesenquimal que se diferencia a condroblastos inicia la producción de una matriz extracelular muy rica en colágeno tipo II y mucopolisacáridos. En contraste las células osteogénicas producen una cantidad variable de colágeno tipo I y otras proteínas que se depositarán en la matriz extracelular.

2.1.3. Osificación intramembranosa

La formación de hueso mediante osificación intramembranosa se lleva a cabo debido a la directa transformación de células mesenquimales en osteoblastos. Este tipo de osificación es el responsable de la formación de los huesos planos de la bóveda craneal, incluidas las suturas craneales, algunos huesos faciales, la mandíbula y la clavícula. Al igual que sucede en el cartílago, las células osteogénicas serán estimuladas por el epitelio adyacente (109). El cierre de las suturas craneales depende de la presencia de factores de crecimiento y factores de transcripción como BMP-4, BMP-7, FGF-9, TWIST y MSX. Estos factores se encuentran en gradiente de concentración en el tejido mesenquimal que rellena la sutura.

Otros ejemplos de osificación intramembranosa, además de los huesos planos del cráneo, son la osificación que se da tras amputaciones en la edad infantil precoz, la osteogénesis a distracción en condiciones biomecánicas óptimas y la de consolidación de fracturas en reducción anatómica y estabilidad absoluta.

2.1.4. Osificación endocondral

El esqueleto axial y apendicular se desarrolla a partir de un blastema cartilaginosa mediante una serie de pasos que se denominan osificación endocondral. El cartílago es un tejido que presenta la posibilidad tener un crecimiento intersticial, por división de los condrocitos (108). Esta propiedad le permite al cartílago crecer con cierta rapidez. Además el cartílago puede emplear crecimiento por aposición de más cartílago en superficie, mediante el depósito de más matriz extracelular e incluso por alargamiento de

sus células. El crecimiento por aposición es la función principal del pericondrio, el cual envuelve las epífisis y la diáfisis cartilaginosa.

Con el paso del tiempo las células se diferencian a condrocitos, que secretan colágeno tipo II, agreganos y otras proteínas y moléculas de la matriz extracelular propias del cartílago hialino. Tras alcanzar una determinada dimensión, el cartílago comienza a ser invadido por capilares desde el pericondrio, transformando éste en periostio e iniciando una transformación en el cartílago que será posteriormente la diáfisis ósea.

Tras la invasión de los capilares se produce la diferenciación de osteoblastos y se inicia la secreción de colágeno tipo I, de moléculas óseas y de fosfatasa alcalina (Figura 34). La diferenciación de los osteoblastos es debida a que las células precursoras de osteoblastos han invadido el blastema cartilaginoso a través de los capilares. Posteriormente se iniciará la mineralización de la matriz ósea y corticalización de la diáfisis, es el centro de osificación primario.

En una fase fetal tardía y durante la infancia aparecen los centros de osificación secundarios, de un modo similar al de los centros primarios de osificación la invasión de capilares determina la osificación y mineralización del blastema cartilaginoso, pero esta vez en las epífisis.

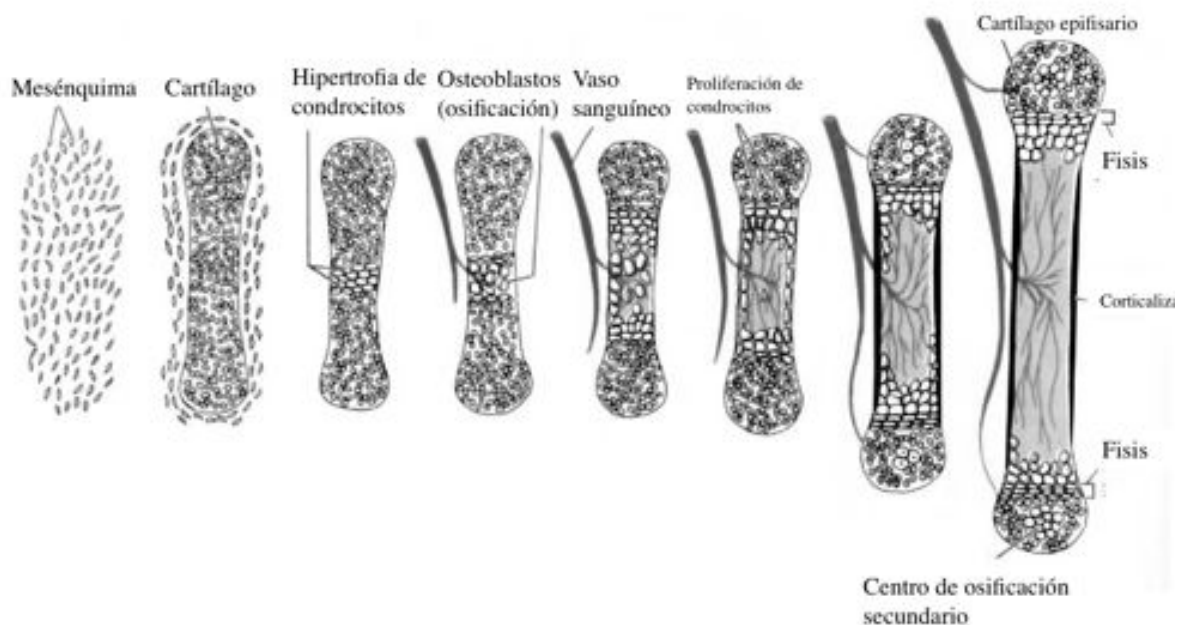


Figura 34. Fases de la osificación endocondral de un hueso largo.

2.2. Reparación de las fracturas y factores influyentes

Se define la fractura como una solución de continuidad del tejido óseo debida a una fuerza directa o indirecta sobre dicho tejido óseo. Desde el momento en que se produce dicha solución de continuidad se inician una serie de procesos encaminados a la curación y recuperación de las propiedades biológicas y físicas de segmento óseo fracturado. Los estadios de la curación de una fractura repiten los pasos de la embriogénesis endocondral de los huesos (122).

Clásicamente se han diferenciado dos tipos de consolidación de las fracturas: consolidación primaria y secundaria (121). La consolidación primaria hace referencia a aquella situación en la fractura es reducida anatómicamente con una correcta aposición de los fragmentos, de modo que existe una curación “osteonal” de la fractura. En este tipo de consolidación los osteoclastos forman conos de avance y cruzan el foco de fractura para remodelar la fractura sin formar callo. Este tipo requiere una estabilidad muy importante y en la práctica clínica no se ve con frecuencia.

Es más frecuente observar lo que se denomina consolidación secundaria, que requiere la presencia de un callo de fractura que proporcionará estabilidad y que posteriormente sufrirá un intenso proceso de remodelación (Figura 35). Por lo tanto, la curación primaria consistirá en osificación intramembranosa mientras que la secundaria será mixta, intramembranosa y endocondral (122).

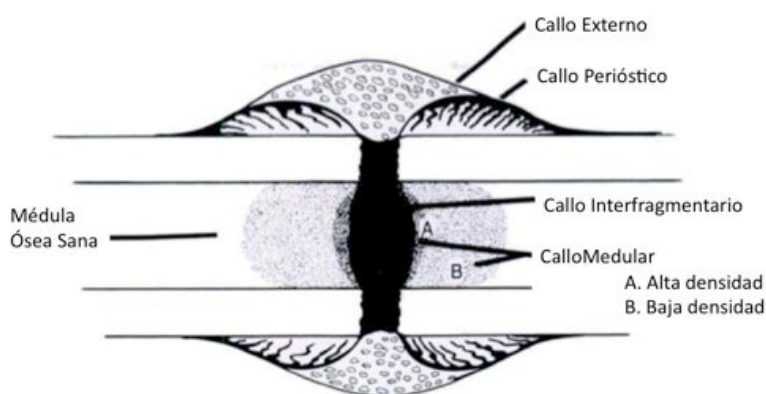


Figura 35. Estructura macroscópica del callo de fractura (123).

El espacio intramedular e intercortical determinarán el desarrollo del callo inicial o blando. Mientras que el espacio subperióstico y las partes blandas adyacentes determinarán la formación del callo duro (123).

Las cinco fases que determinan la consolidación de la fractura son: la formación de un hematoma, la cascada de la inflamación, la angiogénesis, la formación de cartílago (con consecuente calcificación y formación de hueso) y finalmente la remodelación.

Durante la formación y maduración del callo tres procesos se inician simultáneamente, los procesos celulares que iniciarán la formación de hueso calcificado, la neoangiogénesis y la formación de la matriz. Aquellos procesos que condicionen un peor funcionamiento de la compleja cascada inflamatoria inhibirán la curación de la fractura. Las moléculas señalizadoras que intervienen de modo más activo en dicha cascada son la Interleuquina 1 (IL-1) y la Interleuquina 6 (IL-6) (124), el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) (125), el Factor de Crecimiento Análogo a la Insulina (IGF) (126), el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) (127), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) (128) y las Proteínas Morfogenéticas (BMPs) (121,129). Las distintas propiedades de cada uno de los mediadores mencionados se describirán en los siguientes capítulos.

En las primeras horas tras producirse una fractura se forma un hematoma con contenido hemático procedente de los vasos endósticos, periósticos e incluso de las partes blandas adyacentes (124). Este hematoma o coágulo taponará los vasos sangrantes e iniciará el proceso de curación mediante la liberación de las sustancias intracelulares presentes en el interior de las plaquetas. Las células inflamatorias, una vez se ha activado la cascada, segregan IL-1 e IL-6, las cuales tienen efectos proinflamatorios y quimiotácticos.

La familia de las BMPs es muy amplia. Se han detectado varias de estas moléculas en el callo de fractura inicial (24-48 horas de evolución), expresadas por células mesenquimales pluripotenciales (124). Estas moléculas recién expresadas presentan actividad mitogénica, quimiotáctica e inductora de la neoangiogénesis, así como estimuladora de la diferenciación y proliferación de diversas células involucradas en la curación de la fractura. Algunas células endoteliales de la médula ósea iniciarán un proceso de diferenciación a células de fenotipo osteoblástico. Desde el periostio células osteoprogenitoras iniciarán la formación de hueso en los siguientes días siguiendo una osificación intramembranosa. Las células mesenquimales pluripotenciales iniciarán la expresión de BMPs, y éstas inducirán a las células osteoprogenitoras a diferenciarse en osteoblastos.

A partir del 7º día el callo blando va adquiriendo nuevas propiedades mecánicas. Entre ambos extremos óseos se va formando cartílago, con una matriz rica en colágeno tipo II. Mientras la expresión de moléculas como la osteonectina se va haciendo cada vez más presente. A partir del 10-14º día se inicia la expresión de osteocalcina en un callo de mayor dureza. Tanto en la zona perióstica como en el callo endóstico se hace presente una rica proliferación celular. La osteopontina se expresa tanto en los osteocitos como en las células osteoprogenitoras en los límites entre el callo más duro y el cartilaginoso. El pico de formación de colágeno tipo II es al 10º día en ratones y 18º día en el ser humano (124).

Alrededor del día 20-30 la proliferación en la zona del callo perióstico disminuye. La mayoría del colágeno presente es tipo II, aunque ya no hay expresión activa de éste. Y el cartílago presente en el callo endóstico comienza a calcificarse. El callo cartilaginoso reproduce una estructura similar a la placa fisaria con esponjosa primaria y secundaria. A partir del mes se inicia un proceso de apoptosis de las células cartilaginosas, y ambos fragmentos estarán unidos por hueso esponjoso. Las fases siguientes serán de remodelación y corticalización del callo.

Se han descrito una serie de factores esenciales para la curación de una fractura: la presencia de células osteogénicas, aporte sanguíneo, la formación de matriz ósea que rellene el defecto óseo y por último la estabilidad mecánica entre fragmentos. Algunos autores han destacado la necesidad de estos cuatro factores y los cuatro campos de tratamiento en los que se puede intervenir para cambiar la evolución natural (122).

Se han descrito los factores externos contribuyentes e inhibidores de la curación de las fracturas (130). Si bien el sexo, ajustado por densidad mineral ósea, no parece influir en la consolidación de las fracturas, la edad es un factor muy influyente en la capacidad de reparación tisular (131). Comorbilidades como la diabetes parecen influir negativamente en la consolidación de fracturas (132), así como la anemia (133), malnutrición (134), la vasculopatía periférica (135), o el hipotiroidismo (136).

Sobre el uso de antiinflamatorios no esteroideos en las fracturas existe un conflicto de hallazgos en las publicaciones (130). Se ha encontrado un efecto pernicioso sobre la vascularización del callo óseo con inhibidores selectivos de la COX-2 (137). Parece prudente evitar los antiinflamatorios no esteroideos en fracturas, ya que se han encontrado efectos indeseables tanto en los selectivos como en los no selectivos. Los corticosteroides presentan efectos nocivos en la curación de fracturas, retrasando su consolidación (138). Sin embargo por su indicación estos medicamentos rara vez pueden ser retirados durante

el proceso de curación de la fractura. Las estatinas han demostrado presentar efectos beneficiosos en la curación de fracturas (139). Los antibióticos pueden ser necesarios en el contexto de una fractura abierta. El uso de quinolonas y gentamicina se ha relacionado con inhibición del proceso de curación de las fracturas (140,141). Aunque no se ha demostrado clínicamente, si se ha demostrado en conejos que la profilaxis antitrombótica con heparinas de bajo peso molecular inhibe la consolidación de fracturas (142). Otros factores a los que el ser humano está expuesto con frecuencia como el tabaco o el alcohol también se han demostrado perniciosos en la consolidación del callo de fractura (143,144).

La mayoría de fracturas de la anatomía humana se resolverán con una inmovilización mediante un yeso o una ortesis. Sólo una proporción de todas las fracturas deben ser intervenidas, normalmente siguiendo unos criterios entre los que pesa el desplazamiento, la inestabilidad y que se trate de una fractura intraarticular. Existen factores relacionados con el procedimiento quirúrgico que pueden influir en la positiva o negativa curación. Los defectos superiores a dos milímetros contribuyen negativamente al paso final de trabéculas (145). La desperostización agresiva para conseguir una reducción anatómica puede condicionar mayor lesión en el aporte vascular de la cortical diafisaria que la propia fractura (146). El fresado intramedular parece estimular la circulación perióstica proporcionando un aumento del aporte sanguíneo a la cortical (147). La estabilidad es indispensable para la consolidación primaria de una fractura, sin embargo la secundaria se beneficia de algo de movimiento. Dicho movimiento debe ser en la dirección axial, la rotación, cizallamiento o flexión inhiben la consolidación. Si este movimiento es excesivo también inhibirá la consolidación (148).

2.3. Injertos óseos, sustitutos de injerto óseo y estimuladores de la formación del hueso

En la práctica clínica de la cirugía ortopédica y traumatología existen numerosas situaciones en las que se persigue una consolidación ósea o una artrodesis. Para obtener ambas es habitual el empleo de injertos óseos. El injerto autólogo de cresta ilíaca sigue siendo el “gold standard” o patrón de referencia. Sin embargo la morbilidad relacionada con la obtención de injerto autólogo y la cantidad limitada de éste ha conducido al mayor estudio de los injertos de hueso y sus posibles sustitutos (149,150).

Las propiedades del material permiten clasificarlo. Un material osteoconductor proporciona una estructura tridimensional, que permite la proliferación de nuevos capilares en su interior, tejido perivascular y la llegada de células osteoprogenitoras, lo que proporcionará la capacidad de incorporación progresiva del injerto y sustitución progresiva del mismo. Un material se define como osteoinductor cuando estimula la mitosis de células madre mesenquimales indiferenciadas y la diferenciación a células osteoprogenitoras, con la capacidad de generar hueso nuevo (151). Un injerto osteogénico contiene células osteoblásticas viables, capaces de generar una osificación directa, el resto de injerto recluta células pluripotenciales para que ulteriormente generen osteoblastos. Recientemente se ha acuñado el término osteoproducción para expresar la capacidad de las células de formar material óseo (152).

Según la función terapéutica del material al que nos refiramos, y comparándolo con el injerto de cresta, se pueden definir tres funciones. Un extensor de injerto óseo permite emplear menor cantidad de autoinjerto con la misma función de consolidación u osteogénesis. Un intensificador de injerto produce mayor cantidad de hueso al añadirse al injerto autólogo. Un sustituto de injerto óseo puede emplearse en lugar del injerto autólogo con la misma función sobre la formación ósea.

El concepto de osteoinducción fue introducido por primera vez por Marshall R. Urist en 1965 (151). Tras desmineralizar la matriz ósea y eliminar el calcio y fósforo, se obtiene matriz ósea orgánica, que consta fundamentalmente de colágeno tipo I y proteínas no estructurales. El hallazgo experimental llevado a cabo por Urist demostró la formación de hueso nuevo al inocular la matriz ósea desmineralizada en otros tejidos extraesqueléticos. A este fenómeno se le denominó osteoinducción. Esto llevó a la identificación de una proteína que denominaron Proteína Morfogénica Ósea (BMP) de

características osteoinductivas. Posteriormente se trató de identificar y caracterizar a toda una familia de moléculas inductivas. A continuación se describen las opciones actuales de injertos óseos, sustitutos de injerto óseo y estimuladores de la formación de hueso, así como las características fundamentales de cada uno.

2.3.1. Injerto óseo autólogo

El injerto óseo autólogo de cresta ilíaca es el injerto óseo sobre el que existe mayor evidencia de su utilidad y se ha convertido en el “gold standard” o patrón de referencia. Presenta propiedades osteogénicas, al portar células óseas diferenciadas e indiferenciadas, y osteoconductoras, al presentar la estructura tridimensional ósea natural (153). En el injerto óseo autólogo sólo existe una cantidad muy pequeña de BMP, por lo que en sentido estricto no es osteoinductivo. La formación de nuevos vasos viene favorecida por la naturaleza porosa del injerto. A partir del autoinjerto se va depositando hueso nuevo en la zona huésped, dando lugar a lo que se denomina sustitución progresiva del autoinjerto. La cresta ilíaca es el lugar idóneo para su obtención, ya que puede proporcionar una importante cantidad de hueso esponjoso y corticoesponjoso (Figura 36). Sin embargo la cantidad y calidad del hueso ilíaco puede estar reducida en pacientes ancianos con infiltración medular grasa u osteoporosis.

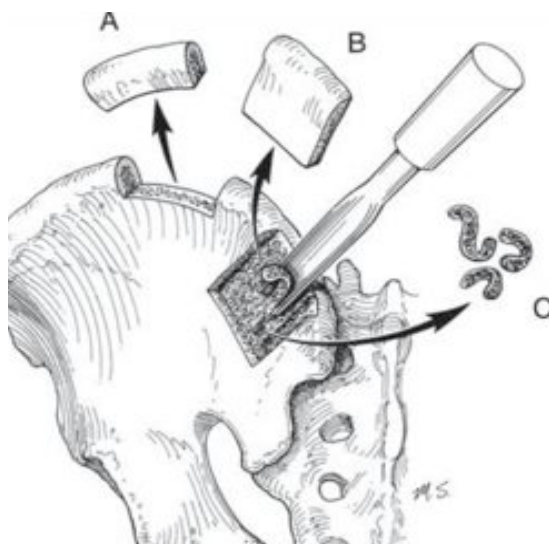


Figura 36. Toma de injerto de cresta ilíaca posterosuperior (A: injerto tricortical; B: injerto corticoesponjoso; C: injerto de esponjosa en chips).

Se ha descrito una morbilidad de la zona donante en el 25-40% de los pacientes. Las posibles complicaciones descritas incluyen dolor crónico, infección, hematoma, fractura, y hernias del contenido abdominal (154).

2.3.2. Aloinjerto óseo

El aloinjerto óseo presenta como principal ventaja su mayor disponibilidad en cantidad, y que no presenta la morbilidad asociada a la zona donante. El aloinjerto óseo fresco presenta osteoblastos activos, lo que le otorga potencial osteogénico. Sin embargo el aloinjerto fresco se utiliza poco debido al tiempo inadecuado para la detección sistemática de enfermedades. El aloinjerto procesado y congelado destruye todas las células y puede deteriorar otros componentes, incluidas ciertas proteínas. Por lo tanto el aloinjerto procesado no presenta características osteogénicas, y sí presenta características osteoconductoras (150).

El uso más frecuente del aloinjerto de hueso es la no consolidación de una fractura, el relleno de defectos de vaciado óseo y las fusiones vertebrales posterolaterales. En estos casos el aloinjerto se emplea como un extensor del autoinjerto de esquirlas óseas locales o de cresta ilíaca. Parece ser idóneo en aquellos casos de escoliosis del adolescente en los que se realiza una instrumentación posterior y se aporta el injerto de modo triturado o en chips de esponjosa (Figura 37) (155). El injerto óseo impactado se emplea con relativa frecuencia en la cirugía reconstructiva de la cadera y rodilla. Se pueden emplear piezas de diáfisis o diafiso-metafisarias para la realización de complejas cirugías de resección tumoral en extremidades (Figura 38) (156).



Figura 37. Chips de esponjosa de aloinjerto.



Figura 38. Aloinjerto estructural de fémur para cirugía reconstructiva tumoral.

El aloinjerto de hueso es extraído de cadáver. Esta circunstancia exige que para el huso de aloinjerto óseo exista un Programa de Donaciones, Extracciones y Transplantes, así como un Banco de Huesos. El equipo de extracción, correctamente entrenado y con los conocimientos necesarios del procedimiento no sólo quirúrgico, realiza la extracción de las piezas necesarias según un protocolo y según las necesidades del Banco de Huesos. El Banco de Huesos se encarga del procesamiento, almacenaje y distribución de las piezas (Figura 39 y 40).



Figura 39. Procesado del aloinjerto.



Figura 40. Almacenaje y congelación.

El principal escollo en el uso del aloinjerto de hueso es la seguridad. La esterilidad es una preocupación importante cuando se emplean aloinjertos, lo cual implica la necesaria extracción aséptica de los tejidos y la investigación sistemática del paciente donante. Pese a estos principios el riesgo de infección no puede descartarse (157). Por lo tanto han de realizarse pruebas serológicas (VIH-1 y 2, VHC, VHB, HTLV-1 y 2). Mediante reacción en cadena de la polimerasa se estudia la presencia de HIV, VHC y B, así como investigación de citomegalovirus y sífilis. Se toman cultivos sistemáticos de la pieza en superficie y endomedular (Figura 41).



Figura 41. Toma de cultivos de pieza epifiso-metáfisaria de tibia proximal.

El procesado del aloinjerto puede realizarse de modos distintos. Con irradiación a bajas dosis (<20kGy), con desbridamiento físico, lavados ultrasónicos o pulsos de agua, tratamiento con etanol o inmersión antibiótica (158). El objetivo del procesamiento es asegurar la esterilización pero preservar ciertas propiedades mecánicas y biológicas. El injerto, tras ser procesado suele congelarse. La temperatura de congelación determina el tiempo máximo de ésta. Las figuras 2 a 6 son cortesía del Dr. Manuel Pérez, responsable de la Unidad de Tumores Óseos y del Equipo de Extracción de Hueso del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

2.3.3. Sustitutos osteoconductivos de injerto óseo

a) Productos cerámicos

Los productos cerámicos se forman por presurización y calentamiento de materiales no metálicos como el fosfato cálcico. Los fosfatos cálcicos son los productos cerámicos más frecuentemente empleados en cirugía ortopédica y traumatología (159-161). Poseen propiedades osteoconductivas, no osteoinductivas, por lo que se emplean como extensores de injerto óseo (149). Presentan como ventaja que no inducen respuesta inflamatoria alguna y no tienen riesgo de transmitir infecciones, además de la ausencia de complicaciones de zona donante. Sin embargo son materiales que pueden presentar baja resistencia a la fractura y a la tensión. Uno de los productos cerámicos reabsorbibles es el fosfato tricálcico. Se puede emplear en forma de bloque, gránulos, polvo o pasta. Los poros de estos productos promueven la vascularización y el crecimiento óseo.

La hidroxiapatita sintética es otro producto sustituto de injerto óseo osteoconductivo de fosfato cálcico cristalino, que se fabrica mediante un proceso de incrustación como producto cerámico. La hidroxiapatita está disponible desde hace algunos años como recubrimiento de implantes de cirugía reconstructiva de articulaciones, especialmente en artroplastia de cadera. Los recubrimientos porosos de hidroxiapatita aumentan la fuerza de fijación del implante al hueso, al permitir el depósito preferencial de hueso nuevo en la interfase hueso-implante.

b) Sustitutos coralinos

El exoesqueleto de algunos corales marinos naturales presenta ciertas semejanzas con la estructura ósea (162). Los vasos recién formados penetran rápidamente en la red porosa del coral. Se procesa de dos modos. Mediante extracción química de todo el componente orgánico del coral, dejando el exoesqueleto de carbonato cálcico. O mediante la conversión del carbonato cálcico en hidroxiapatita mediante una reacción térmica. Los dos procedimientos proporcionan un producto coralino con propiedades osteoconductivas que puede emplearse como extensor de injerto óseo.

c) Matrices de colágeno

El colágeno tipo I es la proteína estructural más importante de la matriz ósea. Su estructura organizada posee propiedades osteoconductivas para el depósito de mineral, la proliferación vascular y la fijación de factores de crecimiento (149). Su capacidad de

soportar cargas y stress mecánico no es suficiente. Los nuevos diseños de matrices tridimensionales van encaminados a superar esta desventaja. Puede tener cierto efecto sinérgico con otras sustancias osteoconductoras y osteoinductivas. Existen varios trabajos en desarrollo que emplean matrices de colágeno como transportador o “carrier” de otras sustancias (163).

2.3.4. Sustitutos osteoinductivos de injerto óseo

a) Matriz ósea desmineralizada

La matriz ósea desmineralizada (MOD) se obtiene mediante la descalcificación del hueso cortical, por un proceso de extracción ácida. En 1965 se describió por primera vez la capacidad osteoinductiva de la MOD (151). El procedimiento elimina el calcio y el fosfato, pero deja la matriz extracelular que está compuesta principalmente por colágeno tipo I, proteínas no colágenas y proteínas osteoinductivas. Entre estas proteínas se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) (de la superfamilia del TGF- β).

La MOD posee actividad osteoinductiva, no posee capacidad osteoconductoras si no se aplica en combinación con otro producto (149). La actividad osteoinductiva se demostró inicialmente en animales. Posteriormente la MOD estuvo regulada como tejido mínimamente manipulado (hasta 2005 en EEUU), razón por la cuál la FDA no había exigido estudios exhaustivos en humanos. Existen pocos estudios clínicos que iguallen los efectos terapéuticos anunciados por los estudios animales. En 2004 se publicó un estudio clínico prospectivo y aleatorizado que demostró la utilidad de la DMO, en una de sus formas comerciales, como extensor del injerto óseo en artrodesis vertebral (164).

b) Proteínas morfogenéticas óseas

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta o TGF- β . Las BMP desempeñan un importante papel en la embriogénesis del aparato locomotor. Regulan la osificación endocondral e intramembranosa y están implicadas en la fisiología de la consolidación de las fracturas. Sus características se describen en el apartado 3.2.2. Proteína Morfogenética Ósea, así como los estudios preclínicos relevantes. En este apartado se describirán los estudios clínicos actualmente relevantes.

Urist fue el primero en purificar BMP desde DMO en laboratorio. Del hueso de cadáver se obtenía una cantidad de BMP muy pequeña, por lo que una vez pasó del laboratorio a la industria farmacéutica se empezó a emplear BMP recombinante humana. En la actualidad la FDA considera las BMP recombinantes dispositivos de clase III, lo que implica cierto riesgo y vigilancia por la administración.

Actualmente se dispone en el mercado de dos BMP recombinantes para uso clínico, la rhBMP-2 y la rhBMP-7 (proteína osteogénica OP1). Ambas han sido evaluadas en estudios controlados y aleatorizados, estudios clasificados como de nivel I.

La BMP-2 ha sido estudiada en varios trabajos como sustituto óseo. La eficacia de la BMP-2 en el tratamiento de las fracturas de tibia con defectos corticales ha demostrado su capacidad para actuar como sustituto de injertos de cresta ilíaca (165). Otra parte importante de los trabajos se ha centrado en la capacidad de esta BMP de ser un sustituto de injerto óseo en artrodesis vertebral. Tras una importante labor preclínica y determinar la dosis y el portador adecuado de la BMP, se realizó un ensayo clínico prospectivo, que indujo a aprobar el uso de la BMP-2 (en 2002 en EEUU) como sustituto de injerto óseo en cajas para artrodesis intersomática anterior (166). Muy recientemente la FDA ha aprobado su uso para casos concretos. El estudio de la BMP-2 en fracturas abiertas de tibia también ha demostrado su utilidad (167).

La BMP-7 (proteína osteogénica OP-1) es otra proteína osteoinductiva que ha sido motivo de exhaustivas investigaciones. Se han completado con éxito estudios preclínicos y en la actualidad se están analizando los resultados de estudios clínicos. El primer estudio clínico se realizó en pseudoartrosis de tibia de fracturas abiertas (168). Los autores comprobaron que el 75% de los pacientes en el grupo tratado con la BMP-7 y el 84% de los tratados con autoinjerto de cresta ilíaca (“gold standard”) mostraban una consolidación radiológica. En la actualidad la BMP-7 (OP-1) posee la aprobación de la FDA como uso compasivo en pseudoartrosis de huesos largos y de artrodesis posterolateral vertebral .

2.3.5. Estimuladores de la formación de hueso

Los mamíferos superiores requieren por lo menos de cuatro elementos para la consolidación de fracturas: matriz extracelular, células formadoras de hueso, factores de crecimiento y uno correcto aporte sanguíneo (122). En la actualidad no existe ninguna definición formal de aquellos compuestos o materiales con propiedades osteogénicas,

aunque podría describirse como la estimulación de la formación de tejido óseo desde los osteoblastos.

a) Aspirado de médula ósea autóloga

El aspirado de médula ósea tiene una alta concentración de progenitores de tejido conectivo. Un mililitro de aspirado ilíaco contiene aproximadamente 40 millones de células nucleadas, 1500 de las cuales son progenitores del tejido conectivo (169). En la década de 1980, Lindholm y Urist agregaron médula ósea a la matriz ósea para aumentar la consolidación en un estudio que cuantificaba la formación de hueso (170). El aspirado de médula ósea puede diluirse con elementos de sangre periférica al realizar una presión negativa importante con el émbolo de aspiración. Muschler y otros autores describieron esta circunstancia, destacando la necesidad de no aspirar más de 2mL de sangre por pinchazo en cresta ilíaca, ya que volúmenes mayores conllevan la dilución del componente celular con sangre periférica (171).

Varias publicaciones describen una mayor consolidación ósea mediante estrategias basadas en células, fundamentadas en estudios *in vitro* y en animales. Connolly y sus colaboradores investigaron los efectos de concentrar médula ósea por centrifugación en un modelo de pseudoartrosis en conejo (172). Los resultados fueron mejores con la centrifugación que con médula ósea no procesada. Bruder y colaboradores evaluaron la combinación de médula ósea con un cilindro de fosfato tricálcico poroso en un modelo canino de pseudoartrosis de huesos largos (173). Los resultados fueron superiores con el injerto compuesto que con el tratamiento con cilindros cerámicos solos, que determinaron sólo osteogénesis modesta. Muschler comunicó el empleo de un método de retención selectiva de células para enriquecer el aloinjerto en un modelo canino de artrodesis vertebral (174). Los resultados se evaluaron mediante un índice de consolidación, tomografía computarizada cuantitativa y evaluación mecánica. Observaron que la utilización de matriz ósea enriquecida por retención selectiva y coágulo de médula ósea era superior al tratamiento con matriz ósea sola o matriz ósea no enriquecida y coágulo de médula ósea.

Garg publicó unos buenos resultados en su serie de veinte pacientes que habían sido tratados con inyección de médula ósea por pseudoartrosis (175). Ésta fue una experiencia de un solo cirujano sin controles (Nivel IV). Wientroub comunicó el empleo de médula ósea autóloga para mejorarla eficacia de aloinjertos en niños (176). Goel utilizó

inyecciones de médula ósea en pacientes con pseudoartrosis (177). Recurrieron al procedimiento para intentar brindar una alternativa terapéutica de bajo costo y alegaron resultados exitosos en quince de veinte pacientes; sin embargo, no se comparó con ningún grupo de control. Por ahora no hay pruebas de nivel I que demuestren la eficacia de la médula ósea para aumentar la consolidación ósea.

Hernigou comunicó sesenta pacientes con una pseudoartrosis no infectada que habían sido sometidos a aspiración de médula ósea de ambas crestas ilíacas, seguida de inyección en el sitio de la pseudoartrosis (178). Cada pseudoartrosis recibió un volumen constante de 20 mL de médula ósea concentrada. Se estimó la cantidad de células progenitoras trasplantadas contando las unidades formadoras de colonias fibroblásticas. Se determinó el volumen de osteogénesis mineralizada comparando las tomografías computarizadas preoperatorias con las practicadas a los cuatro meses de la inyección. Los resultados mostraron consolidación en cincuenta y tres de los sesenta pacientes, con correlaciones positivas entre el volumen del callo mineralizado a los cuatro meses, y el número y la concentración de las unidades formadoras de colonias. Los siete pacientes que no presentaron consolidación de la fractura tenían cantidades y concentraciones más bajas de unidades formadoras de colonias. Este estudio aportó pruebas de nivel III para la utilización de médula ósea autóloga, que parece ser, hasta ahora, la mejor prueba sobre la posible eficacia de este material osteogénico.

b) Factor de crecimiento y diferenciación tipo 5

El factor de crecimiento y diferenciación tipo 5 (GDF-5) ha recibido diversas denominaciones en la literatura científica, como MP-52, radiotermina, LAP-4, CDMP-1 y BMP-14. Se ha demostrado en un estudio con un modelo animal en conejos, que el GDF-5 promueve la artrodesis intertransversa a nivel vertebral (179). Sin embargo es destacable que la dosis más baja utilizada en dicho trabajo obtuvo las mejores tasas de fusión, dato que pone de manifiesto que aumentar la dosis de este factor de crecimiento puede no mejorar la osteogénesis. En la actualidad existen varios trabajos en curso sobre esta molécula y su papel en la osteogénesis.

c) Plasma Rico en Plaquetas

Tras una fractura o un traumatismo cerrado o quirúrgico, se activa una reacción inflamatoria y la cascada de la coagulación, la trombina y el colágeno subendotelial activan las plaquetas, con la consiguiente liberación de sus gránulos en el tejido lesionado. Esta fractura o hematoma de la herida contiene una mezcla de factores de crecimiento que puede estimular la formación de vasos sanguíneos, la invasión de células madre mesenquimales, monocitos y macrófagos, y la agregación plaquetaria posterior. En consecuencia, estas moléculas no estimulan directamente la osteogénesis, pero se las ha denominado factores osteopromotores. Actúan como agentes de señalización para estas células y afectan funciones de reparación cruciales como migración, proliferación y diferenciación celular, y angiogénesis.

Se podría desprender de lo anterior que si se administra una cantidad concentrada de plaquetas ésta contribuiría con las primeras etapas de la reparación ósea y, por lo tanto, desencadenaría el proceso de la osteogénesis y consolidación de fracturas.

Puesto que este trabajo se centra en el efecto del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en la osteogénesis a distracción se analizarán pormenorizadamente en el siguiente capítulo los detalles del PRP y de los trabajos relacionados con la osteogénesis hasta la fecha.

2.4. Estimulación de la osteogénesis a distracción

Como se ha descrito en los apartados del primer capítulo, los conceptos de la osteogénesis a distracción vivieron un desarrollo importante hasta los años 90. Describiéndose hasta esa década las distintas variables mecánicas y técnicas que podían influir positiva y negativamente. En los años siguientes, soportados por el avance en el conocimiento de la regeneración tisular, se han sucedido trabajos que han pretendido estudiar las distintas variables biológicas o tratamientos estimuladores de la regeneración ósea. A continuación se exponen las aportaciones biológicas más relevantes de los últimos años en el campo de la estimulación de la osteogénesis a distracción.

En 1999 Raschke y colaboradores estudiaron el efecto de la Hormona de Crecimiento en el regenerado óseo del callo de elongación en cerdos (180). Para ello se llevaron a cabo procedimientos de elongación diafisaria en 30 cerdos. El grupo intervención recibía un tratamiento adicional con 100 µg de Hormona de Crecimiento por Kilogramo de peso. Las pruebas biomecánicas sobre los segmentos óseos del grupo intervención mostraban unos parámetros superiores al grupo control. Los autores concluyeron que la administración sistémica de la Hormona de Crecimiento acelera la consolidación del regenerado de la osteogénesis a distracción.

En 1999 Yamane y colaboradores investigaron el efecto de la adición de un derivado de la vitamina D (ED-71) en el callo de elongación de diáfisis de conejo (181). La administración se llevaba a cabo de modo subcutáneo (0,05µg/Kg). Se cuantificó la producción de hueso mediante densitometría ósea (DEXA). Se hicieron dos grupos, control e intervención, y de éstos se analizaron las piezas a la primera, tercera y quinta semana del procedimiento (5 conejos por grupo y semana). Los resultados del análisis secuencial de las piezas mostraron que el grupo tratado con vitamina D presentaba una mayor formación de hueso, con callos más gruesos y corticalización de mayor espesor, especialmente en las fases precoces.

En 2000 se publicó un estudio canadiense encabezado por Rauch en el que se estudió el efecto del TGF-β1 en un modelo de osteogénesis a distracción en conejos (182). La administración del TGF-β1 era en el lugar de la osteotomía, y se infundieron distintas concentraciones. El sacrificio y análisis fue a las tres semanas del inicio del estudio. Se estudiaron las piezas histológicamente, mediante densitometría y mediante test biomecánico. Los hallazgos sugirieron que el TGF-β1 en la osteogénesis a distracción en conejo no presentaron efectos en ninguno de los aspectos estudiados.

Hay estudios que no se han centrado en la estimulación biológica, si no en la inhibición de la regeneración. Los tratamientos de osteogénesis a distracción o de distracción fisaria se llevan a cabo, en ocasiones, en el contexto de un sarcoma óseo por lo que interesa saber el comportamiento de estos procedimientos en presencia de los protocolos quimioterápicos de los sarcomas. A esta cuestión intentaron dar respuesta un grupo turco liderado por Subasi (183). Con un modelo de osteogénesis a distracción en conejo hicieron un estudio para evaluar el efecto histológico, gammagráfico y radiológico del tratamiento con un protocolo quimioterápico de sarcomas, basado en infusión endovenosa de metotrexato a altas dosis. En ninguno de los tres aspectos encontraron diferencias entre el grupo intervención y control.

En 2002 Bail, Raschke y colaboradores retoman el estudio de la Hormona de Crecimiento en un modelo de osteogénesis a distracción en cerdo (184). A diferencia del trabajo publicado por ellos en 1999 (180), en esta ocasión emplean Hormona de Crecimiento recombinante para la especie porcina, y su objetivo era evaluar el efecto de la misma en relación con su concreta producción para cerdo. Observaron que el callo del regenerado era superior en volumen, pero sin cambios microestructurales. Observaron una mayor presencia de cartílago en el grupo control, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Encontraron mineralización del callo incluso antes de terminar la distracción en el grupo tratado, mientras que en el control no existía mineralización del callo hasta la fase de consolidación. Sugieren los autores que el empleo de Hormona de Crecimiento en clínica pudiese acortar los tiempos de elongación en osteogénesis a distracción y transportes óseos.

En 2003 se publica un estudio sobre el efecto de la Proteína Osteogénica 1 (OP-1) en un modelo de osteogénesis a distracción en conejos (185). Se estudió su adición a tres dosis distintas, todas administradas en la fase final de la distracción. Se analizaron todas las piezas al final de la tercera semana del procedimiento, estudiando la histología, la biomecánica y la expresión de receptores de BMP mediante inmunohistoquímica. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en la histología ni en la biomecánica, sin embargo en los conejos tratados se observó una importante expresión de receptores para BMP en las fases precoces. Los autores sugieren que la proteína administrada puede tener un efecto en las fases precoces, y que una de las posibles causas por las que no encontraron hallazgos más relevantes pudiese ser que la administración se realizó al final de la fase de distracción, momento en el que la expresión de receptores es menor.

En 2004 se concedió el premio “Nicolas Andry” al trabajo de Aronson sobre el efecto del envejecimiento biológico en el regenerado de la osteogénesis a distracción (51). Para ello diseñó un estudio experimental con ratas con distintas edades a las que les sometía a osteogénesis a distracción. Estudió las distintas características morfológicas de los regenerados óseos y cuantificó la expresión de distintas proteínas implicadas en la regeneración de tejidos mesenquimales. Los resultados mostraron hallazgos concordantes con los que se observan en la práctica clínica en los que la senectud conduce a una osteoporosis y una disminución de las capacidades regenerativas del hueso. Observó en las ratas de más edad una disminución de la formación endóstica de hueso. Así como una expresión mucho menor del Factor de Crecimiento Fibroblástico. Cuando trató a las ratas de más edad con Factor de Crecimiento Fibroblástico la regeneración endóstica se igualó a la de las ratas más jóvenes. De lo que se concluyó en el trabajo de Aronson que el Factor de Crecimiento Fibroblástico está íntimamente ligado a la regeneración ósea endóstica.

En la misma línea que el grupo de Subasi, un grupo japonés estudió el efecto de la radioterapia en un modelo de osteogénesis a distracción en conejo (186). Para evaluar dicho efecto se irradiaron con una única dosis tibias de conejos, que posteriormente eran intervenidas para realizar un alargamiento. Se estudiaron histológicamente las piezas y se observó un patrón de osificación endocondral más abundante que en los casos no irradiados. La formación de trabéculas era menor y la maduración del regenerado también. La expresión en mayor cantidad de algunos factores de crecimiento angiogénicos (VEGF) sugiere que existe un daño hipóxico en el regenerado, y que probablemente el aspecto en el que más interfiera la radioterapia es en la inhibición de la neoangiogénesis.

En 2006 se publica un trabajo que evaluaba el efecto del tratamiento con bifosfonatos en el callo de elongación óseo (187). Se diseñó un estudio experimental con conejos esqueléticamente inmaduros a los que se les sometía a elongación de la tibia. Tras una primera semana sin distracción, se iniciaba la misma durante tres semanas. Recibieron dos dosis distintas de bifosfonatos durante seis semanas (una dosis 100 veces mayor que la otra). El grupo con mayor dosis no mostró línea radiolúcida durante la distracción, y mostró una formación de hueso mayor que el grupo control y que el grupo de dosis inferior. Las propiedades biomecánicas no difirieron con el grupo control. Dado que los bifosfonatos inhiben la resorción ósea mediada por osteoclastos los datos sugieren que durante la osteogénesis a distracción existe un fenómeno de remodelación importante mediado por los osteoclastos.

En 2007 se publicó un estudio experimental en conejos en el que se evaluaba el efecto de la adición de BMP-7 recombinante humana al callo de elongación en conejos esqueléticamente inmaduros (188). El grupo intervención recibió una dosis de BMP-7 recombinante humana en el momento de la osteotomía. La distracción duró tres semanas, durante las cuales se estudiaron mediante radiología simple y densitometría. Las piezas se extrajeron al final de la distracción, tras una, dos y tres semanas de consolidación. Los hallazgos mostraron una tendencia a la mayor osificación y mineralización en el grupo control, tanto en la radiología simple como en la densitometría. En el estudio histomorfométrico se observó un retraso en la maduración del regenerado en el grupo tratado con la BMP-7 recombinante. Entre las cuestiones que los autores se plantean en la discusión está el hecho de haber empleado un transportador de colágeno tipo I, y que su uso podría haber supuesto un inhibidor de la regeneración fisiológica.

En 2008 se publicó un trabajo experimental sobre el efecto de la infusión continua de Factor de Crecimiento Fibroblástico en el callo de elongación óseo de conejos (189). Se diseñó un modelo de infusión continua con bombas osmóticas implantadas subcutáneamente en el dorso del animal de experimentación, y con un catéter abocado al foco de distracción. En unos casos el contenido de la bomba era Factor de Crecimiento Fibroblástico y en otros suero salino.

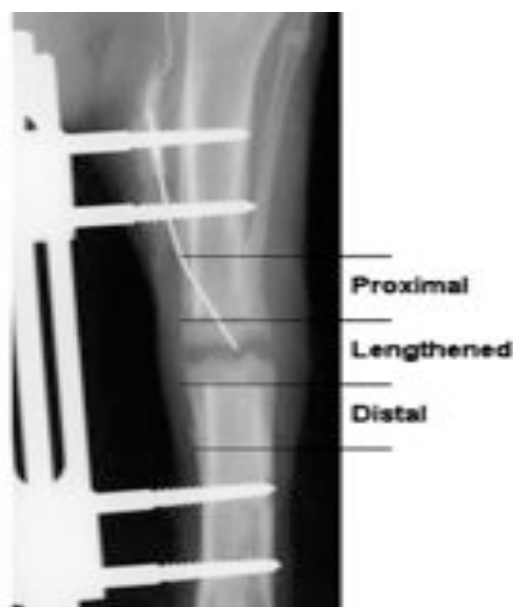


Figura 42. Radiografía de un caso con catéter intrafocal (189).

La fase de consolidación se modificó con el tratamiento mediante Factor de Crecimiento Fibroblástico, pero no la fase de distracción. Al final del estudio, tanto radiológicamente como densitométricamente se observaba un incremento en la formación

de hueso del grupo tratado, tanto en el regenerado como en la diáfisis proximal y distal (Figura 42). El examen biomecánico observó una mayor resistencia en todos los tests realizados en el grupo tratado respecto al control. Tras estudiar los resultados de las distintas variables los autores concluyen que el empleo de infusiones continuas de Factor de Crecimiento Fibroblástico únicamente modifica la fase de consolidación, no la de distracción, por lo que podría ayudar a disminuir su duración.

Otros autores han estudiado el efecto en el regenerado de tóxicos tan presentes en nuestro medio como la nicotina (190). En un modelo de osteogénesis a distracción en conejos expuestos durante siete semanas a nicotina se evaluaron los hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos de las piezas. Las conclusiones fueron que existían más signos de hipoxia en los expuestos que en los controles, con un mayor predominio de osificación endocondral y de pobre expresión de BMP-2 por parte de los osteoblastos.

Repitiendo el modelo de infusión continua intrafocal, Abbaspour y colaboradores publican en 2009 los efectos de la infusión continua de alendronato en el callo de elongación óseo (191). Se evaluaron 33 conejos en el grupo control e intervención, y dentro de cada grupo se subdividieron las extracciones en cuarta, sexta y octava semana del procedimiento. Se estudiaron los resultados mediante radiología simple, densitometría y tomografía computerizada., así como biomecánicamente. Tanto densitométricamente como biomecánicamente los conejos tratado presentaban regenerados superiores, sugiriéndose que el tratamiento continuo puede prevenir la osteopenia que se suele observar en las fases precoces de la consolidación del regenerado.

En 2009 Alam y colaboradores publicaron los resultados de un estudio en ratones manipulados genéticamente que expresaban con normalidad o escasamente BMP-2 endógena (192). Tras someterlos a osteogénesis a distracción se evidenció tanto radiológicamente como biomecánicamente una superioridad en aquellos ratones con una expresión fisiológica de BMP-2 endógena. Por lo que los autores sugieren que una manipulación que persiga la sobreexpresión de BMP-2 puede ser beneficiosa en la osteogénesis a distracción.

Otros autores han probado el efecto de terapias de láser en el regenerado de conejos (193). Habiendo encontrado cambios positivos en la estructura y propiedades del hueso mineralizado. En los casos tratados con láser de bajo nivel el regenerado presentaba unas propiedades y estructura más parecidas a la hidroxapatita que en los casos controles.

3. PLASMA RICO EN PLAQUETAS

3.1. Biología de la plaqueta

Las plaquetas son células pequeñas, anucleadas que se originan en la médula ósea por fragmentación de precursores gigantes denominados megacariocitos. Se forman y liberan hacia la sangre de forma continua, y su ciclo vital en el torrente sanguíneo es de 9 a 10 días. Pese a carecer de núcleo y por tanto de material genético completo, son capaces de realizar muchas de las actividades de las células completas.

Las plaquetas son discos biconvexos, redondos u ovales, cuyo tamaño oscila entre 1,5 y 3,5 μm de diámetro. Contienen la mayoría de las organelas citoplasmáticas que se observan en otras células, incluyendo mitocondrias, gránulos de glucógeno, microtúbulos, aparato de Golgi y ribosomas, así como sistemas enzimáticos para la respiración aerobia y anaerobia. Los elementos más frecuentes son los gránulos electrón-densos, que se pueden observar en microscopía electrónica (ME) (Figura 43), y que constituyen en torno al 20% del volumen de la célula.

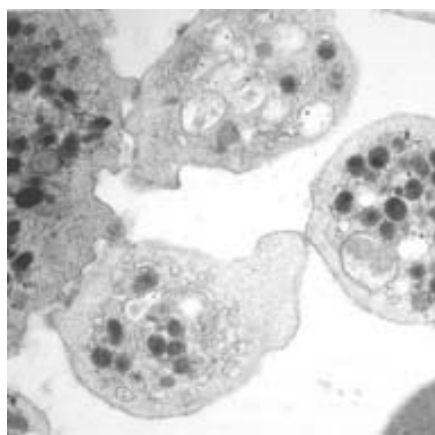


Figura 43. Plaquetas en las que se pueden observar los distintos gránulos (ME).

Las plaquetas tienen un conjunto de funciones esenciales para la hemostasia. En primer lugar forman tapones en los sitios dañados de los vasos, adhiriéndose al colágeno de los márgenes de la herida que más tarde serán reemplazados por fibrina. En segundo lugar favorecen la coagulación al aportar una superficie en la que se reúnen los complejos de la coagulación encargados de la génesis de la trombina. En tercer lugar secretan factores de crecimiento que se relacionan con la reparación tisular (194).

De estas tres funciones plaquetarias la que se va a tratar en mayor profundidad es la tercera, por ser la más relacionada con las propiedades del Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Esta función de aporte de factores de crecimiento está relacionada con los gránulos alfa de la plaqueta. Éstos tienen forma y tamaños variables, y contienen el factor plaquetario encargado de regular la permeabilidad vascular o β -tromboglobulina, factores de la cascada de la coagulación (fibrinógeno, factor V, factor VIII/ Von Willebran), fibronectina, trombospondina, moléculas de adhesión (P-selectina, alpha-1b-Beta3), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Epitelial (EGF), TGF- β y otros factores de crecimiento que se verán en detalle más adelante.

Además de los gránulos alfa existen los gránulos densos, previamente mencionados, cuyo contenido es serotonina captada del plasma, ADP, calcio y magnesio. Los lisosomas y peroxisomas son otros gránulos presentes en la plaqueta, contienen enzimas lisosomales y catalasa respectivamente.

3.1.1. La exocitosis de la plaqueta: secreción de moléculas

Recientes estudios han demostrado que la secreción de moléculas por la plaqueta comparte importantes similitudes con la exocitosis en la sinapsis neuronal y de otras células (195). La plaqueta es capaz, durante su activación, de secretar tres tipos distintos de gránulos de su interior citoplasmático: los gránulos alfa, los gránulos densos y los lisosomales. La exocitosis proporciona una alta concentración de moléculas efectoras en el lugar de la lesión, produce una amplificación de la activación de otras plaquetas, inicia la formación del trombo, media la adhesión intercelular y desencadena la proliferación y migración de otras células con función reparadora.

Cuando sucede la exocitosis los gránulos contenidos en el citoplasma se aproximan a la membrana celular y descargan su contenido al espacio extracelular. Existen tres sistemas de fibras de citoesqueleto en la plaqueta: el citoesqueleto de membrana, los microtúbulos y los microfilamentos (largos filamentos de actina). El citoesqueleto de la membrana está asociado a la red de filamentos de actina, a varias proteínas de anclaje y a glicoproteínas de anclaje situadas en la membrana bilipídica. Esta red mantiene la forma discoide de la plaqueta en situación de reposo. Los microtúbulos parecen tener un papel fundamental en la pérdida de forma discoide y en la exocitosis, de hecho los anticuerpos monoclonales anti-tubulina inhiben la exocitosis plaquetar. Existen proteínas asociadas a los microtúbulos que regulan la estabilidad y fosforilación de los microtúbulos, estas

proteínas pueden tener un papel en la reorganización de los microtúbulos y sus cambios conformacionales. La reorganización del citoesqueleto es mediada por la polimerización y despolimerización de las redes de actina, regulado mediante el Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, el cual se regula a su vez por proteínas como la scinderina y gelsolina. Si bien el citoesqueleto plaquetar se ve alterado durante la activación, todavía no existe una descripción detallada del mecanismo que explica el cambio conformacional con la exocitosis. Pese a que plaquetas y neuronas poseen un origen embrionario distinto (mesodermo y ectodermo respectivamente) comparten similitudes en el proceso de la exocitosis. Ambos sistemas comparten el hecho de que las vesículas o gránulos presentan moléculas de origen endógeno y exógeno captadas por endocitosis, y requieren de un estímulo que es la despolarización de la membrana en la neurona o la activación de un receptor en la plaqueta. Sin embargo el proceso de exocitosis, que tarda unos 200 μ s en la neurona, se lleva a cabo con más lentitud en la plaqueta, completándose a los 2-5 s desde la llegada del estímulo.

La plaqueta es activada cuando un ligando fisiológico (ADP, trombina, Factor Activador de Plaquetas, colágeno o epinefrina) interactúa con los receptores agonistas de la membrana celular (196). La respuesta final del agonista es el inicio de la secreción a los 1.5 segundos y la finalización de la misma a los 5 segundos. El proceso de fusión de los gránulos alfa con la membrana celular es complejo (195). Ésta se produce mediante una maquinaria molecular compleja denominada SNARE (proteína receptora del anclaje del factor NSF soluble) (Figura 44). Esta maquinaria precisa de tres componentes: t-SNAREs, v-SNARE y el componente soluble SNAP/NSF. Esta maquinaria molecular tiene actividad GTPasa, por lo que consume energía.

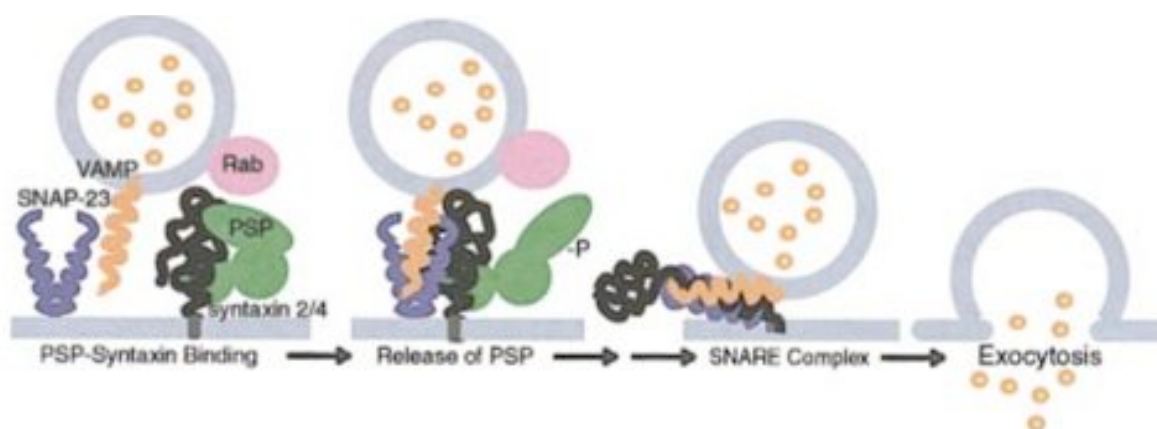


Figura 44. Esquema de funcionamiento de SNARE en la exocitosis

3.2. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas que sirven de agentes señalizadores entre células, cuyas funciones son modular la migración, diferenciación y proliferación celular. En la superficie celular se unen a receptores que posteriormente crean una señal intracelular que activa un segundo mensajero. El segundo mensajero inducirá una determinada respuesta en el núcleo, que tendrá como consecuencia la síntesis de una proteína concreta o la modulación de la producción celular de dicha proteína (Figura 45).

La célula puede ser estimulada por un sistema autocrino, es decir, las mismas células que producen la señal responden a ella, o por un sistema paracrino en el que la célula que produce el factor de crecimiento se encuentra en las proximidades de las células a las que afecta. La proliferación, diferenciación y apoptosis se regula habitualmente mediante señales generalmente externas a la propia célula que las ejecuta. Las células se pueden comunicar por un sistema endocrino, donde la célula secretora está distante de a efectora, como ocurre en la señalización hormonal (125,197).

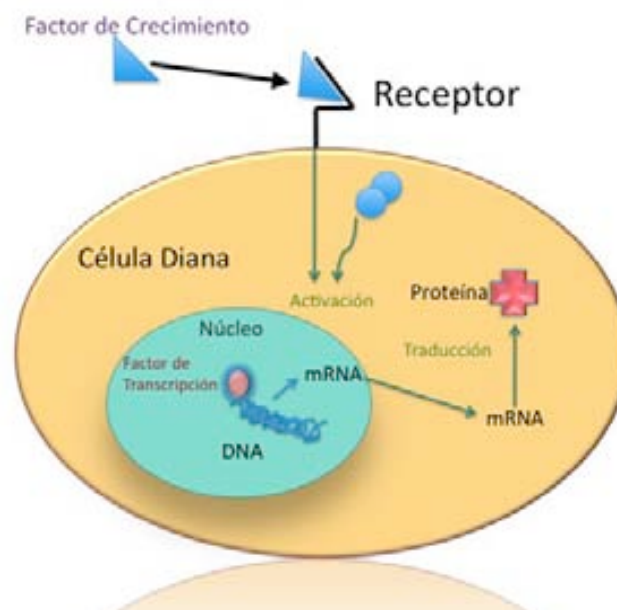


Figura 45. Mecanismo mediante el que los Factores de Crecimiento influyen en la biología celular.

Puesto que la estimulación por parte de un factor de crecimiento suele ser a distancia, no todas las células son sensibles al tipo de señal que trasmite esa molécula. A las células que son sensibles a un determinado factor de crecimiento se les denomina célula diana. Para que una célula sea célula diana de un determinado factor de crecimiento debe poseer en su membrana celular un receptor concreto. El receptor consta de un

dominio extracelular de unión al ligando o factor de crecimiento, un segmento transmembrana helicoidal y una porción citoplásmica. La parte extracelular contiene dos dominios ricos en cisteína a los que puede unirse una serie de factores de crecimiento. El segmento lipófilo central ancla el receptor en la membrana celular, y el dominio intracelular es una proteína tirosin-kinasa con un segmento carboxilo-terminal regulador que es un sitio de unión para los sustratos de la kinasa (Figura 46).

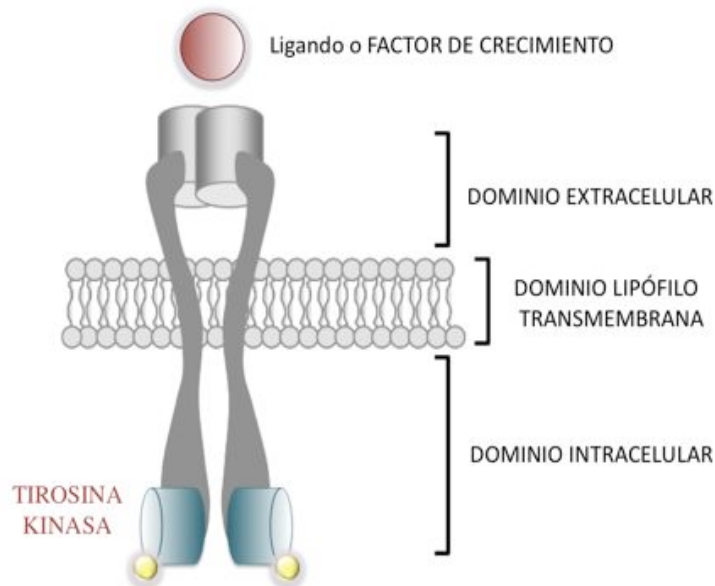


Figura 46. Estructura de los receptores de membrana relacionados con los factores de crecimiento.

Las interacciones entre las proteínas y el complejo receptor activado estimulan las proteínas RAS y provocan el comienzo de una cascada de episodios de fosforilación y la activación de las kinasas MAP (proteínas activadas por mitógeno). Las proteínas kinasas activadas por mitógeno (MAPK) transmiten la señal al núcleo a través del citoplasma.

El núcleo es el destino final de todos estos mecanismos de señalización, donde modifican de manera específica la transcripción de diversos genes, cuya expresión conlleva como respuesta final la traducción o no de proteínas que generarán un cambio en el comportamiento de la célula. Los mecanismos moleculares responsables de la regulación de la transcripción génica son los destinatarios últimos del proceso de transmisión de señales.

El tipo de activación celular así como el producto final de la transcripción varía dependiendo de la célula diana, la combinación factor de crecimiento-receptor celular y la competencia biológica de la célula diana. Entre los tipos celulares productores de factores de crecimiento están los fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliales y leucocitos, especialmente monocitos y macrófagos. Además existen lugares de

almacenamiento, como son las plaquetas y el hueso. Se sabe que los factores de crecimiento tienen un papel esencial en la formación del cartílago y del hueso, en la curación de las fracturas y defectos óseos, y en la curación de otros tejidos del aparato locomotor (198).

3.2.1. Factor Transformador de Crecimiento (TGF)

El TGF debe su nombre a que los primeros tejidos donde se aisló fue en tumores de origen mesenquimal. Se trataba de un factor que promovía la transformación de los fibroblastos en cultivo celular, la acción del TGF sobre estas células era la alteración de su fenotipo, transformándolas en tumorales. Posteriormente se ha demostrado su papel en la regeneración de tejidos mesenquimales. Se han distinguido dos subtipos de este factor de crecimiento con distintas funciones, son el TGF α y el TGF β (198).

■ TGF α

El TGF α está estrechamente relacionado con el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), de hecho comparten el 42% de su secuencia de aminoácidos y se pueden unir a los mismos receptores de membrana, estableciéndose una relación de competencia con el EGF. El gen que codifica este factor de crecimiento se encuentra en el cromosoma 2. La proteína inicial presenta unos 160 aminoácidos, aunque la parte activa sólo consta de 50, presentando la molécula madura un peso aproximado de 5,6 D (Figura 47). Existen descritas varias funciones para este factor de crecimiento, como la estimulación de la proliferación y la quimiotaxis de células epiteliales y la estimulación de la angiogénesis. Como se ha mencionado, se encuentra presente en algunos procesos neoplásicos, en los que puede tener tanto un papel autocrino como paracrino. En la osteogénesis parece tener un efecto inhibitorio sobre los osteoblastos.

■ TGF β

El TGF β pertenece a una familia de proteínas denominadas superfamilia TGF β . Esta familia de proteínas incluye cinco isoformas de TGF β (desde TGF β 1 hasta TGF β 5), las Proteínas Morfogenéticas Óseas o BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), los Factores Diferenciadores de Crecimiento o GDFs (Growth Differentiation Factors), las inhibinas y la sustancia Müllerianna. Es un dímero formado por dos subunidades de 112 aminoácidos, unidas por puentes disulfuro (Figura 48). Tiene un peso molecular de 25.000 D. El gen correspondiente se ha localizado en el brazo largo del cromosoma 19.

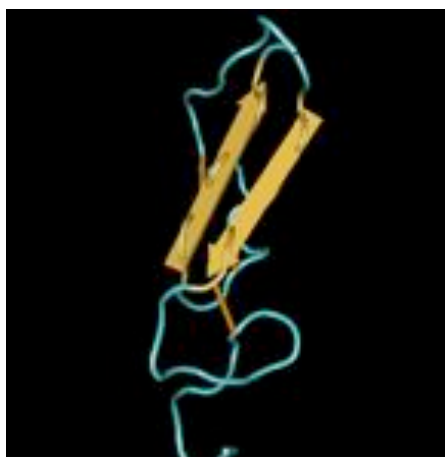


Figura 47. Estructura 3D del TGFα.

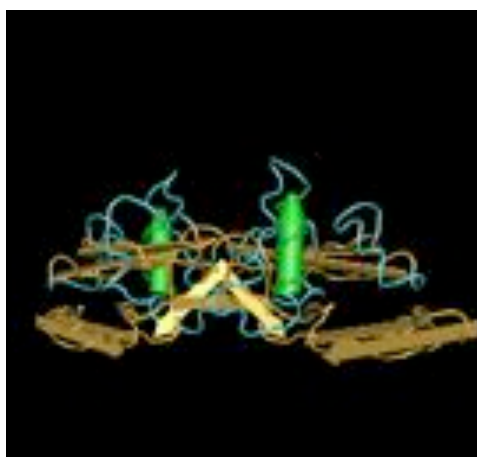


Figura 48. Estructura 3D del TGFβ1.

El TGFβ influye en una amplia variedad de procesos celulares, que incluyen el crecimiento celular, la diferenciación celular y la síntesis de matriz extracelular. Se encuentra en prácticamente todos los tejidos, pero está especialmente presente en el hueso, en las plaquetas y en el cartílago. Es liberado por las plaquetas tras su activación durante la formación del coágulo inicial en las fracturas, ya que contribuye a la formación del callo de fractura (199). De hecho se ha estudiado y demostrado su presencia durante las fases precoces de la formación del callo de fractura mediante marcaje inmunológico, y se ha comprobado su actividad estimuladora sobre el periostio. Sin embargo su actividad más intensa parece encontrarse durante la proliferación celular del cartílago y la osificación endocondral (197,200). Tanto los condrocitos como los osteoblastos presentan numerosos receptores de membrana para el TGF-β, apoyando la hipótesis de que esta superfamilia de proteínas interviene probablemente en todas las fases de la regeneración ósea (201,202).

En varios trabajos experimentales se ha objetivado la influencia del TGF-β sobre los tejidos y células de origen mesenquimal. Joo evaluó el efecto del TGF-β sobre osteoblastos cultivados en diferentes superficies cubiertas de hidroxiapatita (203). Observó que la presencia de TGF-β favorecía la proliferación de osteoblastos de un modo dosis-dependiente en todas las superficies. En el 2001, Adamo y Mailhot investigaron el efecto del TGF-β y de la PGE₂ sobre la conexina-43, proteína que actúa como unión tipo “gap” en células óseas (204). Se concluyó que esta proteína no se veía alterada tras aplicación exógena de TGF-β y PGE₂.

El papel del TGF-β en la regeneración ósea ha sido motivo de estudio de varios trabajos con experimentación animal, incluyendo distintos regímenes de tratamiento, de animal de experimentación y de segmentos óseos.

En 1990, Joyce comunica que la inyección subperióstica de TGF- β en un modelo de fractura femoral en rata estimulaba la osificación endocondral (205).

En 1993, Lind empleó un modelo de fractura de tibia en conejos con inyección de TGF- β (125). A diferencia del trabajo de Joyce, éste se realizó con tres grupos, uno control y los otros dos con infusión diaria de TGF- β durante 6 semanas, uno con administración de 1 $\mu\text{g}/\text{día}$ y el otro con la administración de 10 $\mu\text{g}/\text{día}$. Se estudió la densidad mineral ósea, las dimensiones del callo óseo y la resistencia biomecánica de la pieza postmortem. No existieron diferencias en la densidad mineral ósea entre los tres grupos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos tratados en relación a la morfometría del callo óseo. La diferencia en resistencia biomecánica del callo sólo fue estadísticamente significativa a favor del grupo tratado cuando se comparaba el grupo control con el grupo tratado con 1 $\mu\text{g}/\text{día}$.

En 1994, Nielsen evaluó el efecto de la administración de dos dosis diferentes de TGF- β (4 o 40 ng) en un modelo de fractura de tibia en rata, con una duración del tratamiento de 40 días (206). El estudio biomecánico demostró una mayor resistencia al fracaso mecánico en los casos tratados con dosis de 40 ng en comparación con los de 4 ng y el grupo control.

En 1995, Critchlow evaluó el efecto de la administración de TGF- β 2 en un modelo de fractura tibial de conejo sometido a condiciones mecánicas estables e inestables (207). En uno de los grupos la fractura era estabilizada mediante una placa de compresión dinámica reproduciendo una osteosíntesis estable. El otro grupo era tratado con una placa plástica flexible dejando un espacio de 0,5mm en el foco de fractura, condiciones que trataban de reproducir un entorno de inestabilidad mecánica. Se añadió al procedimiento la administración en ambos grupos de una única dosis de 60 o de 600 ng de TGF- β 2. En los animales en los que se había llevado a cabo una osteosíntesis estable y se había realizado el tratamiento a dosis de 600 ng se observó un aumento en la cantidad del callo de fractura pero no en la cantidad de hueso neoformado en el momento del análisis de la pieza. Los casos con osteosíntesis estable y administración de 60 ng de TGF- β 2 presentaban una cantidad de callo cartilaginoso y óseo menor que en los casos tratados con 600 ng. En los casos tratados con una osteosíntesis inestable, tanto en los de 60 ng como en los de 600 ng, la cantidad de hueso y cartílago fue mínima.

En el 2000 Hong empleó TGF- β aislado en defectos óseos de calota craneal de conejas, no consiguiendo un incremento en la regeneración ósea (208).

Es difícil ponderar el efecto del TGF- β en la regeneración ósea, los trabajos experimentales en modelos animales emplean distintos tipos de animal, distintas dosis e isoformas del TGF- β . Los resultados positivos de los trabajos de Lind y Nielsen pueden ser atribuibles a las altas y repetidas dosis empleadas. El trabajo de Critchlow demuestra que la administración de una única dosis no genera importantes cambios en la regeneración ósea, en cambio demuestra que la estabilidad del foco de fractura beneficia más la formación del callo que la administración de TGF- β 2.

3.2.2. Proteína Morfogenética Ósea (BMP)

Las BMP pertenecen a la superfamilia del TGF- β , en el momento existen quince moléculas descritas dentro de las BMP (209). Las BMP-2, 4 y 7 son las moléculas que parecen tener una función en la regeneración ósea. Concretamente las BMP estimulan la diferenciación celular de las células mesenquimales indiferenciadas hacia células de linaje osteocondroblástico. Las BMP-2, 4 y 7 emplean el complejo receptor serin/treonina kinasa para llevar a cabo la señalización al interior celular (210). Las BMP también presentan un importante papel en la embriogénesis y formación del hueso. En diversos estudios con ratones deficientes en la producción de determinadas BMP se han observado malformación de extremidades, huesos cráneo-faciales y riñón (211-213).

Marshall R.Urist describió en 1965 el principio de osteoinducción, como el fenómeno de nueva formación de hueso debido al efecto de una sustancia endógena (151). Este principio lo describió a partir de un experimento en el que tras haber introducido matriz ósea desmineralizada en un músculo de una rata observaba el crecimiento de hueso nuevo. Posteriormente Urist identificó una proteína a la que hizo responsable de este fenómeno, la denominó proteína morfogenéticas ósea (Bone Morphogenetic Protein o BMP). Años después Wozney describió la familia de las BMP e identificó su secuencia génica, lo que ha permitido la producción de varias isoformas de las BMP con tecnología recombinante (214).

Varios estudios preclínicos han evaluado la eficacia de las BMP en la regeneración ósea de defectos óseos y en la curación de fracturas. En 1995 Cook evaluó el efecto de la administración de BMP-7 recombinante humana (denominada también OP-1 u osteogenina) (Figura 49) en defectos tibiales y cubitales en 28 monos (215). Los defectos cubitales eran de 2 cm, se les administró 1000 μ g de OP-1 con un transportador de

colágeno bovino y en el grupo control con autoinjerto de hueso con el transportador de colágeno bovino o colágeno bovino aislado. Los defectos tibiales eran de 2 cm, y fueron tratados con dosis de 250, 500, 1000 o 2000 μg de OP-1 con transportador de colágeno bovino y con autoinjerto de hueso y transportador de colágeno bovino o colágeno bovino aislado. Se dejaron dos casos con los defectos óseos sin tratamiento adicional. Ni los casos tratados sólo con el colágeno bovino ni los casos no tratados mostraron signos de regeneración a las 20 semanas. De los casos tratados con hueso autólogo ninguno de los cúbitos había consolidado, 5 de las 6 tibias habían consolidado.

De los tratados con OP-1, 5 de los 6 cúbitos tratados habían consolidado y 4 de las 5 tibias también tenían signos de consolidación. El examen biomecánico de las piezas mostraba una resistencia biomecánica superior en las piezas tratadas con OP-1. Estos datos eran concordantes con los descritos por el mismo grupo de autores un año antes en un estudio experimental desarrollado en defectos óseos en huesos largos de perro tratados con BMP-7 (215) .

La eficacia de la BMP-2 ha sido evaluada en trabajos experimentales que han empleado diferentes modelos de regeneración ósea y diferentes animales de experimentación (Figura 50). Scidiani publicó en el año 2000 un estudio en el que valoró la eficacia de la BMP-2 recombinante humana en la regeneración del hueso en defectos óseos segmentarios de 2,5 cm (216). El grupo de BMP-2 recibió distintas dosis de la misma impregnada en un transportador de colágeno (150, 600 o 2400 μg), mientras que el grupo control recibía autoinjerto de hueso o el transportador de colágeno sin coadyuvante. La evaluación radiológica, histológica y biomecánica se llevó a cabo a las 12 o 24 semanas del procedimiento. Todos los casos tratados con autoinjerto y todos los casos tratados con BMP-2 consolidaron radiológicamente, mientras que los casos tratados sólo con el transportador no llegaron a consolidar ni a las 12 ni a las 24 semanas. Biomecánicamente los casos con dosis más bajas de BMP-2 consiguieron mejores parámetros que los de dosis superiores, y en conjunto consiguieron una resistencia biomecánica similar a los casos tratados con el autoinjerto. Si bien no se aclaró el motivo por el que dosis más bajas de BMP-2 obtenían una mejor biomecánica, si se concluyó en el estudio que las dosis debían estar muy bien ajustadas para las diversas aplicaciones clínicas.

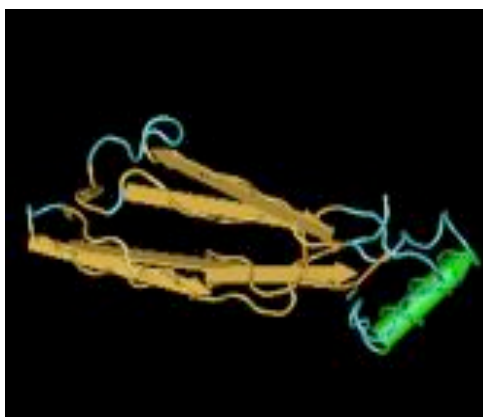


Figura 49. Estructura 3D de la BMP-7 u OP-1



Figura 50. Estructura 3D de la BMP-2.

En 1998 Bostrom y Camacho estudiaron el efecto de la administración de BMP-2 recombinante humana en fracturas de cúbito en conejos (217). Se llevaron a cabo 20 fracturas de cúbito, a las que se les trató con 200mg de BMP-2 en un transportador esponjoso de colágeno. El grupo control se conformó con casos de fractura de cúbito sin tratamiento o tratados únicamente con el transportador de colágeno. El estudio radiológico se realizó durante las semanas 2, 4 y 6. El estudio biomecánico se llevó a cabo al finalizar el estudio. Los casos tratados presentaban una mayor proporción de casos consolidados y una biomecánica superior a los casos control.

Los estudios clínicos más relevantes en la actualidad, así como las indicaciones autorizadas por la FDA del uso de BMP se detallan en el capítulo 2.3. Injertos Óseos, Sustitutos de Injerto Óseo y Estimuladores de la Formación del Hueso.

3.2.3. Hormona de crecimiento y factor de crecimiento análogo a la insulina (IGF)

El Factor de Crecimiento Análogo a la Insulina (IGF) y la Hormona de Crecimiento tienen un papel esencial en el desarrollo esquelético. La Hormona de Crecimiento es actualmente empleada en el tratamiento de algunos casos de estaturas bajas (218). Existe cierto interés en el papel de la Hormona de Crecimiento en la osteoporosis y en la consolidación de fracturas, ya que la Hormona de Crecimiento participa en el crecimiento de los huesos (Figura 51). Se secreta en lóbulo anterior de la glándula pituitaria en respuesta a la estimulación por la Hormona Liberadora de Hormona de Crecimiento (GHRH), que a su vez es secretada en el hipotálamo. Tras ser secretada en la pituitaria la hormona viaja por el torrente sanguíneo hasta la placenta y el hígado, donde las células diana de la Hormona de Crecimiento segregarán el Factor Análogo a la Insulina

(IGF). Tanto la Hormona de Crecimiento como el Factor de Crecimiento Análogo a la Insulina están implicados en el desarrollo esquelético, por lo que han sido motivo de estudios.

Bak evaluó el efecto de la Hormona de Crecimiento a distintas dosis en un modelo de consolidación de fracturas con ratas (219). Los animales recibían dosis dos veces al día hasta el sacrificio, los animales del grupo control o recibían dosis de suero fisiológico o no recibían ningún tratamiento adicional. El estudio biomecánico mostró una superioridad en todos los parámetros medidos en los casos tratados con mayores dosis de Hormona de Crecimiento. Carpenter empleó un modelo de osteotomía diafisaria tibial en conejos, a los que se les administraba Hormona de Crecimiento recombinante humana intramuscular o suero fisiológico (220). Radiológicamente y biomecánicamente no hubo diferencia entre los grupos, aunque el grupo tratado mostró valores séricos superiores en las determinaciones de IGF-1.

Los Factores de Crecimiento Análogos a la Insulina (IGFs) son una familia de proteínas séricas de cadena simple que presentan una secuencia homóloga en un 49% a la proinsulina (Figura 52). Se han descrito dos polipéptidos, el IGF-I, y el IGF-II. El IGF-I, es una proteína formada por 70 aminoácidos con tres puentes disulfuro, posee un peso molecular de 7689 Kd, el IGF-II es un péptido neutro de 67 aminoácidos y un peso molecular de 7471 Kd. Estas proteínas se vehiculizan en el plasma como un complejo con proteínas específicas de adhesión (IGFBP).

Aunque el IGF-2 es el factor de crecimiento más abundante en el hueso, el IGF-1 parece ser más potente en la consolidación de fracturas en animales y en el ser humano. Por esa razón la mayoría de los estudios se han focalizado en el IGF-1.

Koch demostró que el IGF-I estimulaba la formación de la matriz ósea, en un estudio realizado con células obtenidas de calota fetal de rata, mediante la inducción de la proliferación celular y la secreción de componentes de la matriz extracelular (221). Se observó que los osteoblastos producían localmente el IGF-I y II.

El efecto de la administración de IGF-1 en defectos de calota en rata fue publicado Thaller (222). Se estudió la osificación intramembranosa en defectos segmentarios de calota de rata a las que se les había administrado IGF-1 subcutáneamente en infusión continua. Al grupo control se le administró suero fisiológico. Se objetivó la mejoría de la osificación intramembranosa en los casos tratados con IGF-1. Los resultados de este estudio sugirieron que la IGF-1 podría tener un papel relevante en la formación ósea,

especialmente en la osificación intramembranosa, sin embargo no se aclaró en que paso podría tener influencia.



Figura 51. Estructura 3D de la Hormona de Crecimiento.

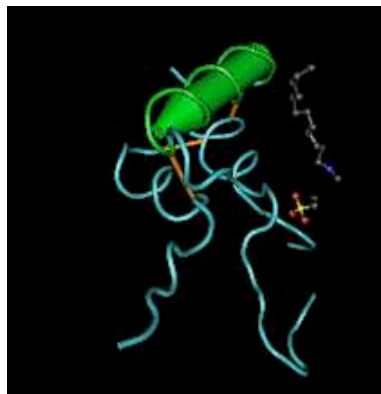


Figura 52. Estructura 3 D del IGF-1.

3.2.4. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

El Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas o PDGF es secretado por las plaquetas en las fases precoces de regeneración de las soluciones de continuidad de los huesos tanto en humanos como en otros mamíferos. Se le denominó de esta manera por encontrarse por vez primera en los gránulos alfa de las plaquetas (205), aunque también puede encontrarse en otros tipos celulares como monocitos y fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, células epiteliales y en la matriz ósea (223). El PDGF es un polipéptido termoestable y tiene un peso molecular de 30.000 daltons (224,225). Tiene una estructura dimérica formada por dos cadenas de aminoácidos denominadas A y B. Las dos cadenas tienen una similitud del 60%. La cadena A está constituida por 121 aminoácidos, mientras que la B está compuesta por 125 aminoácidos. Dos genes se encargan de la codificación del PDGF. La cadena A del péptido está codificada en el cromosoma 7 y la cadena B en el brazo largo del cromosoma 22. Se han encontrado tres formas, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB (224) (225).

Se ha podido demostrar in vitro que el PDGF tiene una actividad mitogénica en osteoblastos (128). Sin embargo no se ha podido aclarar por completo el papel que tiene in vivo en los procesos de reparación ósea de fracturas o defectos segmentarios.

Zhang observó que los osteoblastos poseían una gran cantidad de receptores de PDGF y respondían a la PDGF-AA y PDGF-BB, y que estos osteoblastos eran capaces de producir PDGF-AA pero no PDGF-BB (226).

Hock y Canalis sugirieron que el PDGF incrementaba la proliferación de las células óseas pero no favorecía la diferenciación osteoblástica (227).

Saygin observó que el PDGF incrementaba la producción de osteopontina, pero disminuía la producción de osteocalcina y sialoproteína en células óseas, y también reducía la actividad de fosfatasa alcalina y la mineralización ósea, particularmente bajo exposiciones prolongadas (228).

Lynch estudió la formación de hueso alrededor de implantes dentales mediante la combinación de PDGF-BB/IGF-I a dosis de 4 μ g (223). Los resultados del estudio indicaron que la aplicación in vivo de la combinación de estos factores de crecimiento promovía la regeneración del hueso alrededor del titanio durante las primeras fases de la cicatrización. A los siete días, los implantes a los que se aplicaron los factores de crecimiento, PDGF-BB/IGF-I, presentaban un porcentaje significativo de hueso en contacto con el implante (BIC, Bone Implant Contact) en comparación con los controles. El uso combinado de PDGF/IGF-I alrededor de los implantes podría acelerar y aumentar la osteointegración de los implantes, particularmente en lugares con densidad ósea deficiente.

Nash evaluó la eficacia del PDGF en la curación de osteotomías tibiales unilaterales en siete conejos (229). Cada osteotomía era tratada con 80 μ g de PDGF en una matriz de colágeno o sólo con la matriz de colágeno. Los animales fueron sacrificados a los 28 días. El análisis radiológico a las dos y a las cuatro semanas demostró un incremento en la densidad del callo y en el volumen del mismo en los casos tratados con PDGF. El análisis histológico mostró un estado más avanzado de diferenciación ósea en los casos tratados con PDGF. El análisis biomecánico no encontró diferencias entre las tibias tratadas con PDGF y las tibias contralaterales sin osteotomía.

3.2.5. Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

Son una familia de nueve polipéptidos estructuralmente relacionados que se caracterizan por su afinidad por ligandos de glicosaminoglicanos y que se sabe que presentan un papel importante en la angiogénesis y la proliferación de células mesenquimales (127,230). El más abundante FGF en los tejidos adultos son los FGF ácidos (FGF-1 o FGF- α) y los FGF básicos (FGF-2 o FGF- β). El FGF ácido es un péptido de 140 aminoácidos, existiendo una porción homóloga del 55% entre los FGF ácido y básico, tiene un peso molecular de unos 15.000 daltons (Figura 53) (231). El FGF básico

es una cadena peptídica simple compuesto por 146 aminoácidos, tiene un peso molecular entre 16.000 y 18.000 daltons (231).

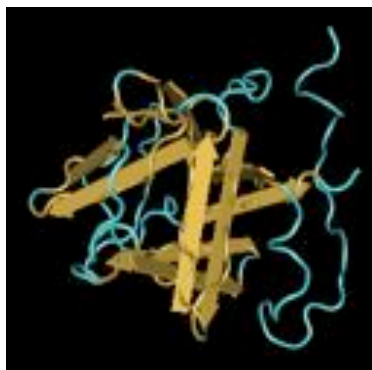


Figura 53. Estructura 3 D del FGF-2.

Tanto el FGF-1 como el FGF-2 promueven la proliferación y diferenciación de diversas estirpes celulares, entre las que están células epiteliales, miocitos, osteoblastos y condrocitos. El efecto mitógeno del FGF-1 ha sido asociado con la proliferación de condrocitos (232,233), mientras que los osteoblastos expresan FGF-2 y parece ser más potente que el FGF-1 para la formación ósea (128). Son péptidos cuyo funcionamiento fisiológico depende de receptores celulares transmembrana tipo tirosina-kinasa (234). Se ha descrito la relación entre la alteración estructural y funcional de estos receptores debido a mutaciones y defectos en la osificación endocondral e intramembranosa. La mutación del receptor 3 del FGF (FGFR-3) se ha asociado a displasias óseas que van desde la hipocondroplasia, la acondroplasia hasta la displasia tanatofórica (displasia neonatal letal). Concretamente la acondroplasia se debe a un cambio de una arginina por una glicina en la porción transmembrana del receptor transmembrana (235).

Tanto el FGF-1 como el FGF-2 han sido identificados durante las fases precoces de la consolidación de las fracturas. Desde su identificación con los procesos de neoangiogénesis y la activación de condrocitos y osteoblastos se han realizado diversos estudios en los que se ha tratado de describir su papel en la regeneración ósea.

Tweden demostró que el FGF-2 estimulaba la proliferación y la migración de células endoteliales (236). Eppley estudió la evolución de autoinjertos óseos en tejidos irradiados, con o sin la utilización de FGF2 (237). Los resultados de los defectos tratados con autoinjerto y FGF-2 fueron significativamente mejores en cuanto a cicatrización y relleno de los defectos con respecto a los defectos en los que no se aplicó FGF-2.

Kato evaluó el efecto de la inyección aislada de FGF-2 recombinante humana en defectos segmentarios de diáfisis tibial de conejos (238). El defecto óseo era de 3 mm, y la

estabilización se llevaba a cabo con un fijador externo. Se inyectaron diversas concentraciones de FGF-2 (0, 50, 100, 200 y 400 μg). Se evaluó la respuesta al tratamiento mediante radiología simple, histología y densitometría ósea. Se evidenció un efecto dosis dependiente en el volumen de hueso formado y densidad mineral ósea con dosis superiores a los 100 μg ($p < 0.01$). Con dosis de 100 μg se observaba un incremento en el volumen y densidad mineral ósea del 95% y 36% respectivamente respecto a los casos sin FGF-2. Este estudio experimental concluía que la inyección única de FGF-2 producía una mejoría de la reparación de defectos óseos segmentarios en conejos.

Nakamura estudió el efecto del tratamiento con FGF-2 recombinante humano en un modelo experimental de fractura tibial en perros raza beagle (239). Llevó a cabo osteotomías transversas en 41 perros, llevando a cabo la estabilización con clavos endomedulares. Unos casos fueron tratados con 200 μg de FGF-2, los casos controles no recibieron tratamiento coadyuvante. Se llevó a cabo un estudio secuencial, con sacrificio de los especímenes a las 2, 4, 8, 16 y 32 semanas desde la cirugía. Se estudió el hueso formado tanto en su morfología como en su biomecánica. A las dos semanas de la osteotomía los casos tratados ya presentaban mayor número de las células mesenquimales procedentes del periostio, así como mayor diferenciación de éstas hacia condrocitos y osteoblastos. La osificación intramembranosa estaba aumentada en los casos tratados. La cantidad de callo óseo que se observaba a las 4 semanas en el grupo tratado era mayor que en el grupo control, y a las 8 semanas se observaba también mayor densidad mineral ósea en el grupo tratado. En el grupo tratado con FGF-2 recombinante humana se observaba una disminución del callo a partir de la semana 8, y la resistencia biomecánica parecía recuperarse a partir de la semana 16. En cambio en el grupo control la reducción del callo no se modificaba hasta la semana 16, y hasta esta semana seguía manteniendo propiedades biomecánicas inferiores en comparación con el grupo tratado. Este estudio sugiere en sus conclusiones que el FGF-2 recombinante no sólo estimula la osteogénesis del defecto óseo, sino que también estimula la remodelación más rápida del callo óseo, y que esta circunstancia puede estar relacionada con la más rápida restauración de la biomecánica del hueso diafisario.

Se ha estudiado el efecto de la FGF-2 recombinante humana en primates (240). Radomsky diseñó un estudio con babuinos, a los que realizaba una osteotomía del peroné con un defecto de 1 mm. Los casos se trataban con FGF-2 recombinante humana y el control se realizaba con el peroné contralateral, que no recibía tratamiento adicional. El tratamiento con FGF-2 era con distintas dosis. El estudio morfológico reveló un mayor

callo, una mayor cantidad de hueso nuevo y una mayor actividad osteoblástica en los casos tratados. En el estudio biomecánico tanto la energía hasta el fracaso de la pieza como la carga hasta el fracaso eran superiores en los casos tratados, no fue así para la energía torsional hasta el fracaso de la pieza. No se observó un claro efecto relacionado con la dosis.

3.2.6. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) se aisló inicialmente en cultivos celulares de hipófisis. Es proteína homodimérica cuya secuencia de aminoácidos tiene una similitud del 24% con el PDGF-BB, pero se une a distintos receptores que el PDGF e induce diferentes efectos biológicos. Es un mitógeno potente y selectivo para las células endoteliales, su importancia queda manifestada por su acción angiogénica.

El papel que lleva a cabo el VEGF en la osteogénesis a distracción está relacionado con su relación con la neoangiogénesis. Recientemente Lee demostró en un estudio de osteogénesis a distracción en humanos que durante este tipo de procedimiento aumentan los niveles plasmáticos de ciertas citocinas y factores de crecimiento relacionados con la movilización de células precursoras endoteliales (241,242). Este autor sugiere que estos factores de crecimiento, como el VEGF o el SDF-1 podrían tener un efecto terapéutico en procedimientos en los que la movilización de células precursoras de endotelio tenga cierto interés, es el caso de la osteogénesis.

Otros trabajos han encontrado una mejoría en la osificación de defectos óseos con VEGF en hueso planos del cráneo y en osteogénesis a distracción mandibular (243).

3.3. Plasma Rico en Plaquetas: conceptos generales y técnicas de obtención

En las últimas décadas ha crecido el interés por el estudio de los procesos biológicos que integran la reparación y regeneración de los tejidos (244,245). La mayor comprensión de la biología molecular de la célula y las diversas funciones de los factores de crecimiento ha conducido a abrir múltiples líneas de investigación en la reparación y regeneración de los tejidos, bien a partir de células pluripotenciales, bien mediante la potenciación de la reparación y regeneración con factores de crecimiento, o con la combinación de ambas (246).

La plaqueta puede considerarse un reservorio de factores de crecimiento que son secretados durante procesos fisiológicos (195,247,248). Basándose en esta circunstancia, y en la posibilidad de obtener un alto número de plaquetas de sangre periférica, se han ido desarrollando terapias que emplean concentrados de plaquetas (249). Su fácil preparación, seguridad y bajo coste han despertado el interés en varias disciplinas médico-quirúrgicas (250). El objetivo inicial del uso del concentrado de plaquetas era reemplazar un coágulo de sangre fisiológico por un coágulo únicamente de plaquetas, que una vez activadas pudiesen secretar factores de crecimiento como PDGF, TGF- β , VEGF, IGF-I, HGF, PF-4 y otros, conduciendo al tejido circundante a la reparación y regeneración (248,251,252). La fuente principal de plaquetas es la sangre periférica, y el modo esencial de obtención del concentrado la centrifugación de sangre periférica. La activación de estos preparados conllevaría la liberación de factores de crecimiento una vez aplicada la sustancia activadora sobre el coágulo de plaquetas. Entre los activadores más empleados se encuentran la trombina y el cloruro cálcico (251). Tal y como se ha descrito en el capítulo 3.1. el fenómeno de secreción de sustancias por parte de la plaqueta sólo se da una vez iniciada la agregación, por lo que una vez tengamos el concentrado de plaquetas activado la agregación se iniciará, dando lugar a un coágulo.

Los concentrados de plaquetas han sido denominados como Plasma Rico en Plaquetas (PRP), Plasma Enriquecido en Plaquetas (PEP), Concentrado Rico en Plaquetas (CRP) o Preparación Rica en Factores de Crecimiento (Preparation Rich in Growth Factors o PRGF™) (253-256). La concentración fisiológica media de plaquetas en un humano adulto sano es de 200.000 plaquetas/ μ L (Rango: 150.000 a 350.000 plaquetas/ μ L).

Para algunos autores el concentrado de plaquetas debe tener de cuatro a cinco veces

la concentración sanguínea de plaquetas (1.407.640 plaquetas/ μ L; SD: 320.100)(257,258). Para otros autores una concentración superior a 300.000 plaquetas/ μ L es criterio suficiente para definirlo como PRP (259). Se ha destacado la necesidad de que este concentrado sólo tenga plaquetas, y no presente ni leucocitos ni eritrocitos, ya que la presencia de enzimas proteolíticas y sustancias proinflamatorias del leucocito podría ir en detrimento de los potenciales beneficios del PRP (251,260).

Se han llevado a cabo cuantificaciones mediante ELISA de los factores de crecimiento que pueden aportar estos concentrados de plaquetas (256,258,261,262). En la Tabla 2 se resumen los factores de crecimiento hallados en el PRP, su función general y las concentraciones descritas.

| Factor de Crecimiento | Función | Concentración en PRP |
|-------------------------------|--|---|
| PDGF | Activación de macrófagos Quimiotaxis del fibroblasto Promotor de la formación de colágeno y proliferación de células óseas | $\alpha\beta$: 117.5 ng/ml $\beta\beta$: 9.9 ng/ml |
| TGF-β | Contribuye a la actividad proliferativa de los fibroblastos Estimula la síntesis del colágeno I y fibronectina Estimula la formación de matriz ósea Inhibe la formación de osteoclastos y la resorción ósea | β 1: 169.9 ng/ml β 2: 0.4 ng/ml |
| VEGF | Estimula la neoangiogénesis Migración y mitosis de células endoteliales Quimiotaxis de macrófagos y granulocitos Vasodilatación | 76-854 pg/ml |
| IGF-1 | Quimiotaxis del fibroblasto y anabólico Estimula al osteoblasto y a la osteogénesis | 84.2 ng/ml |
| PDAF | Estimula la neoangiogénesis estimulando al endotelio | |
| PF-4 | Quimiotáctico para neutrófilos y para fibroblastos | 0.189nmol/ml |
| EGF | Proliferación celular y diferenciación epitelial | 51 pmol/l |
| PDEGF | Promueve la proliferación de queratinocitos y fibroblastos | 470 pg/ml |

Tabla 2. Factores de crecimiento presentes en el PRP.

La concentración de plaquetas que se puede obtener de un sujeto está directamente relacionada con la concentración basal de plaquetas en sangre periférica, esta variable es dependiente del sexo y del estado de salud del sujeto, ya que las plaquetas son un reactante de fase aguda, sin embargo no son dependientes de la edad (258). Esta variabilidad entre individuos dificulta conocer la dosis de factores de crecimiento administrada, de lo que se ha sugerido que para obtener un mismo efecto en dos sujetos diferentes hiciesen falta distintas concentraciones de plaquetas. Esta última circunstancia es debida a que la concentración de los factores de crecimiento es directamente proporcional a la concentración de plaquetas en el concentrado. En humanos adultos se ha observado que el aumento en hasta 8 veces la concentración de plaquetas del torrente sanguíneo conlleva un incremento en concentración de factores de crecimiento del siguiente modo: concentración

5 veces superior en PDGF respecto a sangre periférica, 4 veces de TGF- β , 6 veces de VEGF, y 4 veces de EGF (261). El estudio de correlación mostraba que los factores de crecimiento que aumentaban más con la mayor concentración plaquetar eran el PDGF y el TGF- β (Figura 54).

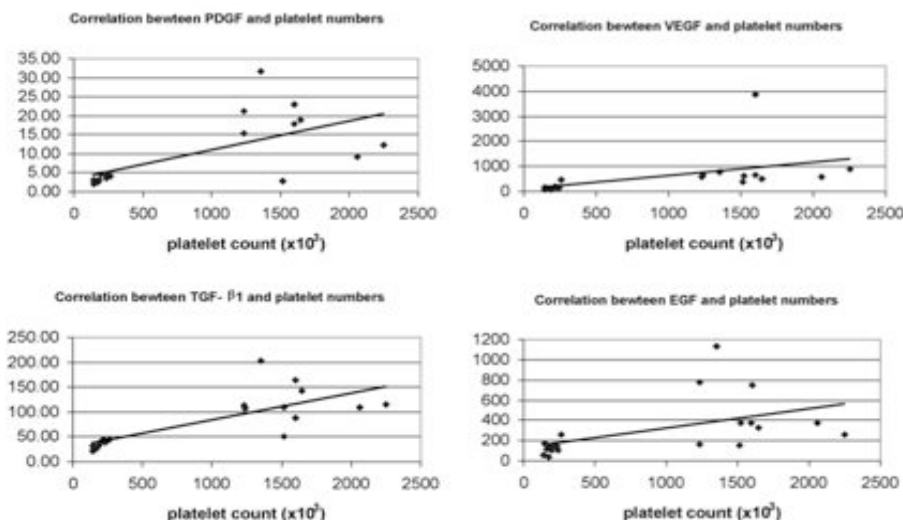


Figura 54. Gráficos de correlación entre incremento concentración de plaquetas y concentración de factores de crecimiento.

Se han realizado comparaciones de concentración de factores de crecimiento entre PRP, Plasma Pobre en Plaquetas (concentración de plaquetas menor a la de sangre periférica), y fluidos del fresado intramedular (252). La mayor diferencia en concentración se encontraba en la de PDGF y VEGF, no siendo tan marcada para otros factores de crecimiento como el IGF o BMP-2 (Figura 55).

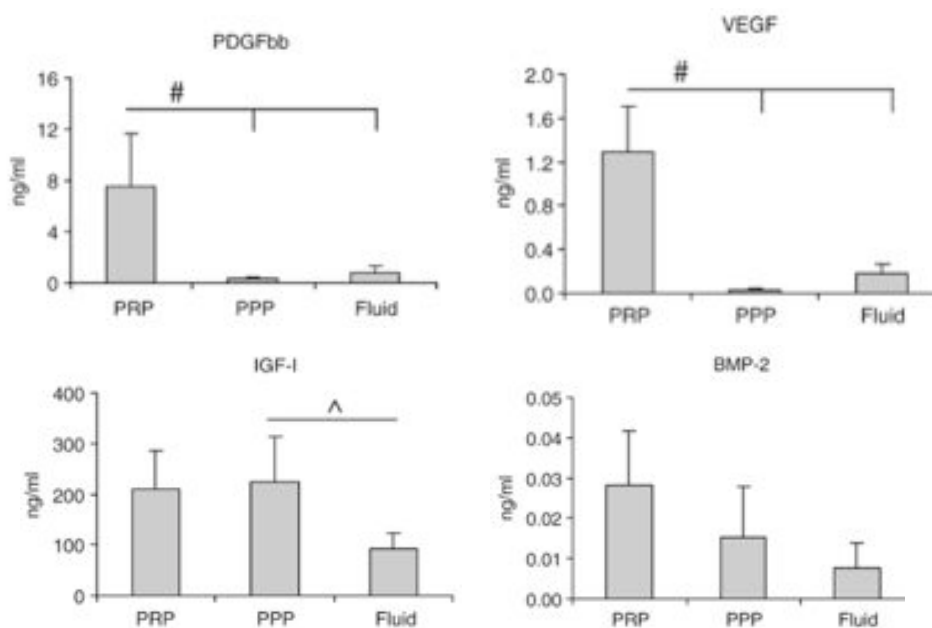


Figura 55. Concentración de distintos factores de crecimiento medidos en PRP, PPP y en el fluido de fresado endomedular.

Los concentrados de plaquetas se pueden obtener tanto en quirófano como de modo ambulatorio (263). Se pueden obtener fundamentalmente de tres modos: mediante sedimentación gravitacional, mediante separadores celulares o mediante filtración selectiva.

La sedimentación gravitacional se basa en las distintas propiedades físicas de los principales componentes de la sangre: eritrocitos, leucocitos, plaquetas y plasma. Tras someter a una fuerza gravitacional en una centrifugadora el contenido hemático original se divide en distintas capas: la más profunda está formada por los eritrocitos (Gravedad Específica: 1.09), la capa más superficial está formada por plasma (Gravedad Específica: 1.03), la capa intermedia está formada por leucocitos (más cercanos a los eritrocitos) y plaquetas (Gravedad Específica: 1,06)(256). El sistema de extracción de la fase con plaquetas suele realizarse mediante pipeteado, obteniéndose un volumen aproximadamente del 10% de la sangre total extraída. Los protocolos de centrifugado varían, con tiempos de 8 a 12 minutos y velocidades de 1600 a 3200 rpm , y existen autores que preconizan una única centrifugación, frente a otros que prefieren varias centrifugaciones consecutivas (255,256).

Dentro de los sistemas gravitacionales el sistema descrito por Anitua es de los más empleados en nuestro medio (248,249,255,259). El producto obtenido mediante su protocolo de centrifugación y pipeteado se denomina PRGF™ (Preparation Rich in Growth Factors). El protocolo incluye la extracción de sangre de una vía venosa periférica y posterior centrifugación en la centrifugadora PRGF™ System II (BTI, Vitoria-Gasteiz, España), durante 8 minutos a 1800 rpm. La centrifugación y pipeteado se realiza en tubos citratados al 3,8%. Posteriormente se realiza un pipeteado selectivo de la fase plasmática del tubo, obteniéndose la parte más próxima a la fase sanguínea pero sin llegar a extraer ni ésta ni la fase blanca de leucocitos situada entre ambas. Según estos autores el tercio más próximo a la fase roja es el más rico en plaquetas y en factores de crecimiento. Una vez obtenido el plasma debe ser activado, ellos proponen activarlo con Cloruro Cálculo al 10%, en una proporción de 50µL de Cloruro Cálculo por cada 1 ml del PRP. Con el protocolo PRGF™ Anitua ha comunicado una concentración de media de plaquetas de 634.000 plaquetas/µL (rango de 421.000 a 1.314.000 plaquetas/µL) en un estudio de cuantificación con voluntarios sanos, llegando a una concentración de 3,1 veces la concentración de plaquetas en sangre periférica (336). En la Figura 56 se observan las fases de obtención del PRGF™ empleando su centrifugadora y material de pipeteado y activación.

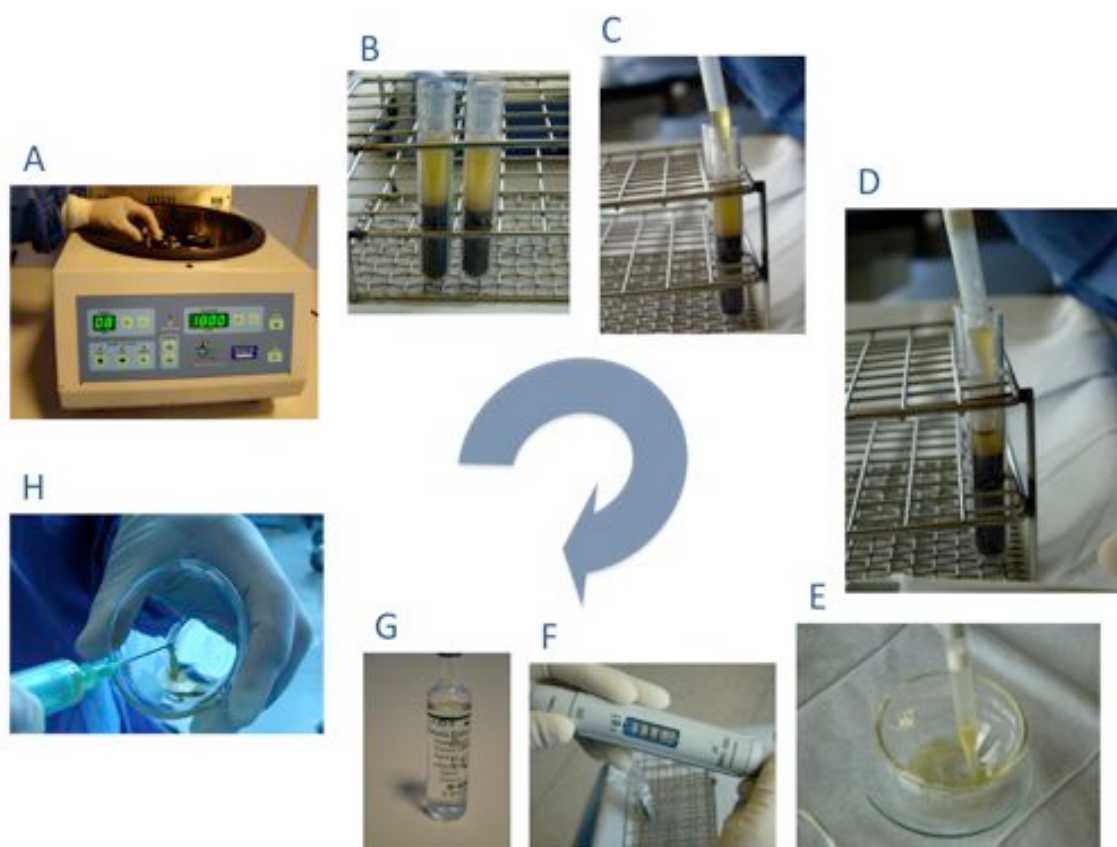


Figura 56. Esquema de la obtención del PRP mediante centrifugación y pipeteado (cortesía de María José Etxeberria del Hospital Donostia, San Sebastián).

Los dispositivos que realizan una separación celular permiten obtener concentrados de plaquetas entre cuatro y cinco veces la concentración de plaquetas en sangre periférica. Existen en el mercado varios dispositivos (Figura 57). Consisten en una cubeta con un flujo continuo y centrifugación, permitiendo la reinfusión del material sanguíneo (258). Estos sistemas realizan la centrifugación y separación de modo estéril. No todos los dispositivos presentan las mismas características, un aspecto relevante de estos dispositivos es el tipo de centrifugación, de la que depende tanto la concentración de plaquetas como que éstas no se lisen durante el procedimiento. (258)



Figura 57. Sistema Harvest® para la obtención de PRP.

Los sistemas de filtración selectiva o plaquetaferesis se basan en un filtro de un solo uso. Las plaquetas son filtradas para posteriormente ser seleccionadas para el concentrado. La capacidad de concentrar plaquetas y factores de crecimiento con los sistemas de aferesis es similar a los de los anteriores dispositivos mencionados, sin embargo los sistemas de aferesis se diferencian entre sí por el rendimiento de filtrado (264), y destacan por su alto coste (Figura 58).

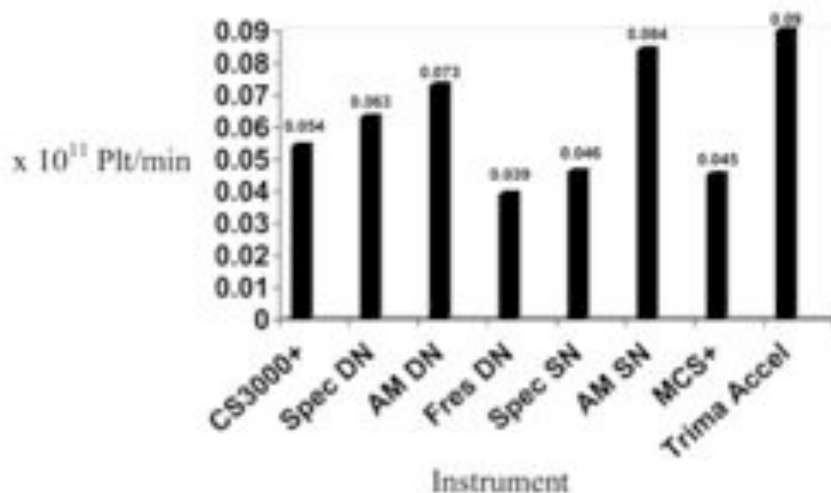


Figura 58. Rendimiento de los sistemas de aferesis para el concentrado de las plaquetas.

Es necesaria la utilización de una sustancia anticoagulante durante la manipulación de la sangre tras su extracción. El citrato dextrosa-A (ACD-A) es un anticoagulante que produce una quelación del calcio plasmático, previniendo la fisiología natural de la cascada de la coagulación y contribuye al metabolismo de la plaqueta debido a su composición en dextrosa. El citrato fosfato-dextrosa presenta similares propiedades anticoagulantes, pero contribuye menos a la viabilidad plaquetar. El uso de Ácido Etilen-Amini-Acético (EDTA) se ha asociado a lisado plaquetar importante. Las soluciones de Citrato Trisódico son las preferidas en la obtención de PRP, al ser las que menos se asocian a problemas con la biología plaquetar (265,266).

Una vez extraído el PRP y contenido en un medio anticoagulante debe ser activo. El proceso de activación consiste en añadir un compuesto que inicie la agregación plaquetaria y desencadene la exocitosis de los gránulos- α plaquetares. Uno de los protocolos de activación más empleado combina 1000 unidades de Trombina bovina por mililitro de Cloruro Cálcico al 10% (266). Otros protocolos emplean la combinación de 1ml de Cloruro Cálcico con Trombina junto con 6ml de PRP en una jeringa de 10ml, empleando el émbolo se producen burbujas que ejercen de agente mezclador (257). También se ha

descrito la activación mediante un sistema de doble jeringa comunicada, con un ratio PRP:activador de 10:1, y empleando como activador Trombina con Cloruro Cálculo al 10% (267). Se ha descrito la adición únicamente de Cloruro Cálculo al 10%, en una proporción de 50 μ L por cada ml de PRP, pudiendo administrarse tanto en fase líquida como en fase coágulo. Con este método la coagulación se produce en 5-8 minutos a temperatura de quirófano (18°C) y en 3 minutos a temperatura corporal de 37°C (255). Los sistemas automáticos suelen incluir la combinación de Trombina/Cloruro Cálculo en proporción 1/10 respecto al PRP obtenido.

3.4. Experiencia del Plasma Rico en Plaquetas en hueso

Debido al distinto origen embriológico, distinta patología y distinta capacidad para regenerar hemos dividido este apartado sobre la experiencia del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en Huesos Planos y en Huesos Largos y Columna Vertebral. Los huesos planos son los presentes en el cráneo y la cara, así como el esternón. Estos huesos tienen una función de cobertura. Los huesos largos en las cuatro extremidades en animales cuadrúpedos y en las extremidades inferiores en los bípedos se caracterizan por soportar carga. En su mayoría los estudios del PRP en huesos planos pertenecen a especialidades como la Odontología y la Cirugía Maxilofacial. Los estudios en huesos largos y columna vertebral pertenecen, en su mayoría, a grupos de investigadores dedicados a la Cirugía Ortopédica y Traumatología. Se han excluido todos los estudios que hacen referencia a la osteogénesis a distracción, dichos estudios se describirán en el capítulo 3.5.

3.4.1. Experiencia del Plasma Rico en Plaquetas en huesos planos

La bibliografía existente en este campo es muy amplia, se ha intentado recoger los trabajos más relevantes de la última década (268).

a) Estudios en animales

Uno de los aspectos que preocupa a los especialistas que trabajan con implantes dentales es la integración del implante en el hueso. En 2002 se comunicó un trabajo que trataba de evaluar el efecto del PRP en defectos óseos en perros, a los que se les implantaba un implante dental de titanio, sin ningún tratamiento, con aporte de hueso deshidratado, o con hueso deshidratado y PRP (269). El protocolo de obtención del PRP fue la centrifugación secuencial, primero a 1000 rpm durante 10 minutos, y después la centrifugación del sobrenadante a 1500 rpm durante 10 minutos. Los hallazgos histológicos mostraron una cobertura completa por hueso en los implantes que recibieron injerto, con o sin PRP. Los casos tratados con PRP mostraron una mayor cobertura trabecular en el estudio histomorfométrico.

Aghaloo y colaboradores llevaron a cabo defectos circulares de hueso en calota de conejo (270). Se realizaban cuatro defectos por conejo, uno se cubría con autoinjerto de hueso, otro con PRP, otro con PRP y autoinjerto, y el último sin tratamiento. Se estudiaron los defectos en los siguientes meses. Mostraron un aumento significativo de la osificación

en los casos con autoinjerto y autoinjerto con PRP, en comparación con el de sólo PRP y el control sin tratamiento. Los métodos de evaluación fueron radiológicos e histomorfometría (Figura 59).

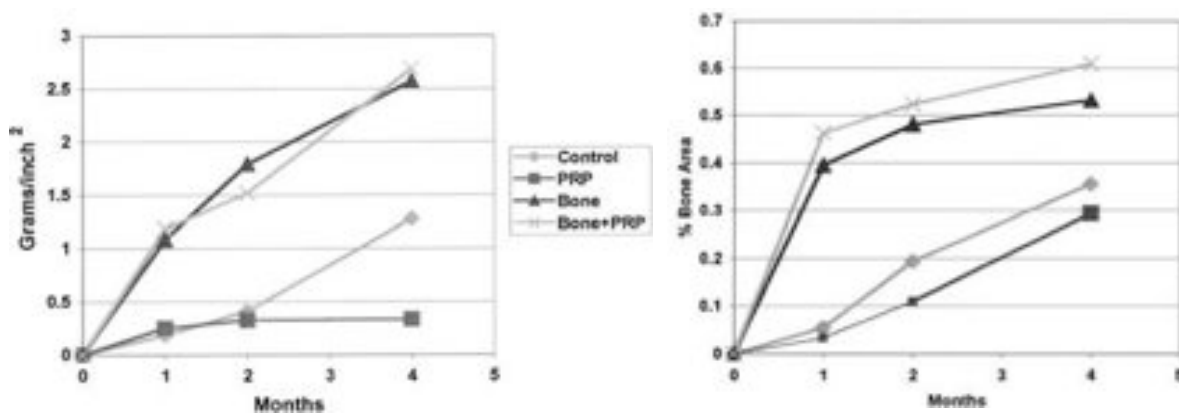


Figura 59. Gráficas que muestran la progresión radiológica e histomorfométrica en la producción de hueso.

Un grupo austríaco publicó en 2003 un estudio en defectos cavitarios en maxilar de cerdos (271). El relleno de dichos defectos se llevaba a cabo o mediante hidroxiapatita bovina o mediante hidroxiapatita bovina y PRP. La obtención del PRP se llevaba a cabo mediante el sistema Teruflex®. Pese a que existían distintos patrones en el grupo intervención respecto al control los autores concluyen que no presenta efecto beneficioso demostrable mediante la histología e histomorfometría.

Parecido al estudio de Aghaloo (270), se presentó un trabajo japonés con defectos óseos craneales en conejos, y también en mandíbula (272). Los defectos óseos eran del mismo tamaño que en el estudio previamente citado. Los defectos craneales eran tratados con PRP con fosfato tricálcico o con gel de fibrina y fosfato tricálcico. Los defectos mandibulares eran tratados con PRP suspendido en gel de fibrina, o sólo con el gel de fibrina. En los dos tipos de defectos se encontró beneficio en la regeneración ósea con PRP.

En 2004 se comunicaron los resultados de un estudio experimental de defectos óseos en hueso frontal de cerdo (273). Para rellenar los defectos se emplearon varios compuestos, como hueso liofilizado bovino (Bio-Oss™), gránulos de fosfato tricálcico (Cerasorb™), hueso bovino colagenizado (Colloss™) o autoinjerto. Cada uno de estos compuestos se incluía en el defecto con o sin PRP, que se obtenía mediante el sistema PRP Kit (Curasan, Kleinostheim, Alemania) o mediante el sistema PCCS PRP System (3i, Hanau, Holanda). Las conclusiones del estudio, tras realizar una evaluación microradiográficamente e inmunohistológicamente, son que la adición de PRP no aporta ningún beneficio cuando se

emplea adicionalmente a un sustituto óseo, pero que en las fases precoces con autoinjerto parece estimular la formación de hueso.

En 2004 se publicó un estudio comparando la función del PRP con la BMP-7 en mandíbula de rata, además de estudiar la capacidad de formar hueso fuera del esqueleto del animal (274). Estas dos sustancias se añadían o no a autoinjerto de costilla y a un sustituto óseo bovino. En este estudio llevaron a cabo la extracción y preparación del PRP mediante el protocolo propuesto por Marx (275). Se llevó a cabo un estudio de crecimiento óseo mediante la administración de fluorocromos y un estudio histomorfométrico. Histomorfométricamente la adición de PRP no proporcionaba ventajas o incrementos significativos de formación de hueso cuando se compara con la el relleno con sólo autoinjerto o sustituto óseo. A nivel extraóseo no tiene capacidad alguna de formar hueso cuando se añade a sustitutos óseos. La adición de BMP-7 al autoinjerto y al sustituto óseo bovino presenta una fuerte formación de hueso en comparación con no añadirlo o añadir PRP.

En 2005 se publicaron los resultados de un estudio en el que se había comparado el tratamiento con autoinjerto óseo y PRP con el tratamiento únicamente con autoinjerto, en defectos cavitarios del maxilar en conejo (276). La preparación del PRP se llevaba a cabo mediante centrifugación secuencial, primero a 150 g durante 20 minutos y posteriormente a 400 g durante 10 minutos. Se analizó la densidad mineral ósea, se analizó con histomorfometría e histología. Este estudio no encontró diferencias estadísticamente significativas ni en densidad mineral ósea ni en la superficie ósea neoformada mediante histomorfometría.

Gerard y colaboradores publicaron en 2006 un estudio experimental en perros, a los que se les producía defectos en ambas ramas mandibulares, la rama derecha era tratada con autoinjerto óseo y PRP y la izquierda sólo con el autoinjerto de cresta ilíaca (277). Se estudió mediante radiología, histología e histomorfometría. El protocolo de obtención del PRP se llevó a cabo con el sistema Harvest®. Las conclusiones del estudio fueron que el PRP no incrementaba la densidad final de trabéculas, sin embargo en las primeras fases parece contribuir a la formación del hueso nuevo que sustituye al injertado, aunque únicamente en las fases iniciales (Figura 60).

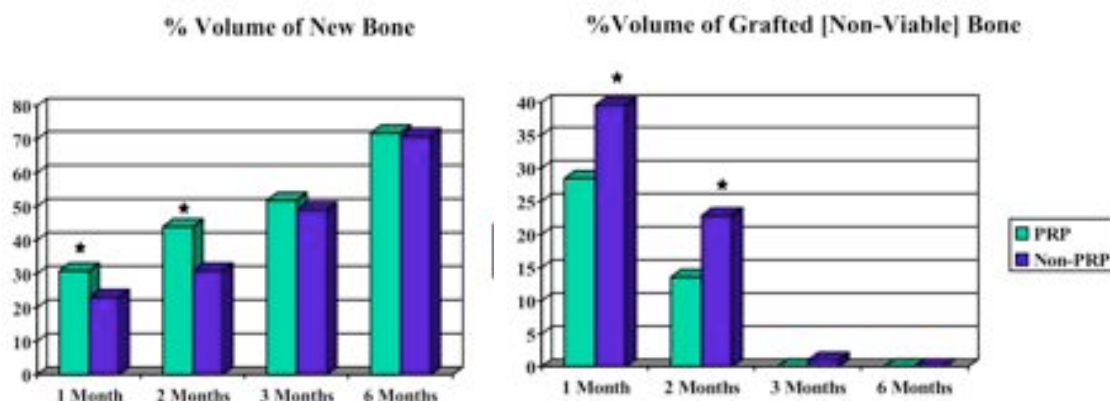


Figura 60. Gráficos que muestran el porcentaje de hueso neoformado y de hueso del injerto no viable por grupos (277).

En 2006 se comunicaron los resultados de un estudio en el que se evaluaba el efecto de autoinjertos óseos de cráneo de conejo con o sin PRP (278). Para la obtención del PRP se llevaron a cabo dos centrifugaciones sucesivas, la primera a 540 g durante 10 minutos, la segunda de 540 g también durante 10 minutos. La interposición del PRP en autoinjerto no produjo beneficios en la consolidación de los defectos óseos, tanto en la valoración histológica como en la valoración de formación ósea total llevada a cabo mediante el estudio histomorfométrico.

En 2006 se comunicaron los resultados de un estudio experimental en defectos óseos craneales en rata. Se evaluó el efecto de la adición de PRP en fase gel o líquida a un material osteoconductor tipo hidroxiapatita (279). El PRP se obtuvo mediante centrifugación a 800rpm durante 15 minutos. Los defectos, de 6mm de diámetro, se rellenaron con el material osteoconductor o con el PRP y el material osteoconductor. Los resultados del estudio mostraron que no había diferencias entre añadir el PRP en fase gel o fase líquida. Tampoco se evidenciaron diferencias entre añadir el PRP o no.

En 2007 un grupo germano publicó un trabajo experimental en cerdos, añadiendo a defectos en maxilar autoinjerto o un sustituto óseo, y combinándolo o no con PRP (280). La preparación del PRP se llevó a cabo con el sistema de dos tubos tipo PRP Kit (Curasan AG, Kleinostheim, Alemania). Las piezas se analizaron mediante microradiografía e histología simple al mes, 8 meses y doce meses. Los resultados no mostraron ningún efecto favorable en formación de hueso en los casos tratados con PRP.

En 2007 se publicaron los resultados de un estudio experimental en perros, con defectos mandibulares y tratados con autoinjerto y adición o no de PRP (281). En este estudio se evaluó el efecto a nivel celular, el mismo grupo había publicado un año antes los resultados macroscópicos (277). La metodología es similar a la ya mencionada para el

estudio macroscópico. Entre los hallazgos destacables, los autores mencionan que el PRP aumenta el número de osteoblastos y osteoclastos en el primer mes. A partir del primer mes el número de células activas es similar.

En 2007 se publicaron los resultados de un estudio experimental en perros con un defecto óseo de tamaño crítico, tratados con fosfato tricálcico en matriz de policaprolactona con o sin PRP (282). El protocolo de obtención del PRP consistía en una centrifugación secuencial, primero de 10 minutos a 2400 rpm y posteriormente el sobrenadante a 3600 rpm durante 15 minutos. Se llevó a cabo un estudio con tomografía e histología. El estudio concluye que las matrices tratadas con PRP presentan una mayor regeneración ósea.

En 2008 se publicó un trabajo experimental en defectos óseos en cráneo de rata (283). Los casos fueron tratados o con un coágulo de sangre, con PRP activado, con cloruro cálcico o con tromboplastina. La elaboración del PRP se llevó a cabo mediante una centrifugación secuencial, primero a 160 g durante 20 minutos y posteriormente a 400 g durante 15 minutos. Se analizaron los resultados a las 4 y 12 semanas, llevando a cabo histología e histomorfometría de las piezas. Ningún caso regeneró por completo el defecto, únicamente el grupo tratado con PRP activado con cloruro cálcico presentaba mayor regenerado óseo. El mismo grupo científico había publicado previamente ese mismo año otro trabajo similar, en el que los casos eran tratados o con un coágulo de sangre o con PRP sin diferencias en el tipo de activador (284).

En 2009 se publicó un estudio que evaluaba los efectos del PRP en las células óseas de la región periodontal (285). Para ello se cultivaron células procedentes del ligamento periodontal y maxilar y se expusieron a distintas concentraciones plaquetares obtenidas de voluntarios sanos. Los resultados de proliferación celular mostraron un aumento de proliferación osteoblástica en las mayores concentraciones de plaquetas.

Ogino y colaboradores publicaron en 2009 un estudio in vitro con médula ósea de rata (286). Tras extraer la médula ósea de rata ésta era cultivada en un medio celular con la adición de distintas concentraciones de PRP. El PRP se obtuvo mediante doble centrifugación secuencial, primero a 140 g durante 10 minutos y posteriormente el sobrenadante a 140 g durante otros 10 minutos. Se cuantificó el número de osteoclastos, su actividad y la producción de osteoprotegerina en los siguientes días. La cuantificación de osteoclastos muestra una menor proliferación de los mismos en presencia de mayores concentraciones de plaquetas. Los resultados de cuantificación mediante ELISA

mostraron que el PRP aumenta la síntesis de osteoprotegerina, un inhibidor de la osteoclastogénesis. En la discusión del artículo los autores sugieren que esta inhibición de la osteoclastogénesis podría influir en el hueso inhibiendo la resorción ósea debida a función osteoclástica.

En 2009 Nagata y colaboradores publican un estudio experimental de defectos óseos de tamaño crítico en cráneo de conejo tratados con autoinjerto y adición o no de PRP (287). En los resultados se evidencia que el tratamiento del defecto con autoinjerto es superior a tratar el defecto con un coágulo de sangre (grupo control), y que la adición de PRP sólo tiene efecto durante las primeras cuatro semanas, igualándose a las doce semanas al grupo únicamente tratado con autoinjerto.

Se ha llevado a cabo un estudio sobre el efecto del PRP en la curación de esternotomías de ovejas (289). El protocolo de obtención del PRP consistía en una única centrifugación a 1800rpm durante 8 minutos, posteriormente se pipeteaba el sobrenadante, reservando el mililitro inmediatamente adyacente a la fase eritrocitaria para la preparación del PRP. La activación del PRP se llevaba a cabo con 50 µL de cloruro cálcico al 10% por cada mililitro de PRP. Los autores emplearon el protocolo de obtención del PRGF™ de Anitua adaptándolo para el modelo animal con oveja (248,249,255,259). Las ovejas fueron sacrificadas a las nueve semanas, llevándose a cabo un análisis histológico de los esternones. En los casos no tratados con PRP se observó presencia de tejido cartilaginoso, no así en los tratados con PRP, que presentaban trabéculas óseas más maduras. Los autores concluyen que el PRP acelera la curación y maduración del regenerado óseo de las esternotomías en oveja.

b) Estudios Clínicos

Se ha empleado el PRP para el relleno de cavidades sinusales en casos de osteolisis perimplante. Rodriguez y colaboradores mostraron en 2003 una serie de casos sin grupo control, en los que habían empleado injerto de hueso bovino con PRP (290). Para la obtención del PRP los autores empleaban el sistema Harvest®. Los autores describen un éxito quirúrgico del 92,9%, y recomiendan el uso de xenoinjerto óseo con PRP para los defectos óseos maxilares.

En 2004 Oyama y colaboradores presentan una serie de 7 casos de pacientes con defectos óseos alveolares tratados todos mediante aporte de autoinjerto de cresta ilíaca y PRP (291). El estudio presenta un grupo control de 5 casos que recibieron tratamiento con

autoinjerto de cresta y sin PRP. El modo de obtención del PRP era mediante centrifugación secuencial, primero a 160 g durante 20 minutos, y posteriormente el sobrenadante a 400 g durante 15 minutos. En los resultados del estudio los autores destacan que el grupo intervención presenta un volumen de hueso regenerado superior al grupo control.

En 2005 Sammartino y colaboradores publicaron los resultados de una serie de casos en los que se había empleado PRP para rellenar la cavidad alveolar remanente tras la extracción del tercer molar (292). El protocolo de obtención de PRP consistía en la centrifugación a 1200 rpm durante 15 minutos y posterior pipeteado de la franja cercana a la fase eritrocitaria. Se activaba el PRP hasta obtener un coágulo con el que cubrir el defecto alveolar. El grupo control no recibía tratamiento adicional al habitual para las extracciones molares. Los resultados se midieron radiológicamente, concluyendo que la complementación del procedimiento de extracción molar con PRP aceleraba la regeneración ósea y el resultado clínico.

En 2005 se publicó un estudio sobre la capacidad de remodelación del autoinjerto de hueso en presencia de PRP en los procedimientos de relleno del maxilar (293). Este estudio clínico, llevado a cabo en pacientes edéntulos con severa pérdida de masa ósea maxilar. Consistía en el aporte de autoinjerto de cresta ilíaca al maxilar y administrar o no PRP al autoinjerto. La obtención de PRP se llevó a cabo mediante el sistema Platelet Concentration Collection System™ (PCCS kit, 3i Implant Innovations). La administración o no del PRP fue randomizada. A los tres meses del procedimiento se llevó a cabo una biopsia con microtrefina del autoinjerto. No existieron diferencias clínicas ni histomorfométricas entre los dos grupos.

En 2006 Mannai publica una serie de 97 casos tratados todos de defectos óseos maxilares con autoinjerto o xenoinjerto y adición de PRP, comunicando un 97,8% de buenos resultados (294). La serie de casos es evaluada radiológicamente y mediante la impresión clínica. El sistema de obtención del PRP es el sistema Harsvest®.

El tratamiento con bifosfonatos a altas dosis puede producir necrosis avascular mandibular (295). En 2007 Curi y colaboradores presentaron una serie de casos de pacientes con necrosis avascular con antecedente de cáncer y tratamiento con bifosfonatos (296). Estos casos fueron tratados mediante curetaje y adición de PRP obtenido mediante el sistema Harvest®. Los autores cuentan unos resultados favorables, sin existir medida cuantitativa de ningún resultado.

En 2009 se publicaron los resultados de un ensayo clínico aleatorizado sobre el tratamiento de defectos óseos mandibulares con PRP o con un sustituto óseo bovino (288). El protocolo de obtención del PRP incluía la extracción de 20 cc de sangre a cada paciente, y la centrifugación a 300 rpm durante 10 minutos en los casos en que la aleatorización indicó tratamiento con el PRP, la extracción de los tubos se llevaba a cabo mediante pipeteado. Se llevaron a cabo mediciones radiológicas mediante tomografía computerizada. Los autores concluyen que no encuentran beneficios en el uso del PRP ni a nivel clínico ni radiológico.

3.4.2. Experiencia del Plasma Rico en Plaquetas en huesos largos y columna vertebral

Como el uso del PRP se empezó usando inicialmente en las disciplinas medicoquirúrgicas involucradas en la patología cráneo-facial existió un retraso de unos pocos años hasta que empezaron a publicarse trabajos en huesos largos de extremidades y en raquis (297-299).

a) Estudios en animales

En 2005 se comunicó el primer trabajo sobre el PRP en fracturas de huesos largos (300). Se llevó a cabo un estudio experimental en 16 ratas, a las que se les producía una fractura abierta de fémur, siendo tratadas o con suero fisiológico o con PRP. El análisis de las piezas a las tres semanas mostró una consolidación radiológica superior en el grupo del PRP. Histológicamente destacó el aumento trabecular en el grupo tratado. El estudio biomecánico mostró similares parámetros en los dos grupos. El estudio inmunohistoquímico sugirió una expresión precoz de TGF- β 1 y BMP-2 en los casos tratados con el PRP, lo que puede estar relacionado con el aumento en la formación ósea, según los autores.

Lucarelli llevó a cabo un estudio en ovejas sobre la integración de aloinjertos intercalares en defectos femorales (301). El PRP se obtenía mediante doble centrifugación secuencial, primero a 1000 g durante 15 minutos y posteriormente a 3000 g durante 10 minutos. La activación se llevaba a cabo mediante cloruro cálcico y trombina. Al PRP se añadía un concentrado en células mesenquimales de médula ósea. El grupo control no recibía tratamiento adicional. Los resultados mostraron una mejoría en la integración del

aloinjerto, con una mayor formación ósea, mayor madurez del regenerado y mayor vascularización del mismo.

En 2005 se publicó un trabajo en defectos segmentarios femorales en conejo tratados con concentrados de células mesenquimales de médula ósea, PRP y aloinjertos óseos, de modo aislado o en combinación (302). En total se realizaron siete grupos mediante el tratamiento aislado o con las distintas combinaciones posibles. El PRP se procesó mediante centrifugado secuencial, primero a 1000 rpm durante 5 minutos y posteriormente 15 minutos a 1900 rpm. En los resultados se observó que las distintas combinaciones producían más regenerado óseo que los tratamientos aislados, de los aislados el que menor regenerado óseo producía era el PRP, pero producía más regenerado que los conejos sin ningún tratamiento. Todos los grupos sufrieron un incremento en el regenerado óseo a lo largo del tiempo (2, 4 y 12 semanas). Sin embargo el regenerado en el grupo del PRP el regenerado fue mayor en las primeras semanas, disminuyendo en las siguientes.

Se estudió el efecto del PRP en fracturas femorales en un modelo en rata diabética (303). La obtención del PRP se llevó a cabo mediante doble centrifugación secuencial, primero a 1800 rpm durante 10 minutos y posteriormente a 3600 rpm durante 10 minutos. Se estudió la proliferación celular, la histomorfometría y se llevó a cabo un test mecánico. Se incluyó un grupo control de ratas diabéticas sin tratamiento adicional de la fractura y otro grupo control de ratas no diabéticas. A los cuatro días la formación de cartílago era superior en el grupo tratado, aunque sin diferencias estadísticamente significativas, para convertirse en una diferencia más marcada a los 7 días, con diferencias estadísticamente significativas. El estudio biomecánico mostró una superioridad mecánica en el grupo tratado en todos los tests realizados, sin embargo no llegó a igualar la resistencia del fémur de la rata no diabética. Los autores destacan la utilidad del PRP en fracturas de hueso metabólicamente desfavorable.

En 2006 se publicó un estudio de defectos segmentarios en huesos largos de fémur de oveja, tratados o con una matriz de colágeno o con la matriz de colágeno empapada en PRP (304). El PRP se obtenía mediante una doble centrifugación secuencial, en un primer lugar a 840 g durante 10 minutos, posteriormente a 1310 g durante 10 minutos. Se llevó a cabo un estudio radiológico mediante radiología simple y tomografía computerizada, así como histología simple, histomorfometría y estudio de neoformación ósea con fluorocromos. El volumen de hueso, la densidad mineral ósea, las propiedades biomecánicas del regenerado, la histología y la histomorfometría no difieren entre los dos

grupos, por lo que los autores concluyen que el PRP no presenta las propiedades regeneradoras necesarias para este tipo de defectos segmentarios en diáfisis femoral.

En 2007 se publicó un estudio de defectos segmentarios en fémur de rata (305). Se trataron o con una matriz de fosfato policaprolactona-tricálcico o con la matriz y PRP. El PRP se obtuvo del centrifugado secuencial, inicialmente a 2400 rpm durante 10 minutos, y posteriormente a 3600 rpm durante 15 minutos. El defecto se llevaba a cabo en las dos patas traseras, en ambos fémures, con lo que en un fémur se implantaba la matriz aislada y en la otra la matriz con el PRP. Se llevó a cabo un estudio radiológico simple y con tomografía computerizada, así como un estudio histológico y biomecánico a las 12 semanas. Los resultados mostraron que las matrices permitían el crecimiento óseo en su interior pero no el crecimiento puenteando el defecto. Los casos tratados con el PRP presentan mayor crecimiento óseo y mejores parámetros biomecánicos.

En 2010 se ha publicado un trabajo de defectos corticales en huesos largos de cerdo (306). Se llevó a cabo un tratamiento del defecto cortical de tamaño crítico mediante relleno con autoinjerto o bien mediante autoinjerto y PRP. El PRP se obtenía mediante el procesado de la sangre del cerdo en el sistema GPS-II®. Se estudiaron las piezas a las seis semanas, mediante radiología simple, histología e histomorfometría. Los hallazgos mostraron que todos los casos habían regenerado, pero sólo los del grupo del PRP tenían un regenerado completo. Los datos de la histomorfometría muestran que el porcentaje de hueso nuevo en los casos control es del 39.4% del área de corte, frente al 55.9% del grupo del PRP.

Gran parte de los procedimientos quirúrgicos llevados a cabo en cirugía de la columna consisten en buscar una artrodesis o fusión intervertebral. Esta artrodesis puede llevarse a cabo por vía anterior y ser intersomática, con ayuda o no de cajas o injertos, o llevarse a cabo por vía posterior, lo que suele denominarse intertransversa. A principios de ésta última década se inició el interés por el PRP en cirugía vertebral (307).

La primera evaluación del posible efecto del PRP se llevó a cabo en cerdos, en artrodesis anteriores instrumentadas con cajas de biocerámicas (159). La extracción del PRP se llevó a cabo mediante el sistema Symphony® (DePuy Acromed), obteniéndose concentraciones de plaquetas entre 4 y 5 veces la de la sangre. Se hicieron tres grupos, uno con la biocerámica, el segundo con la biocerámica y PRP, y el tercero con autoinjerto. Los resultados no mostraron ninguna fusión completa a los tres meses en los dos primeros grupos, observándose sólo fusiones parciales, en el grupo con autoinjerto el 50% tenían

una fusión completa y el 50% una fusión parcial. La evaluación se llevó a cabo mediante radiología simple, tomografía computerizada e histología. A la luz de estos resultados los autores concluyen que el PRP no aporta ningún efecto en la fusión intersomática vertebral por vía anterior.

La mayoría de los procedimientos quirúrgicos que precisan de una discectomía cervical conllevan la necesidad de realizar una artrodesis intersomática por vía anterior. En 2010 se presentó un estudio experimental de artrodesis cervical anterior en ovejas (308). Se hicieron tres grupos, el primero con una caja intersomática de titanio rellena de autoinjerto de cresta ilíaca, el segundo con la caja rellena con una matriz mineralizada de colágeno, y el tercero con la matriz mineralizada de colágeno y PRP. El PRP se obtuvo mediante el procesamiento de la sangre en el sistema GPS-Disposal Kit (Biomet Biologics), y activado con trombina. El estudio se completó con tomografía computerizada de las piezas e histomorfometría de la histología a las doce semanas. El estudio concluyó que no había diferencia entre añadir o no el PRP a la matriz mineralizada, y que el grupo con autoinjerto presentaba los mejores resultados. La conclusión final es que la adición de PRP a matrices de colágeno no aporta beneficios en la fusión intersomática cervical.

b) Estudios clínicos

En 2007 se presentaron los resultados de un ensayo clínico llevado a cabo en osteotomías valguizantes de apertura en la tibia (309). Se aleatorizaron tres tipos de tratamiento: chips de hueso liofilizado, chips y PRP, o chips con PRP y concentrado de células mesenquimales de médula ósea. A las seis semanas se llevó a cabo una tomografía computerizada y una biopsia con trefina, de la que se realizó un estudio histomorfométrico. En el artículo original no se explica el protocolo de obtención del PRP, sin embargo se afirma que se administra 1×10^6 plaquetas/ μL . Entre los resultados se destaca un aumento en el número de osteoblastos y de áreas de osteoide en el grupo tratado con PRP con o sin células mesenquimales. Además se observa una mayor aposición de trabéculas en los chips de hueso liofilizado en los dos grupos con PRP.

En 2007 se presentó el resultado de un ensayo clínico aleatorizado sobre el tratamiento de pseudoartrosis de huesos largos (310). Se aleatorizó la administración de rhBMP-7 o de PRP. Sin embargo esos no eran los únicos tratamientos, puesto que los pacientes eran reintervenidos, modificando la osteosíntesis y añadiendo injerto o sustituto

de injerto (se empleó aloinjerto de Banco de Huesos, xenoinjerto e hidroxapatita granulada). Están incluidos casos de pseudoartrosis en húmero, cúbito, radio, fémur y tibia, haciendo un total de 120 casos. No todos los casos habían sufrido el mismo número de intervenciones antes de entrar en el ensayo, la media de intervenciones por caso antes del ensayo era de 2 (rango de 1 a 5 cirugías). Los resultados muestran que la proporción de consolidaciones en el grupo de la rhBMP-7 era del 86,7%, frente a un 68,3% en el grupo del PRP.

En 2009 se publica un estudio multicéntrico sobre el tratamiento de pseudoartrosis de huesos largos (311). El artículo consiste en la descripción de 15 casos de pseudoartrosis no hipertrófica, tratados todos con nueva cirugía y adición de PRP con los detalles del protocolo de elaboración habituales en este grupo (255,312). Además se hacía aporte de injerto y nueva osteosíntesis. El tiempo medio hasta la consolidación es de 4.9 meses postintervención. Pese a no tener un grupo control los autores afirman que la seguridad clínica y beneficios en la curación de los distintos tejidos hacen del PRP un excelente adyuvante en las cirugías de revisión de pseudoartrosis de huesos largos.

En 2005 se publicó un estudio clínico en el que se evaluó el efecto del PRP en la artrodesis posterolateral instrumentada de la columna (313). Un grupo de 76 pacientes fueron tratados mediante artrodesis posterolateral instrumentada de la columna lumbar con aporte de autoinjerto de cresta ilíaca y PRP obtenido mediante la máquina del recuperador de sangre para autotransfusión. Se llevó a cabo un protocolo de obtención del PRP presentado en 1999 (314). El grupo control se seleccionó aleatoriamente de la cohorte histórica de pacientes intervenidos del mismo procedimiento sin PRP, se llevó a cabo un emparejamiento caso-control ajustado a las variables de sexo, edad, niveles de fusión y hábito tabáquico. Mediante tomografía computerizada en cortes coronales se analizó la fusión, el grupo con PRP sufrió un 25% de pseudoartrosis, mientras que el grupo control presentaba un 17%. Los autores concluyen que el PRP en cirugía de fusión vertebral no aporta ninguna ventaja, encarece el procedimiento y aumenta riesgos, por lo que desaconsejan su uso en este tipo de cirugía.

3.5. Experiencia del Plasma Rico en Plaquetas en osteogénesis a distracción

Se ha dividido en dos apartados las distintas experiencias recogidas en la literatura científica en relación al tratamiento con Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en la osteogénesis a distracción de huesos planos o en huesos largos.

3.5.1. Experiencia del PRP en osteogénesis a distracción en huesos planos

a) Estudios en animales

En 2005 se publicó un trabajo experimental en calota de ovejas a las que se les sometía a un régimen de distracción con un sistema de fijación-distracción, el objetivo del estudio era evaluar el posible efecto del PRP en el regenerado óseo (315). Se intervinieron 16 ovejas, distribuidas en 4 grupos. El grupo 1 no recibía tratamiento con PRP, la latencia hasta la distracción desde el momento de la osteotomía fue de 5 días. El grupo 2 tampoco recibió tratamiento adicional, la latencia era de 0 días. El grupo 3 recibía tratamiento con PRP y la latencia hasta la distracción era de 5 días. El grupo 4 recibía el tratamiento con PRP pero con una latencia hasta la distracción de 0 días. El PRP era procesado de 250 cc de sangre periférica mediante un centrifugado secuencial cuyas características no se mencionan en el artículo original. El PRP era activado en el momento de la cirugía mediante la aplicación de trombina y cloruro cálcico. La aplicación del PRP en los grupos 3 y 4 se llevaba a cabo durante el acto quirúrgico de la osteotomía, aplicándose en el espacio a distraer (Figura 61).

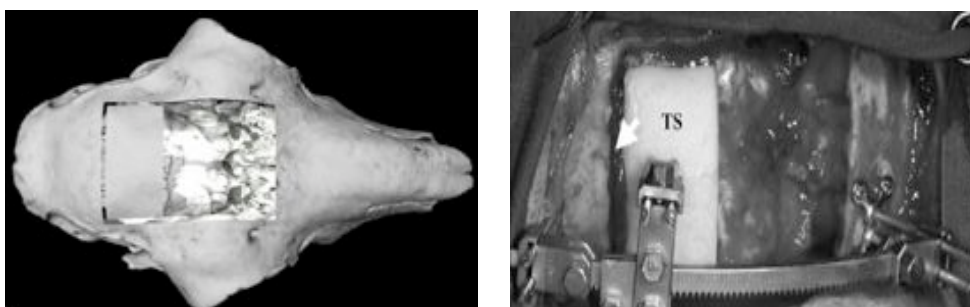


Figura 61. Esquema del procedimiento quirúrgico e imagen quirúrgica marcando con una flecha el lugar de la aplicación del PRP en los grupos 3 y 4 (315).

Se estudiaron los regenerados a las seis semanas del inicio del experimento, llevándose a cabo un estudio volumétrico mediante tomografía computerizada y un

estudio de densidad mineral ósea mediante el cálculo de regenerado en unidades Hounsfield. Sólo en la zona más proximal del regenerado se encontró mayor formación de hueso en el grupo del PRP con distracción inmediata (latencia 0 días). Al analizar globalmente por grupos el volumen de hueso regenerado respecto al espacio distraído y al analizar la densidad del regenerado en Unidades Hounsfield (HU) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 62). Los autores concluyen que el PRP no aumenta la formación de hueso en términos globales en la osteogénesis a distracción en calota de oveja.

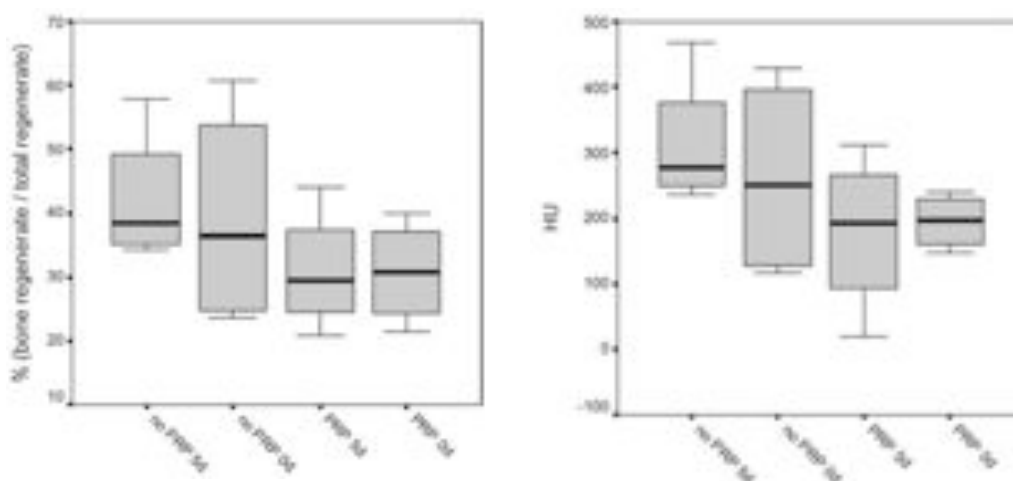


Figura 62. Gráficos Box Plot que muestran el volumen porcentual de hueso formado y densidad ósea en Unidades Hounsfield por grupos, no hubo diferencias estadísticamente significativas (315).

En 2008 se publicó un trabajo experimental en osteogénesis a distracción de mandíbulas de conejo, para evaluar el efecto regenerador del combinado de células mesenquimales de médula ósea expandidas y PRP, al combinado le denominan los autores TEOM (“Tissue-Engineered Osteogenic Material”) (316). Se intervienen doce conejos, que se dividen en un grupo con TEOM y otro grupo control al que se le inyecta en el foco de osteotomía suero salino o PRP aislado. La distracción la inician al cabo de 5 días tras la osteotomía, y la inyección de TEOM, de PRP o de suero salino se lleva a cabo al final de la distracción. El PRP se obtuvo mediante doble centrifugación secuencial, primero a 5 minutos a 1100 rpm y posteriormente 10 minutos a 2500 rpm. Se analizaron a las cuatro semanas del inicio del experimento. Se realizaron radiografías secuenciales durante las semanas 2, 3 y 4. Tanto el estudio de radiodensidad como la histomorfometría mostraron que el grupo tratado con TREOM había producido más hueso que el grupo control. Dentro del grupo control se observó que el PRP había incrementado parcialmente la formación de hueso respecto al grupo tratado sólo con suero fisiológico.

Recientemente un grupo surcoreano ha publicado los resultados del uso de un combinado de PRP con células madre mesenquimales en la osteogénesis a distracción de mandíbulas de conejos (317). En un grupo de 19 conejos se trató la osteotomía con PRP, el grupo intervención con el combinado. La inyección del PRP o del combinado se hacía en el primer día de la fase de consolidación. El combinado aumentó radiológicamente e histomorfométricamente la formación de hueso respecto al grupo control y acortó la fase de consolidación.

b) Estudios clínicos

Los dos trabajos clínicos indexados en PubMed sobre PRP en osteogénesis a distracción en huesos planos son del mismo grupo de autores. El primero de esos trabajos se publicó en 2002, y hacía referencia al resultado preliminar de cinco pacientes intervenidos de distintas displasias mandibulares que requirieron tratamiento mediante osteogénesis a distracción (318). Estos pacientes recibieron tratamiento con PRP con autoinjerto de cresta ilíaca para rellenar el espacio distraído. El trabajo consiste en la descripción de las patologías y de los tratamientos recibidos. La obtención del PRP se lleva a cabo mediante el protocolo descrito por Marx (257), mediante una centrifugación secuencial, inicialmente durante 15 minutos a 180g y posteriormente a 560g durante 15 minutos. El autor describe los resultados como satisfactorios.

Posteriormente se publicaron los resultados a largo plazo de los casos previamente descritos (319). En 2008 la serie descrita era de 12 casos. El protocolo de obtención del PRP era el mismo que el descrito previamente. La serie no se compara con ningún grupo control. Los autores recomiendan el PRP con autoinjerto de cresta ilíaca en el tratamiento de defectos severos del hueso mandibular.

3.5.2. Experiencia del PRP en osteogénesis a distracción en huesos largos

La mayoría de la bibliografía indexada en PubMed sobre PRP en Osteogénesis a Distracción en huesos largos tiene como autores a un grupo clínico e investigador de Japón. Los trabajos clínicos que han publicado están en relación con una misma serie terapéutica de casos de acondroplasia tratados con PRP y células mesenquimales de médula ósea en el foco de distracción. El estudio en animal que hay publicado es un trabajo de apoyo y confirmación del concepto de dosis-respuesta del PRP a distintas concentraciones en el foco del callo de elongación óseo en ratas.

No existe ningún modelo publicado de elongación ósea diafisaria en mamífero grande con tratamiento mediante PRP.

a) Estudios en animales

En 2008 se publicó la experiencia del PRP en la osteogénesis a distracción del fémur de rata (320). El PRP era suplementado con células mesenquimales de médula ósea expandida. Se variaron las distintas concentraciones de plaquetas con la intención de observar la influencia de dicha concentración en el regenerado óseo. Se empleó el protocolo de obtención del PRP propuesto por Marx (257), en el que se llevaba a cabo una centrifugación a 1100 g durante 10 minutos. Se llevaron a cabo varias concentraciones de plaquetas: Plasma Pobre en Plaquetas, Plasma Poco Concentrado en Plaquetas, Plasma Medio Concentrado en Plaquetas y PRP, se empleó un control de gel de colágeno. La concentración en células mesenquimales de médula ósea no se varió. Se cultivaron las células expandidas en un medio celular con las distintas concentraciones de plaquetas, evidenciándose que a los 2, 4 y 6 días la proliferación de estas células, in vitro, era superior en las concentraciones superiores de plaquetas (Figura 63).

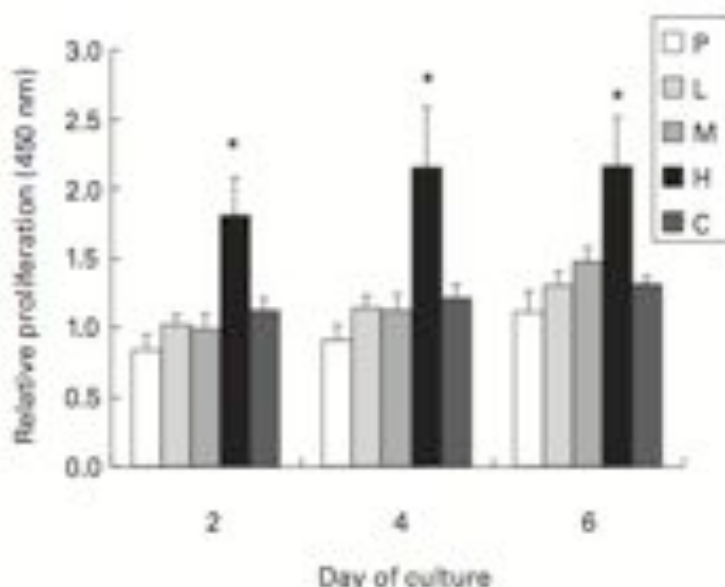


Figura 63. Gráfico que muestra la proliferación de las células mesenquimales en las distintas concentraciones de plaquetas (pobre: P, baja: L, media: M, alta: H, colágeno: C) (320).

Las elongaciones femorales se llevaron a cabo en un total de 91 ratas. Se procedió a iniciar la elongación a partir del séptimo día, y a un ritmo de 0,375 mm cada 12 horas, durante diez días. La inyección del combinado de células mesenquimales y las distintas concentraciones de plaquetas se produjo justo antes de completar la elongación. El estudio se completó con un análisis mediante radiología simple y un estudio volumétrico mediante

tomografía computarizada. Los resultados de las volumetrías mostraban un incremento en el volumen de hueso formado a medida que se aumentaba la concentración de las plaquetas (Figura 64). Los autores concluyeron el estudio afirmando que se comprobaba el efecto beneficioso del PRP en conjunción con las células mesenquimales expandidas de médula ósea en el regenerado óseo del hueso largo de rata sometido a osteogénesis a distracción. Concluyeron también que obtuvieron mayor regenerado con mayor concentración plaquetar.

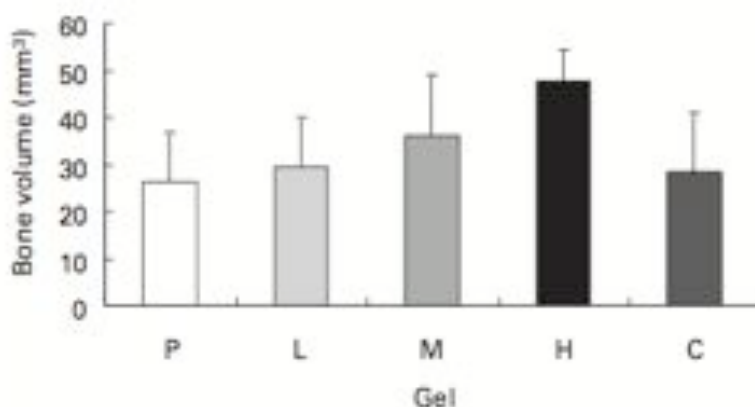


Figura 64. Volumen de hueso formado en los distintos grupos de concentración plaquetar (pobre: P, baja: L, media: M, alta: H, colágeno: C) (320).

b) Estudios clínicos

En 2004 Kitoh publica un serie de tres casos de osteogénesis a distracción en pacientes con disimetrías de extremidades, a los que como parte del tratamiento se les inyectaba PRP y células mesenquimales de médula ósea expandidas (321). Se llevaron a cabo tres elongaciones femorales y dos tibiales en tres pacientes, dos de los cuales eran acondroplásicos, el tercero presentaba una pseudoartrosis congénita de la tibia. El PRP se obtenía de 200 ml de sangre periférica de los pacientes, se llevaba a cabo una primera centrifugación durante 15 minutos a 200 g, se separaban las fases y se repetía la centrifugación, esta vez a 560 g durante 15 minutos. Se inyectaban aproximadamente 5 ml de PRP. La inyección se llevó a cabo a las tres semanas de la osteotomía, bajo control escópico y simultáneamente con el PRP por una aguja y por otra las células mesenquimales de médula ósea (Figura 65). Antes de acabar el proceso se repetía una segunda infiltración. Los cinco procedimientos de elongación sucedieron sin complicaciones. Los autores valoraron positivamente los resultados.

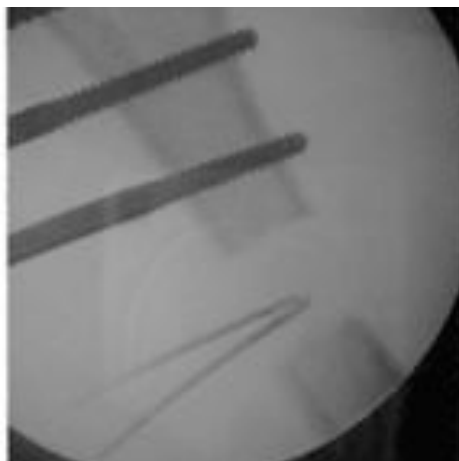


Figura 65. Inyección por dos agujas del combinado de PRP y células mesenquimales de médula ósea a los 21 días de la osteotomía (321).

En 2007 el anterior grupo japonés publicó los resultados del tratamiento de pacientes con hipocondroplasia y acondroplasia mediante osteogénesis a distracción y PRP con células mesenquimales (322). Se comparó un grupo de pacientes tratados con la combinación del PRP y células expandidas de médula ósea con una cohorte histórica de pacientes a los que se les había realizado el mismo procedimiento de elongación sin tratamiento complementario. El protocolo para la obtención del PRP fue el descrito por Marx y colaboradores (257), obteniendo una concentración final entre 4 y 5 veces la concentración de plaquetas en sangre periférica de los pacientes. En el grupo intervención se encontraban 11 pacientes con 24 segmentos óseos elongados, y el grupo control se compuso de 9 pacientes con 32 segmentos óseos elongados. Se estudió el incremento en longitud, el índice de madurez radiológica y el resultado clínico. Los resultados mostraban que la ganancia final de longitud fue similar en ambos grupos, sin embargo el índice de curación expresado en días por centímetro ganado de longitud era menor en el grupo tratado con la combinación entre PRP y las células de médula ósea expandidas. Concluyen los autores que el tratamiento combinado acelera la curación del regenerado de la osteogénesis a distracción, pudiendo acortar el procedimiento de elongación.

Ese mismo año, en el 2007, el mismo grupo publica en otra revista un estudio clínico similar, en el que se evalúa la misma combinación terapéutica de PRP y células mesenquimales de médula ósea expandidas en osteogénesis a distracción (323). Los grupos intervención y control son mayores que en el anterior artículo citado, incluyendo 17 pacientes con 32 segmentos en el grupo intervención y 29 pacientes con 60 segmentos elongados en el grupo control. Las variables estudiadas son las mismas que en el estudio anterior. En los resultados se presenta el mismo hallazgo de un índice de maduración más

corto en el grupo tratado con el combinado. Se observó un retraso de consolidación del regenerado en el 45% de los casos del grupo control frente a ninguno en el grupo intervención. En el grupo control se describieron un 23% de complicaciones, frente a un 6% del grupo intervención. Los autores concluyen que el tratamiento combinado con PRP y células mesenquimales de médula ósea expandidas en la osteogénesis a distracción proporciona una maduración superior del regenerado, permitiendo realizar el procedimiento más rápido y con menos complicaciones. En los dos últimos artículos Kitoh remite a su primer trabajo del 2004 para hacer referencia al protocolo de inyección, que se realiza en dos ocasiones y simultáneamente (321).

En 2009 Kitoh publica un trabajo en el que aumenta la serie previamente publicada en 2007 y lleva a cabo un análisis de regresión entre el Índice de Curación (días de fijador por cada centímetro de regenerado) y las distintas variables referentes al PRP y al concentrado de células mesenquimales de médula ósea expandidas (324). La metodología quirúrgica expuesta en este artículo y de técnicas de obtención de los preparados biológicos es similar a la de los previos. En los alargamientos femorales el estudio de correlación lineal mostró una correlación negativa entre el número de células mesenquimales de médula ósea que se inyectó y el Índice de Curación ($r=-0,451$; $p=0,0309$). Mostró también para los alargamientos femorales una correlación negativa entre el Índice de Curación del regenerado y la actividad osteoblástica de la células inyectadas ($r=-0,425$; $p=0,0430$) (medido en actividad de fosfatasa alcalina específica del hueso) (Figura 66).

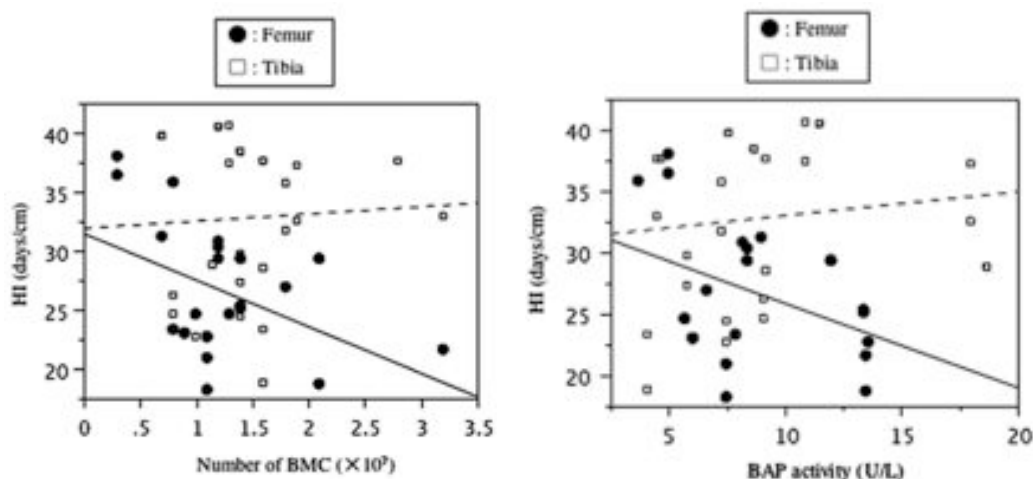


Figura 66. Gráficos de regresión lineal donde se observa la correlación negativa en los alargamientos femorales entre el Índice de Curación (HI) y la concentración de células mesenquimales de médula ósea (BMC) y la actividad osteoblástica (BAP) (324).

3.6. Evidencia científica actual sobre el Plasma Rico en Plaquetas: revisiones sistemáticas

Se ha llevado a cabo una búsqueda de las Revisiones Sistemáticas relacionadas con el Plasma Rico en Plaquetas (PRP), para ello se han incluido en PubMed los criterios de búsqueda siguientes: “Platelet-Rich Plasma” AND “Systematic Review”.

En 2006 se publicó una Revisión Sistemática llevada a cabo por Cochrane sobre el uso de distintas técnicas de aumento óseo en el procedimiento de tratamiento con implantes dentales (325). Se revisaron los trabajos clínicos referentes a técnicas de relleno óseo en defectos maxilares y mandibulares. Se evaluó la metodología de los distintos trabajos, tomando inicialmente 29 ensayos clínicos hasta octubre del 2005. De éstos se excluyeron 16 por problemas metodológicos y 2 por no presentar datos que se pudiesen usar en la Revisión Sistemática. De las cinco conclusiones que enuncian los autores de la Revisión Sistemática la quinta afirma que no existen pruebas fiables que apoyen la eficacia del PRP con implantes dentales.

En 2008 se publica en la revista *Clinical Oral Implant Research* una Revisión Sistemática sobre el uso del PRP en odontología, llevada a cabo por responsables del College of Dental Sciences de Holanda (326). Se inició la Revisión Sistemática partiendo de 108 referencias bibliográficas, para analizar finalmente 17 y seleccionar definitivamente para la inclusión de datos de 9 de ellos. Entre las conclusiones del trabajo se destaca que los autores encuentran evidencia del beneficio del PRP en el tratamiento de los defectos periodontales, la evidencia existente en el uso del PRP en la cirugía de defectos óseos del maxilar es débil.

En 2009 se publica en *Transfusion* una Revisión Sistemática sobre y la eficacia y seguridad del PRP en la regeneración de tejidos, llevada a cabo por el Centro Iberoamericano de Cochrane, la Universidad Autónoma de Barcelona y el Banco de Sangre y Tejidos de Cataluña (327). La Revisión Sistemática se inicia en 2016 estudios indexados en Central, Medline, Embase y Science Citation Index, de los que finalmente se seleccionan 20 ensayos clínicos aleatorizados (11 en odontología, 7 en úlceras cutáneas y 2 en heridas quirúrgicas). Entre las conclusiones se enuncia que el PRP mejora la recesión gingival pero no mejora clínicamente el anclaje de piezas en la periodontitis crónica. Los hallazgos en los resultados estudiados sobre el uso del PRP hace que no se pueda hablar de evidencia firme sobre su uso. También destacan la ausencia de datos sobre la seguridad

del uso de este tratamiento. Comentan los autores la necesidad de que se diseñen nuevos ensayos clínicos aleatorizados que puedan aportar evidencia sobre la seguridad y eficacia de este tratamiento.

En 2009 se publicó en *Injury* una Revisión Sistemática sobre el uso del PRP en la regeneración ósea (328). Se excluyeron todos los trabajos experimentales *in vitro* y en animales, así como aquellos en los que se involucraba el tratamiento regenerador de huesos cráneo-faciales, tampoco se incluyeron los trabajos clínicos en raquis. Se analizaron todos los trabajos clínicos en los que se describía el tratamiento con PRP en la regeneración de hueso de extremidades. Entre las conclusiones de esta Revisión Sistemática se destaca que sólo existe un ensayo clínico aleatorizado en el uso de PRP en osteotomías tibiales, y que si bien sí que hay diferencias histológicas no se encuentran diferencias entre usarlo o no (309). Los demás estudios que se analizan son series de casos. Hace especial incapié en que en cada estudio se manejan distintas concentraciones plaquetares. Sobre los trabajos del grupo de Kitoh se comenta que no son randomizados, que el emparejado de los controles es de dudosa eficacia y que las conclusiones son poco sólidas y extrapolables. Se concluye la Revisión Sistemática negando la existencia de evidencia que soporte el uso del PRP como estimulador de la osteogénesis

Durante el año 2010 se han publicado cuatro Revisones Sistemáticas sobre el PRP.

Se ha publicado en *Journal of Periodontal Research* una Revisión Sistemática sobre el uso del PRP en los defectos óseos periodontales (329). De los iniciales 6124 artículos, los autores encontraron 10 ensayos clínicos aleatorizados sobre el tema. En las conclusiones los autores destacan la heterogeneidad de los resultados de los estudios revisados (Figura 1), recalcando la necesidad de llevar a cabo nuevos estudios.

En 2010 se ha publicado en *British Medical Bulletin* una Revisión Sistemática sobre el uso de factores de crecimiento autólogos en las tendinopatías crónicas (330). Dentro de los factores de crecimiento autólogos los autores incluyen el PRP, y sobre éste afirman que existe una evidencia limitada sobre su uso en tendinopatías crónicas.

En 2010 se ha publicado en *Implant Dentistry* una Revisión sistemática sobre el uso del PRP en el aumento óseo del seno maxilar (331). Pese a los potenciales beneficios del PRP los autores de esta Revisión Sistemática no encuentran evidencia del beneficio de la adición del PRP a los injertos hasta ahora empleados.

En 2010 se ha publicado una Revisión Sistemática en Growth Factors sobre el uso del PRP en la curación de las úlceras diabéticas (332). Para dicha revisión se incluyeron finalmente 7 ensayos clínicos aleatorizados, cinco de los cuales estaban realizados únicamente en úlceras diabéticas. Los resultados del meta-análisis mostraron resultados favorables con el PRP en la curación de úlceras. Los autores concluyen que existe una evidencia a favor del uso del PRP en las úlceras diabéticas.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La elongación de un segmento óseo mediante la osteogénesis a distracción permite restituir la longitud adecuada de una extremidad o reparar un defecto óseo segmentario. Es un procedimiento que se ha difundido en la comunidad de la Cirugía Ortopédica y que se puede realizar, en la actualidad con diversos fijadores externos y clavos endomedulares. Puede presentar complicaciones y morbilidad, que en ocasiones obligan a una corrección del problema mediante nuevas cirugías.

Las complicaciones de este procedimiento pueden estar relacionadas con el dispositivo de distracción, como son el aflojamiento de los clavos del fijador-distractor, la infección en el punto de entrada cutánea o las desviaciones secundarias, lo cual obliga al estrecho seguimiento por parte del cirujano. Sin embargo, las complicaciones más graves están en relación con la osteogénesis a distracción, como retardos de consolidación, ausencia de consolidación de la osteotomía, o fracturas del regenerado.

Las variables que permiten estimular o mejorar la osteogénesis a distracción han sido motivo de numerosos estudios. En las pasadas décadas se analizaron la influencia del nivel de la osteotomía (diafisario o metafisario), de realizar osteotomía percutánea o a cielo abierto con sierra oscilante, así como de iniciar la distracción inmediatamente o diferirla unos días. También se analizó el empleo de los sistemas de fijación-distracción en diversos regímenes biomecánicos (neutralización, dinamización y biocompresión). Estos estudios aportaron notables avances en el conocimiento de la osteogénesis a distracción y los factores que pueden influirlo. Pese al conocimiento más profundo de la técnica y las circunstancias que la mejoran persiste una elevada tasa de incidencias y complicaciones relacionadas con estos procedimientos.

Al margen de la elongación de extremidades, la osteogénesis a distracción también se ha mostrado como una técnica útil para la reparación de defectos óseos segmentarios en diversas localizaciones mediante los transportes óseos.

Desde los trabajos de Urist en la década de 1960 (151), se han realizado numerosos estudios que persiguen ahondar en el conocimiento de la biología y la regeneración ósea. Y se han descrito diversos productos para su utilización como sustitutos, expansores e intensificadores de injertos óseos.

La administración de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) (257), por su contenido en moléculas y factores implicados en los procesos fisiológicos de reparación tisular, podría estimular la regeneración de diversos tejidos, entre ellos podría estimular la regeneración ósea, incluida la osteogénesis a distracción.

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo general verificar mediante estudios radiológicos e histológicos si la administración de PRP promueve la formación de hueso en un modelo ovino de osteogénesis a distracción. Para ello hemos diseñado un modelo preclínico de alargamiento óseo del fémur en cordero mediante el empleo de un distractor externo.

Los objetivos específicos del estudio son los siguientes:

1. Verificar si la administración de PRP autólogo estimula la formación de hueso durante el proceso de osteogénesis a distracción.
2. Verificar si la administración del PRP autólogo estimula la formación de hueso al final del proceso de osteogénesis a distracción.
3. Verificar si la administración del PRP autólogo estimula la maduración del callo de osteogénesis a distracción.
4. Verificar si la administración del PRP autólogo no aumenta las complicaciones relacionadas con el procedimiento de elongación ósea.
5. Estudiar si la administración del PRP autólogo modifica el proceso biológico de la osteogénesis a distracción.

Basándonos en los resultados publicados previamente por diferentes autores sobre los efectos del PRP en la estimulación del callo de elongación emitimos la siguiente hipótesis para su comprobación:

“En un modelo ovino preclínico de osteogénesis a distracción la aplicación aislada y reiterada de PRP en el foco de elongación estimula la regeneración ósea”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para verificar la hipótesis hemos realizado un estudio experimental en un modelo ovino de osteogénesis a distracción femoral. Este modelo es bien conocido, ya que fue el empleado en los diversos trabajos realizados en la Universidad de Navarra por el grupo del Profesor Cañadell. En este estudio se evalúa el efecto del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) autólogo administrado en tres ocasiones durante el proceso de elongación del fémur de cordero. La evaluación de dicho efecto se ha llevado a cabo mediante estudios de radiología simple, de Tomografía Computerizada, de histología e histomorfometría.

El protocolo experimental de este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal del Institut de Recerca del Hospital Universitario Vall d'Hebron mediante el Acta Ordinaria del 13 de diciembre de 2006.

En todas las fases del proyecto experimental, los animales incluidos fueron atendidos, cuidados y tratados según las regulaciones vigentes del Real Decreto 223 (1988) de la Ley Española para la protección de animales de experimentación, del Decret 214 (1997) de la legislación catalana por el cual se regula la utilización de animales para experimentación y para otras finalidades científicas, del Real Decreto 1201 (2005) de la Ley Española sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Se cumplió la Directiva Europea 86/609/ CEE (1986) relativa a la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y también acorde a los estándares marcados por el National Institutes of Health (Guide for Care and Use of Laboratory Animals, publication No. 80-23, revised 1985).

1. MATERIAL

1.1. Animal de Experimentación

El animal escogido para la realización de este trabajo ha sido el cordero (*Ovis Aries*), de raza catalana “ripollesa” (Figura 67).



Figura 67. Corderos de raza ripollesa en el Estabulario del Institut de Recerca.

Se ha elegido este animal frente a otros por una serie de ventajas que aquí se exponen:

- Similitud con el fémur humano. Aunque de menor tamaño existe una similitud del fémur de cordero con el de humano en cuanto a morfología de corticales y de metáfisis, no tanto para las epífisis y cartílago articular (333). Las relaciones del fémur con los distintos grupos musculares también son similares a las del humano.
- Tamaño. El tamaño del fémur de cordero permite la utilización de un dispositivo de fijación-distracción externa idéntico al empleado en humanos, ya que el grosor de las corticales y la distancia del periostio a la piel permite el uso de clavos empleados en la práctica clínica habitual.
- Docilidad. Los corderos son animales estabulables y fáciles de manejar. Su docilidad permite el acceso al fijador para realizar la elongación, así como su limpieza y cuidados.
- Homogeneidad. Los animales poseen características morfológicas, biológicas y de comportamiento similares.
- Experiencia. El estudio de la elongación ósea diafisaria en corderos se ha realizado en diversos centros. Destacamos los numerosos estudios llevados a cabo en el

Departamento de Cirugía Ortopédica de la Universidad de Navarra. La colaboración con dicho departamento ha sido esencial para la solución y prevención de los diversos problemas técnicos y logísticos que se han presentado durante la realización de este trabajo. En el Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron se han realizado diversos trabajos experimentales con corderos y ovejas, por lo que sus infraestructuras están perfectamente preparadas para albergarlos en el Estabulario. Así mismo, la experiencia de todo el personal del Estabulario del Institut de Recerca ha facilitado la realización del estudio experimental.

Hemos empleado 23 corderos, 22 machos y una hembra, de raza ripollesa. La edad al comienzo del estudio estaba entre 3 y 4 meses, por lo que todos presentaban fisis abiertas. El peso registrado durante la primera cirugía estaba entre 24 y 32 kg.

1.2. Sistema de fijación-distracción

Se ha empleado en todos los casos el sistema Monotube® Triax™ de Stryker® Trauma. El sistema consiste en un fijador externo monolateral, cilíndrico, telescópico y elongable, con la posibilidad de realizar biocompresión axial.

Se empleaba el monotubo intermedio, color azul, de 20 mm de diámetro. Este monotubo tiene una longitud de 250 mm cuando está cerrado, pudiendo llegar hasta 350 mm con la elongación. Presenta dos segmentos a lo largo del cilindro, el segmento de Compresión-Distracción cuya función fundamental es la Elongación ósea, y el Segmento de Biocompresión cuya función es la estimulación del callo óseo de elongación o de fractura (Figura 68).

En los dos polos del cilindro existen dos tuercas exagonales. La tuerca del polo correspondiente al segmento de Compresión-Distracción es la que permite realizar la Compresión o Distracción dependiendo del sentido de giro. En sentido antihorario se realiza distracción, a 1mm por cada 360°, y en sentido horario se realiza compresión a 1mm por cada 360°. Junto a la tuerca de Compresión-Distracción existen unas referencias visuales que permiten calcular la cantidad de giro proporcionado en forma de cuartos de vuelta, marcados por puntos en el collar metálico.

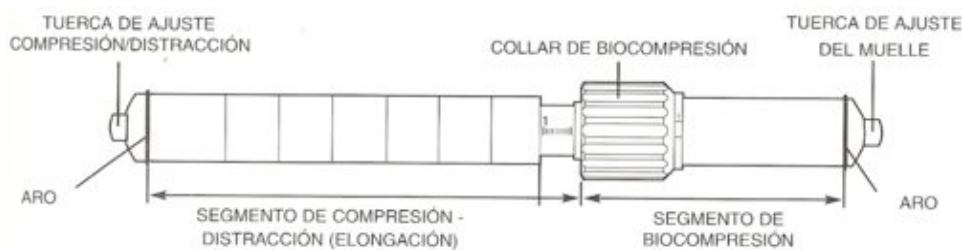


Figura 68. Sistema de fijación-distracción.

La cantidad de distracción total en milímetros puede verse en la unión entre el segmento de compresión-distracción y el segmento de biocompresión. A medida que progresa la distracción el cilindro interno telescópico va apareciendo y dejando al descubierto una escala en milímetros que equivale a la distracción total realizada.



Figura 69. Piezas de anclaje del tubo a la diáfisis.

El tubo se ancla al hueso mediante un sistema de unión que incluye unos clavos roscados (clavo APEX®) de Titanio de 13cm de longitud y 5mm de diámetro (Figura 69). Estos clavos son autoroscantes, y se introducen con ayuda de un berbiquí del sistema Monotube® Triax™ de Stryker®. Los clavos se anclan al hueso de modo bicortical, y al monotubo mediante la GARRA TRIAX™ ESTÁNDAR. En la garra unos cierres roscados permiten la unión rígida del complejo tubo-garra-clavo (Figura 69).

1.3. Infraestructuras del procedimiento quirúrgico

1.3.1. Estabulación

Los corderos eran transportados a la zona de estabulación de animales grandes del Estabulario del Institut de Recerca del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Figura 70). Por razones de espacio y atendiendo a la legislación vigente, no coincidían en el mismo recinto más de seis corderos. Los cuidados de alimento e higiene eran llevados a cabo por personal cualificado del Estabulario.

En el Estabulario del Institut de Recerca permanecían los corderos tras el procedimiento quirúrgico, durante toda la elongación, hasta el sacrificio. La elongación diaria se realizaba en el Estabulario.

1.3.2. Antequirófano

En la sala de antequirófano se procedía a la colocación de vías venosas periféricas, esquilado, lavado y desinfección inicial de la piel (Figura 71). En esta sala se llevaba a cabo la extracción de sangre necesaria para la extracción del PRP. La limpieza de las heridas quirúrgicas durante todo el procedimiento se llevaban a cabo en esta sala o en el quirófano.



Figura 70. Estabulario del Institut de Recerca.



Figura 71. Sala de antequirófano.

1.3.3. Quirófano

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron en el Quirófano 02 para animales grandes del Estabulario del Institut de Recerca del Hospital Universitario Vall d'Hebron. El quirófano constaba de protección radiológica plomada. Se sustituyó la mesa de quirófano por una mesa radiotransparente, para facilitar el control con el intensificador de imágenes que se empleó para el control fluoroscópico intraquirúrgico durante la colocación del fijador y para realizar el estudio de radiología simple (Figura 72).

Se disponía de todo el material necesario para llevar a cabo una anestesia general con intubación oro-traqueal. Se disponía del material suficiente para llevar a cabo todo el procedimiento quirúrgico. En dicho quirófano se llevaron a cabo las extracciones de las piezas al concluir todo el procedimiento experimental.



Figura 72. Quirófano 02 para animales grandes del estabulario del Institut de Recerca con mesa adaptada y arco de escopia.

2. MÉTODO

2.1. Preoperatorio

Los corderos eran trasladados desde la granja al Estabulario del Institut de Recerca en grupos de 6, en un vehículo autorizado para el transporte de animales de experimentación. El traslado se realizaba una semana antes de la cirugía para la aclimatación de los animales a la corralina del Estabulario.

Media hora antes de la cirugía se le inyectaba en la pata trasera izquierda, la contraria a la que iba a ser intervenida, buprenorfina (0,02 mg/kg) y midazolam (0,5 mg/kg) mezcladas en la misma jeringa por vía intramuscular en el box de la corralina, para realizar una sedación preanestésica. Una vez que el cordero se encontraba sedado era atado por tres patas, dejando libre la pata delantera izquierda y era conducido a la sala de antequirófano, donde se le esquilaba la cara interna de la pata delantera izquierda. Tras realizar maniobra de compresión axilar se cogía una vía venosa periférica en la pata delantera izquierda con Abocath de N°14 en la vena cefálica.

En los corderos del Grupo B se realizaba la extracción de 40 cc de sangre por vía periférica de la pata delantera izquierda. De estos 40 cc se extraía el PRP como se explica en el apartado 2.4. de este capítulo. En los corderos del Grupo A no se realizaba extracción de sangre periférica. Sólo después de la extracción de sangre en el Grupo B, y tras haber cogido la vía endovenosa en el Grupo A, se le infundían en bolus 10 cc de Propofol 1%. Se realizaba entonces el esquilado de toda la pata trasera derecha (Figura 73), tras lo que se limpiaba con agua y jabón toda la piel de la pata y posteriormente con Alcohol de 96° para desinfección de la misma. Se trasladaba entonces a la mesa de quirófano.



Figura 73. Esquilado y preparación.

2.2. Anestesia

En la mesa de quirófano se iniciaba el procedimiento anestésico con sedación endovenosa con 5 mg/kg de Propofol 1%. Se realizaba intubación orotraqueal con tubo de Nº 14 y se conectaba a respirador mecánico con gases anestésicos. Tras la intubación se monitorizaba la saturación de oxígeno con Pulsioximetría en la lengua del cordero. Se monitorizaba la actividad eléctrica cardíaca con electrodos precordiales. Se realizaba anestesia con gases tipo isoflurano. Durante la cirugía la analgesia se realizaba con Fentanest iv.

No se realizaba relajación de los corderos por la corta duración del procedimiento y la mala tolerancia postquirúrgica a los relajantes musculares. Toda la medicación para la sedo-analgésia, así como para la reposición de líquidos se realizaba a través de una vía periférica en la pata delantera izquierda. En las ocasiones en que se perdía la vía de la extremidad anterior izquierda se accedía a una de las venas de la oreja. Todas las sedaciones anestésicas se realizaron por el mismo equipo de Veterinaria del Estabulario del Institut de Recerca. Una vez el cordero estaba correctamente sedado, analgesiado y monitorizado, se fijaban a la mesa quirúrgica las dos patas delanteras y la trasera izquierda, dejando libre la pata trasera derecha para ser intervenida (Figura 74).



Figura 74. Cordero anestesiado y monitorizado.

2.3. Técnica quirúrgica

La cirugía se realizaba en el quirófano 02 de animales grandes del Estabulario del Institut de Recerca. Se tomaban todas las medidas de asepsia y cuidados que se toman habitualmente en cirugía. Todo el material quirúrgico empleado en el procedimiento era esterilizado siguiendo el protocolo habitual en la máquina de esterilización del Estabulario.

Se realizaba una profilaxis antibiótica con la administración de Ceftriaxona 650 mg en bolus endovenoso. La pauta antibiótica continuaba en la primera semana postoperatoria mediante la administración de amoxicilina de larga duración (48h) 150 mg/kg en una inyección intramuscular en días alternos.

El equipo quirúrgico constaba de tres personas. Una veterinaria realizaba la anestesia y monitorización. Un cirujano principal y un cirujano ayudante realizaban la intervención quirúrgica. La sujeción de la extremidad durante la cirugía y la instrumentación era realizada por el cirujano ayudante. El manejo del arco de intensificación de imágenes era llevado a cabo por el cirujano principal mediante un pedal de control remoto.

Una vez el animal estaba anestesiado y correctamente colocado en la mesa operatoria se realizaba un control con fluoroscopia del arco de intensificación de imágenes. Se comprobaba la correcta colocación del arco y del pedal de activación respecto a la mesa de operaciones y del acceso a la pata del cordero desde el puesto del cirujano principal.

El lavado prequirúrgico y la vestimenta de los cirujanos se cumplía bajo estricta esterilidad. Se pintaba con solución yodada Topionic® toda la pata trasera derecha. Se cubría la pezuña con un guante estéril atado con una gasa. Se montaba el campo quirúrgico mediante la técnica habitual con tallas de tela estériles.

La intervención quirúrgica constaba de dos fases, en la primera se colocaba el fijador externo y en la segunda se procedía a la realización de una osteotomía femoral.

En primer lugar se colocaba el clavo proximal, que debía estar colocado en la diáfisis femoral a nivel de la región inmediatamente distal al trocánter menor. Para ello se realizaba una incisión de 5 mm con el bisturí de N°24, se introducía una pinza tipo mosquito atravesando la fascia y el vasto externo muscular hasta llegar a tocar hueso. Tras lo cual se comprobaba la posición por fluoroscopia (Figura 75). De ser correcta la posición de la punta de la pinza, se deslizaba ésta sobre la cortical anterior y bajo la posterior, para

tener constancia del grosor antero-posterior de la diáfisis y poder introducir el clavo en la línea media diafisaria. Esta maniobra era necesaria puesto que el control con el arco de intensificación de imágenes se realizaba en una única proyección antero-posterior.

Decidido el punto de inserción se realizaba una pequeña marca en la cortical ósea con un punzón y se realizaba un nuevo control fluoroscópico para comprobar la correcta ubicación en el fémur. Esta maniobra sólo se realizó en las primeras seis cirugías como parte de la curva de aprendizaje del procedimiento.

Se introducía el clavo autorroscante y autotarodante mediante el berbiquí del fijador Hofmann II y Triax de Howmedica®. Con el control mediante el intensificador se comprobaba la dirección perpendicular al eje anatómico del fémur y el correcto paso por las dos corticales femorales. Se procuraba que el clavo fuese introducido paralelo al plano del suelo con la rótula al cenit.



Figura 75. Introducción del clavo proximal bajo control fluoroscópico.

El siguiente clavo en ser introducido era el más distal. Se repetía la maniobra de introducción pero esta vez el punto de entrada debía estar situado a 1cm de la línea epicondílea del fémur distal, tratando de este modo dejar el clavo extraarticular respecto a la rodilla. La entrada y dirección de este clavo debía ser paralelo al plano del suelo con la rótula al cenit, perpendicular al eje anatómico de la diáfisis femoral y paralelo al clavo proximal (Figura 76). Se procuraba tener especial cuidado con control mediante el intensificador de imágenes en la salida de la segunda cortical, dada su íntima relación con la arteria femoral superficial.



Figura 76. Colocación del clavo distal paralelo al proximal.

El siguiente paso era el montaje del fijador sobre el clavo proximal y distal. Se montaba el tubo distractor en las dos mordazas, de manera que el tubo quedara posterior a los clavos y a la unión entre clavos y mordaza. Este montaje se realizaba para poder tener un acceso a todas las partes móviles del fijador y a todos los tornillos una vez que el cordero empezase a caminar sin tener que tumbarlo. El montaje garantizaba el acceso al tubo distractor para poder realizar las elongaciones. Las mordazas de sujeción tenían 4 posiciones posibles para los clavos. En el proximal se empleaba la segunda más proximal y en el distal la segunda posición más distal, dejándose libres las posiciones más proximales y distales respectivamente (Figura 77). Se empleaba esta disposición para poder colocar los siguientes clavos en el espacio inmediatamente más distal en la mordaza proximal y en el espacio inmediatamente más proximal en la mordaza más distal. De este modo se colocaban los dos clavos periféricos en primer lugar y posteriormente los centrales.

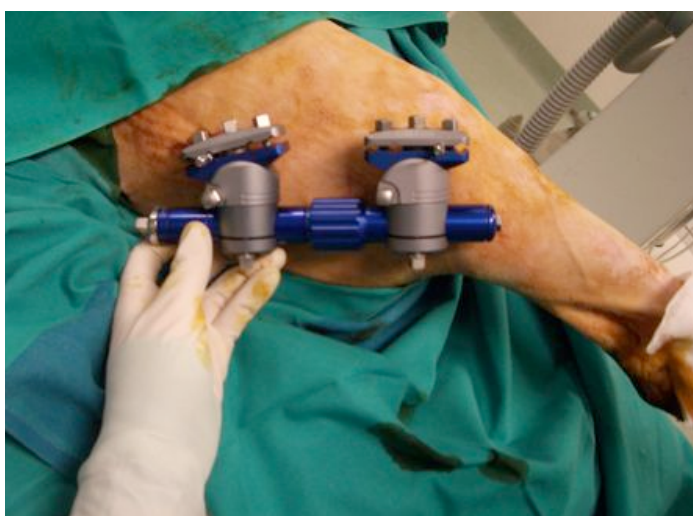


Figura 77. Colocación del fijador sobre el clavo proximal y distal.

El espacio que quedaba entre los clavos más centrales debía ser suficiente como para poder realizar la osteotomía con un margen de seguridad suficiente, sin que llegase la línea de fractura hasta la entrada o salida del clavo en la cortical. Un aspecto esencial era la colocación correcta del tubo distractor. Éste era colocado siempre en la misma posición, el polo más proximal correspondía al acceso de la llave de elongación. El más distal correspondía al sistema dinamizador. Puesto que se realizaban todas las elongaciones en régimen de neutralización no se precisaba el acceso al sistema dinamizador.

Una vez colocado el fijador, pero sin estar los tornillos bloqueados, se empleaban las mordazas como sistemas guía para la colocación de los clavos centrales. Se colocaba el segundo clavo distal, mediante la técnica percutánea ya descrita con control con el intensificador de imágenes. Empleando la mordaza como sistema guía se introducía el clavo paralelo al más distal, siguiendo el principio de paralelismo respecto al suelo y perpendicularidad al eje anatómico del fémur. Pese a ser paralelos entre sí los clavos debían seguir la curvatura fisiológica del fémur (Figura 78).



Figura 78. Colocación del segundo clavo distal empleando la mordaza como guía.

El cuarto y último clavo se introducía siguiendo el mismo sistema de guía con la mordaza. Tras haber colocado todos los elementos del fijador, comprobar con el intensificador de imágenes la correcta colocación de los clavos y su paralelismo entre sí, se comprobaba que el tubo distractor se encontrara paralelo al eje anatómico del fémur.

Se procedía entonces al cierre de todos los tornillos del sistema de fijación. Se llevaba a cabo un cierre inicial con la llave del fijador y un cierre final con llave dinamométrica para asegurar la correcta estabilidad del sistema (Figura 79).



Figura 79. Llave dinamométrica.

La segunda fase de la cirugía era la realización de una osteotomía diafisaria femoral. Se realizaba en el punto diafisario medio entre los clavos centrales adyacentes. En ambos grupos se realizaba una osteotomía diafisaria percutánea. En un punto entre los dos clavos centrales y a unos 2 cm por encima de la línea de inserción de los clavos se llevaba a cabo una incisión de 1 cm. Este era el punto más adecuado para realizar la osteotomía sin que el escoplo chocase con el fijador.

Se introducía una pinza mosquito hasta tocar la diáfisis femoral. Se deslizaba la pinza mosquito por la cortical supero-medial e infero-lateral, ya que el ángulo de incidencia de la pinza era de 45° respecto al plano coronal de la diáfisis. Se comprobaba por control con el intensificador de imágenes la correcta situación de la pinza mosquito en la diáfisis. Se introducía el escoplo de modo percutáneo y se llevaba a cabo la misma maniobra realizada con la pinza mosquito.

Elegido el punto de osteotomía con el intensificador de imágenes se iniciaba con martillo el marcado circunferencial a la cortical de la osteotomía deseada. Se iniciaba la osteotomía por la cortical externa, superior y después inferior (Figura 80 y 81).



Figura 80. Realización de la osteotomía percutánea femoral con escoplo.

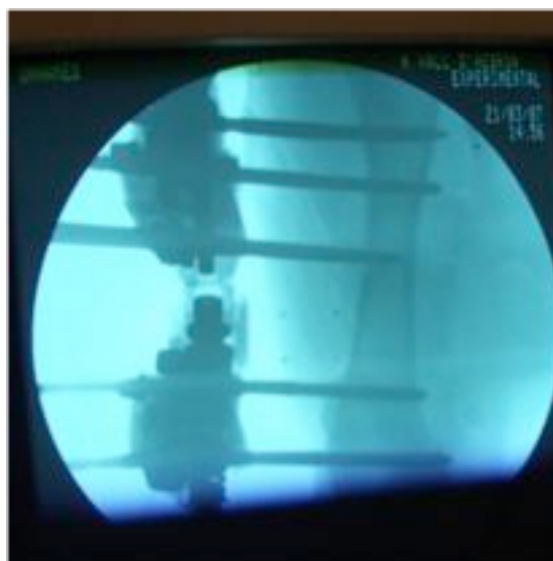


Figura 81. Control mediante intensificador de imágenes de la correcta realización de la osteotomía percutánea.

La cortical interna era la de más difícil acceso y se realizaba su osteotomía prolongando la de la cortical inferior y anterior. La dificultad de esta parte de la técnica percutánea obligó a la realización de proyecciones oblicuas con el aparato de intensificación de imágenes. Tras completar la osteotomía se introducía el escoplo en la superficie ósea buscando posibles puentes óseos no eliminados. Se llevaba a cabo una comprobación de que la osteotomía era completa iniciando una distracción de 2-3 mm (Figura 82), de notarse resistencia o no progresión de la diástasis se completaba la osteotomía del remanente óseo que normalmente pertenecía a la cortical inferomedial.



Figura 82. Maniobra intraquirúrgica de apertura de la osteotomía.

La piel se cerraba con grapas o seda de 2/0. Realizada la osteotomía y cerrada la piel se procedía a la colocación de los apósitos y solución de aluminio (Grupo A), o se realizaba la infusión en el foco de osteotomía de 3 cc de PRP autólogo (Grupo B) para después colocar los apósitos y solución de aluminio (Figura 83). La solución de aluminio es empleada en cirugía veterinaria para evitar la contaminación de las heridas y permitir su mejor cicatrización.



Figura 83. Cobertura de la herida con solución de aluminio.

Se realizaban dos radiografías de control en todos los casos con el cordero todavía anestesiado. Las radiografías eran en proyección antero-posterior con el mismo arco de intensificación de imágenes, modificando el protocolo de radio-voltaje para la realización de radiología simple. Mientras el cordero era reanimado se revelaban las radiografías, se marcaban con el número del cordero, y el número de radiografía para ese cordero.

2.4. Postoperatorio inmediato

Tras concluir el procedimiento quirúrgico se cerraba el flujo de gases anestésicos hasta que el cordero presentaba respiración espontánea. Iniciada la respiración espontánea se podía extubar al cordero con seguridad (Figura 84).



Figura 84. Cordero intervenido en fase de reanimación.

Una vez es extubado se le retiraba la vía endovenosa periférica y monitorización. Se le colocaba en la pata delantera izquierda, donde se le había esquilado, un parche de transdérmico de liberación lenta de 50 mcg de fentanilo (Durogesic®, Janssen-Cilag) como analgesia postoperatoria. Era trasladado al estabulario, dejándose en una zona apartada del resto de animales o en otra corralina. Se le dejaba en decúbito prono, con las patas flexionadas para favorecer que el cordero pueda levantarse lo antes posible (Figura 85).

Se monitorizaba la frecuencia respiratoria como parámetro directamente relacionado con el dolor. Si se encontraba al cordero taquipnéico se le administraba una dosis accesoria de Nolotil® intramuscular en la pata trasera izquierda.



Figura 85. Postoperatorio inmediato.

Se registraba el inicio de la deambulaci3n con o sin apoyo de la extremidad intervenida (Figura 86). Se mantenía al cordero aislado hasta que podía iniciar deambulaci3n y entonces era devuelto a la corralina con los demás corderos.



Figura 86. Inicio de la deambulaci3n con apoyo a la hora de la cirugía (cordero mostrado en la Figura 85).

2.5. Plasma Rico en Plaquetas

2.5.1. Preparaci3n

Se extraían 40cc de sangre del cordero desde la vía venosa periférica colocada en la pata delantera izquierda, mientras estaba siendo preparado en el antequirófono, y antes de infundir ningún fármaco por vía endovenosa.

La sangre, extraída con dos jeringas de 20cc era distribuida en diez tubos de ensayo de plástico de 4,5 ml tipo Vacutainer™ (Becton&Dickinson). Estos tubos son utilizados en la práctica clínica habitual para la realización de pruebas de hemostasia, contienen citrato 3,8% como anticoagulante. Se llenaban 8 de los tubos hasta la marca que llevan de 4,5 ml, para que contengan el volumen sanguíneo proporcional a la cantidad de citrato que llevan. El volumen restante se introducía en los otros dos tubos citratados. Los ocho primeros tubos se empleaban en la extracción del PRP. Los dos últimos tubos se empleaban en la validación de la concentración de plaquetas administrada. Los diez tubos eran tratados del mismo modo en todo momento (Figura 87).

La obtención del PRP se realizaba siguiendo el método descrito por Anitúa y Sánchez (255,259). Se empleaba una centrifugadora tipo Heraeus Sephatec Megafuge 2.0R situada en el antequirófano (Figura 88).

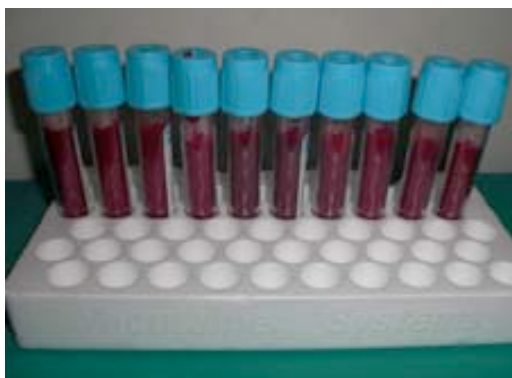


Figura 87. Sangre extraída en tubos citratados a 3,8%.



Figura 88. Centrifugadora empleada en el procedimiento.

Allí se colocaban los diez tubos de sangre extraídos, en una distribución equilibrada. Se realizaba una centrifugación durante 8 minutos a 450G (1800rpm) y a temperatura ambiente. Concluida la centrifugación se extraían los tubos de la centrifugadora (Figura 89) y se trasladaban a una mesa donde se realizaba la extracción de la fracción más rica en plaquetas según Anitua y Sánchez (Figura 90) (255,259).

El volumen del plasma obtenido es dependiente del hematocrito del sujeto estudiado, por lo que el volumen era variable entre los distintos corderos. Se tomaba únicamente los 0,5 cc superiores a la fase roja. Aproximadamente correspondía al tercio de plasma más cercano a la fase roja. Para ello se extraían con pipeta estéril de 500 μ L (0,5 cc) los dos tercios superiores de la fase del plasma.



Figura 89. Sangre procesada tras el centrifugado.



Figura 90. Mesa y material de extracción del PRP.

Tras haber extraído los dos tercios superiores de plasma quedaba una fase de plasma que aproximadamente debía ser de unos 0,5cc. Se extraía con una pipeta de 100 μ L (0,1cc) en cuatro o cinco veces el volumen de plasma inmediatamente adyacente a la fase roja. Se empleaba esta pipeta de menor volumen para minimizar el flujo turbulento ejercido por la presión negativa de la pipeta, evitando así la contaminación por glóbulos rojos y leucocitos.

Se realizaba esta maniobra en los diez tubos. Se recogía el volumen total del plasma adyacente a la fase roja en un recipiente estéril. Se medía el volumen. Se extraían 3 cc de este plasma, que denominamos PRP. A los 3cc de PRP le añadimos 150 μ L de Cloruro Cálculo al 10% (50 μ L de Cloruro Cálculo por cada 1 cc de PRP) para neutralizar el citrato y activar la secreción de gránulos α de las plaquetas y la cascada de la coagulación.

El volumen de 3 cc de PRP activado se depositaba en una jeringa de 10 cc con Abocath de N°14. Todo este procedimiento se realizaba en esterilidad del material y del personal. Todas las extracciones fueron realizadas por el mismo cirujano, que previamente había sido entrenado en el procedimiento. Se transportaba, en esterilidad, a la mesa de quirófano, donde iba a ser administrada.

El volumen restante de PRP, sin ser activado con Cloruro Cálculo, se depositaba en un tubo similar al citratado, pero sin citrato. Este tubo se empleaba en la validación del método.

2.5.2. Administración

Concluida la osteotomía, en el Grupo B, se realizaba la infusión del PRP en los corderos. Se llevaba a cabo con la herida de la osteotomía suturada. El punto de inyección era 1 cm anterior a la herida (Figura 91).

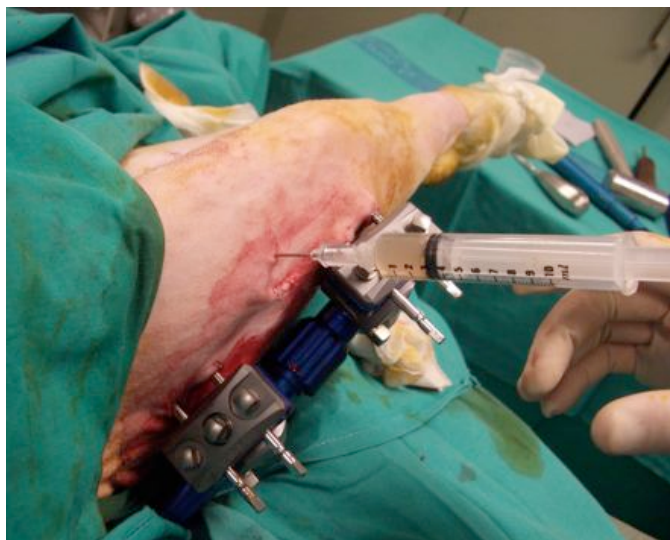


Figura 91. Inyección de PRP.



Figura 92. Control fluoroscópico de la infiltración del PRP.

La inyección se realizaba en el centro de la osteotomía, con control con el arco intensificación de imágenes (Figura 92). Una vez se comprobaba la posición del Abocath en la osteotomía se procedía a la infusión lenta de los 3 cc de PRP activado.

2.5.3. Validación

Se tomaba muestra del tercio inferior de la fracción plasmática de los dos tubos destinados a la validación. Esa muestra se empleaba en la cuantificación de plaquetas del concentrado. Dichas muestras no eran activadas con cloruro cálcico, siendo enviadas en medio citratado. La cuantificación se realizaba en laboratorio. Se realizó una única vez por cada cordero del grupo B (PRP). Los resultados se muestran en el apartado 2 del capítulo de Resultados.

2.6. Estudio radiológico simple

Tanto el día de la cirugía, como en por lo menos dos controles durante el seguimiento se hacían radiografías simples en proyección antero-posterior. No empleaba la proyección axial ni la lateral ya que se utilizaba un arco de intensificador de imágenes en posición estática a 90° respecto al plano del suelo y sentido supero-inferior. Se modificaba el protocolo de amperaje y voltaje para poder hacer radiografías simples. Se emplearon dos chasis de radiografía simple de 24x30 cm (Figura 93).



Figura 93. Chasis de radiología simple.

Los chasis eran procesados en una habitación oscura de revelado en el Institut de Recerca Vall d'Hebron. Las placas eran extraídas de los chasis e introducidas en la máquina de revelado Fujifilm FPM-100A en protocolo ordinario de revelado (Figura 94).



Figura 94. Máquina de revelado FPM-100^a.

Todas las radiografías se hicieron con los corderos sedados. Las radiografías eran marcadas con el número del espécimen y con el tiempo de evolución. Los resultados se exponen en el apartado 4 del capítulo de Resultados.

2.7. Procedimientos durante la estabulación

Los corderos permanecían, en el Estabulario del Institut de Recerca, seis semanas desde el día de la cirugía hasta el día de la eutanasia. El procedimiento completo constaba de 40 días, tomando como “día 0” el de la cirugía. Durante los 40 días se llevaban a cabo una serie de procedimientos como se resumen a continuación:

■ Día 0: intervención quirúrgica bajo anestesia general.

- Implantación del sistema de fijación-distracción.
- Osteotomía percutánea.
- Control con 2 radiografías simples.
- 1ª administración de PRP (sólo en grupo B).

Fase de Latencia
(10 días)

■ Día 10: inicio de la distracción bajo sedación.

- Inicio de la distracción a 1mm/día.
- Limpieza de heridas y fijador.
- Control con 2 radiografías simples.
- 2ª administración de PRP (sólo en grupo B).

Fase de Distracción
(20 días)

■ Día 20: control de la distracción bajo sedación.

- Limpieza de heridas y fijador.
- Control con 2 radiografías simples.
- 3ª administración de PRP (sólo en grupo B).

■ Día 30: cese de la distracción.

- Último día de elongación (20mm en distractor).

Fase de Consolidación
(10 días)

■ Día 40: eutanasia.

- Eutanasia según protocolo.
- Control con 2 radiografías simples
- Extracción del fémur elongado y del contralateral.
- Etiquetado y procesado de las piezas.

Los procedimientos llevados a cabo los días 10 y 20 se realizaban con sedación sin intubación orotraqueal y siguiendo el protocolo de sedación. Las radiografías simples de los controles posteriores a la cirugía (días 10 y 20) se realizaban con la misma técnica de proyección y revelado, se marcaban con el número del cordero, y el número de orden de la radiografía. La obtención del PRP se llevaba a cabo con la misma técnica descrita previamente, con extracción de sangre de vía venosa periférica, previa a la infusión de fármacos por esa vía. La administración se controlaba por medio del intensificador de imágenes, infundiendo el plasma en la osteotomía recién iniciada la elongación en el “día 10”, y a la mitad de la distracción total el “día 20”.

Aprovechando las sedaciones del “día 10” y “día 20”, se retiraban los apósitos de los clavos, se limpiaban éstos y la herida de la osteotomía con agua con jabón, suero fisiológico y solución yodada después, para finalmente colocar de nuevo apósitos limpios. En el momento de la cura se evidenciaba la existencia o ausencia de infección local en las heridas de los clavos, registrándose y poniéndose tratamiento antibiótico empírico tras su limpieza con Amoxicilina-Clavulánico (500mg).

Los procedimientos del “día 10 y 20” se llevaban a cabo en el mismo quirófano de la cirugía realizada y con el mismo equipo de veterinarias y cirujanos. El día de cese de la elongación (“día 30”) no se acompañaba de más procedimientos ni pruebas complementarias. Las radiografías de control del “día 40” y la extracción de ambos fémures se realizaban en quirófano, una vez se confirmaba la parada cardio-respiratoria irreversible tras el procedimiento de eutanasia .

Durante las 6 semanas que duraba todo el procedimiento, los corderos estabulados eran examinados por el equipo quirúrgico y veterinario, de lunes a viernes desde la cirugía hasta el “día 10” y desde el “día 30 al 40”. Durante el procedimiento de elongación, desde el “día 10” hasta el “día 30”, eran examinados y elongados diariamente. En el examen diario realizado por el equipo quirúrgico se comprobaba el estado de los corderos, la necesidad de analgesia, signos de infección, deambulación o no, carga de la extremidad intervenida y complicaciones mecánicas de las dos extremidades.

2.7.1. Eutanasia

El “día 40” del procedimiento se consideraba el último. El cordero recibía una inyección intramuscular de Midazolam (2 cc). Una vez se encontraba sedado, era atado por tres patas, dejando libre la pata delantera izquierda. Era trasladado a la sala de

antequirófano, donde se le esquilaba la cara interna de la pata delantera izquierda. Se tomaba una vía venosa periférica con un Abocath de N°14. Se infundían por esta vía 20cc de Propofol 1%, dos minutos después se le infundía 1g endovenoso de Pentotal sódico. Minutos después se daba una parada respiratoria que no era revertida, y posteriormente la parada cardíaca. Se comprobaba el fallecimiento en el quirófano mediante pulsioximetría, observación de ausencia movimientos respiratorios y cese de actividad eléctrica cardíaca.

Se procedía a la realización del último control radiológico con dos radiografías simples con la misma técnica empleada en las anteriores. Tras las radiografías se extraían ambos fémures y se procesaban las piezas.

2.7.2. Extracción y procesamiento de las piezas

Se colocaba el cadáver en decúbito supino. Se preparaba el material de extracción, gasas y los botes para las piezas extraídas. Con un bisturí del N° 24 se realizaba una incisión longitudinal paralela al fijador externo. Se seccionaba la piel suprarotuliana y el tendón rotuliano. Se seccionaban los ligamentos colaterales femoro-tibiales y posteriormente los ligamentos cruzados. Realizado este gesto se seccionaban los grupos musculares extensores y flexores evitando el acceso subperióstico de la diáfisis y en dirección cefálica. Se seccionaban y extraían los pedículos de piel circundante a los clavos del fijador. El paso final a la extracción era la sección de la musculatura pelvitrocantérica y luxación de la cabeza femoral. La extracción del fémur elongado debía evitar la sección o pérdida de material del callo de elongación, puesto que éste tenía zonas calcificadas y partes blandas que podían estar adheridas a la musculatura. Se extraía con la misma técnica el fémur contralateral, llegando en este caso a hacer una disección subperióstica pegada al hueso.

Se limpiaban las piezas, seccionando pedículos y restos de músculo, excepto en la zona del callo de elongación. Se limpiaba el fijador, todavía montado junto al fémur extraído, con suero fisiológico. Se introducían en un depósito común con formaldehído al 10%. Se etiquetaban los botes y las piezas con el número del cordero sacrificado.

A la semana de la eutanasia y extracción se sacaban las piezas de los botes formolizados, se envolvían en bolsas estancas los dos fémures de cada cordero y se realizaba el estudio con Tomografía Computerizada, como se detalla en el apartado siguiente de este Capítulo. Se aprovechaba este momento para fotografiar las piezas (Figura 95).

Realizado el estudio de Tomografía Computerizada, las piezas eran devueltas al Estabulario. Bajo control con el intensificador de imágenes y en quirófano, se cortaban las piezas elongadas con sierra, un 1cm proximal al borde proximal de la osteotomía y 1 cm distal al borde distal de la osteotomía.

Se marcaba con un punto de seda el borde superior de la cara anterior del callo, y con otro punto de seda y un fragmento de plástico del capuchón de una aguja el borde inferior de la cortical medial. Sabiendo que todas las piezas eran del fémur derecho, y con la referencia supero-anterior e infero-medial se podía ubicar en el espacio la posición de cada parte del callo. Se introducía cada pieza en un bote con formadehído 10% y se volvía a etiquetar con una numeración distinta a la de denominación de los corderos (Figura 96).

Se empaquetaban los botes formolizados y se enviaban por mensajería al departamento de Ortopedia Experimental de la Universidad de Navarra, Pamplona, donde se llevaba a cabo la preparación de la histología.



Figura 95. Fémures extraídos y conservados en formaldehído 10% (previo a estudio con TC).



Figura 96. Pieza cortada y en formaldehído 10% (después del estudio con TC).

2.8. Tomografía Computerizada de las piezas

Se trasladaban las piezas al aparato de Tomografía Computerizada helicoidal Siemens Pro 44 perteneciente al Institut de Diagnòstic per la Imatge (IDI) y situado en el Hospital General de la Ciutat Sanitaria Vall d'Hebron. Las piezas se trasladaban en bolsas estancas precintadas y etiquetadas (Figura 97).



Figura 97. Estudio TC de las piezas.



Figura 98. Visualización de estudio TC.

Todos los estudios con Tomografía Computerizada fueron llevados a cabo por el mismo técnico y radiólogo. Se realizaban en grupos de seis fémures intervenidos y sus fémures contralaterales. Se colocaban en la bandeja del aparato de Tomografía los fémures en posición anatómica como si el cordero estuviese en decúbito supino (Figura 98). Se centraba con la guía láser del aparato la zona a estudio. Se realizaba el barrido siguiendo un protocolo de tomografía musculoesquelética.

Las imágenes eran almacenadas en DVD en formato DICOM para su posterior estudio.

2.9. Técnica histológica

El primer paso para la preparación, conservación y procesamiento de las piezas extraídas era la fijación. La fijación se llevó a cabo con una solución comercial de formaldehído al 10%. A partir de la fase de fijación, que se iniciaba en el Institut de Recerca de Vall d'Hebron, el resto de procedimientos relacionados con el procesamiento histológico se llevó a cabo en el Departamento de Ortopedia Experimental de la Universidad de Navarra, Pamplona.

Tras la fijación se realizaba el corte de las piezas con una sierra oscilante. El corte de la pieza se llevaba a cabo en el plano coronal, para poder tener incluido en un mismo corte el callo medial o interno y el lateral o externo (Figura 99 y 100).

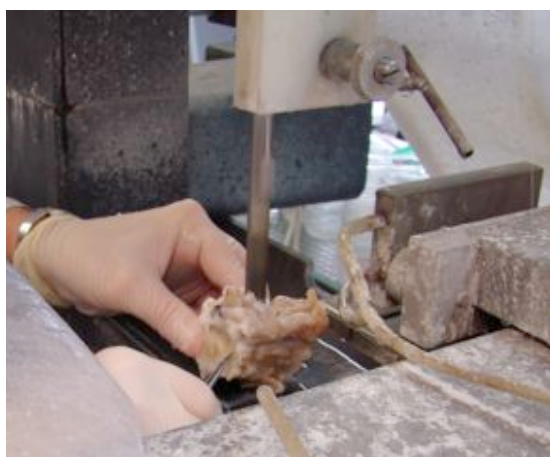


Figura 99. Cortado de las piezas con sierra oscilante.

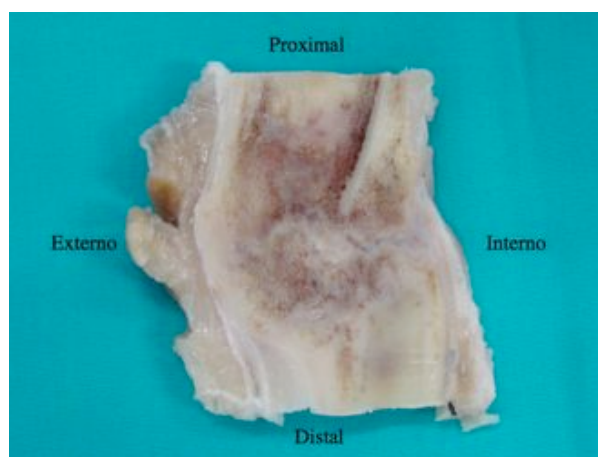


Figura 100. Corte coronal de la pieza.

Tras la fijación se realizó una decalcificación de las piezas, previamente a su preparación para histología. El motivo de realizar la decalcificación era optimizar el manejo de las muestras y la mayor versatilidad de técnicas histológicas factibles en hueso decalcificado. El tipo de decalcificación llevada a cabo fue con ácido clorhídrico y fórmico (agua destilada, ácido fórmico al 85% y clorhídrico al 35%).

Una vez que la decalcificación era satisfactoria, y previo a la inclusión en parafina se procedía a la deshidratación. Para realizar la deshidratación se sumergía la muestra en soluciones de alcoholes de gradación ascendente (70%, 80%, 96%, 100%, 100%). Este proceso de deshidratación arrastraba los restos de agua que quedaban en el tejido. Posteriormente se realizaba un lavado de las muestras con xilol para eliminar el alcohol remanente y facilitar la difusión de la parafina.

En la fase de inclusión se introducía la muestra en parafina líquida a 60°C, que pasaría a estado sólido a temperatura ambiente. Tras colocar la muestra en un molde y un cassette de identificación se enfriaban las muestras, con el fin de solidificarlas incluidas en el cassette.

El bloque de parafina se ajustaba en el microtomo, y se realizaban unos primeros cortes groseros hasta llegar a unos cortes de calidad de 4 μm . Estos cortes de 4 μm se ajustaban en el portaobjetos de vidrio, y se dejaba secar para que se evaporase el agua que quedaba entre el portaobjetos y el corte de parafina. Posteriormente se calentaba el corte para eliminar la parafina, y se lavaba con xilol hasta eliminarla por completo.

Tras eliminar la parafina sólo quedaba rehidratar de nuevo la muestra con soluciones alcohólicas decrecientes hasta llegar a agua destilada. Después de la rehidratación el corte histológico estaba preparada para ser teñido o para iniciar el procedimiento de inmunohistoquímica.

2.9.1. Tinciones histológicas

Se realizaron 3 tinciones de las muestras, Hematoxilina-Eosina, Tricrómico de Masson y Safranina. Para el análisis histológico final no se empleó la tinción de Safranina.

a) Hematoxilina - Eosina

La Hematoxilina-Eosina es una de las tinciones más empleadas en histología. La hematoxilina, que es básica, tiñe las estructuras ácidas de azul purpúreo los núcleos, ribosomas y retículo endoplasmático rugoso. La eosina, que es un colorante ácido, tiñe estructuras básicas de rojo o rosa. La mayoría de las proteínas citoplasmáticas son básicas y por ello el citoplasma generalmente se tiñe de rosa o de rojo rosado. En general, en la tinción de Hematoxilina Eosina los núcleos se tiñen de azul y el citoplasma se tiñe de rosa a rojo.

b) Tricrómico de Masson

Esta técnica se llama de tejido conectivo porque se usa para demostrar elementos del tejido de soporte, principalmente colágeno. Como su nombre indica, la técnica de tinción produce tres colores: núcleos y otras estructuras basófilas se tiñen de azul, el colágeno se tiñe de verde o azul, dependiendo de qué variante de la técnica se utilice, y el citoplasma, el músculo, los eritrocitos y la queratina se tiñen de rojo brillante.

2.9. Análisis histomorfométrico

El análisis histomorfométrico permite cuantificar superficies absolutas y relativas de un tejido y de la interfase entre un implante y un tejido. En este estudio se llevó a cabo un análisis histomorfométrico de las superficies relativas de hueso, cartílago y tejido fibroso.

Tras completarse las preparaciones histológicas se llevaron a cabo digitalizaciones de dichos cortes histológicos. Para ello se condujeron al Centro de Investigaciones Médicas Aplicadas (CIMA) de la Universidad de Navarra, donde los cristales fueron fotografiados en un microscopio tipo Zeiss Axio Imager M1. Las digitalizaciones se almacenaron en formato TIFF para su posterior análisis.

Para el estudio histomorfométrico se empleó el software ImageJ®, desarrollado por el National Institutes of Health de EEUU. Para el cálculo de la superficie relativa de hueso se empleaba los cortes en Hematoxilina-Eosina, para el cálculo de la superficie relativa de cartílago y tejido fibroso la de Tricrómico de Masson. El protocolo básico de análisis de las imágenes digitalizadas incluía una conversión del formato de la imagen a 8 bits. En el caso del tejido óseo se realizaba un ajuste del umbral de coloración para sustraer el contenido intertrabecular. Tras lo cual se realizaba el marcado de los límites de cada forma, en este caso las trabéculas y hueso haversiano. Estos límites encerraban una superficie que era calculada por el software, así como la superficie total del corte analizado, pudiendo expresarse en porcentaje. En la Figura 101 se muestra un ejemplo del protocolo previo al cálculo de superficies ocupadas por tejido óseo y espacio intertrabecular.

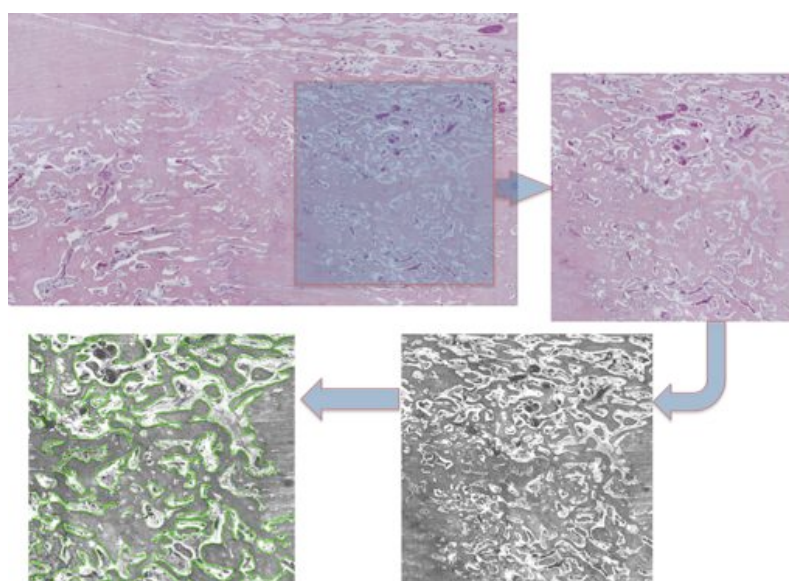


Figura 101. Diagrama que muestra la secuencia previa al cálculo de superficie con ImageJ.

3. GRUPOS DEL ESTUDIO

3.1. Descripción de los grupos

Todos los corderos se sometieron al mismo procedimiento anestésico, de osteotomía percutánea, de elongación (velocidad y duración de elongación), de sacrificio y de pruebas de la pieza anatómica. Los dos grupos, A y B, se diferenciaban en cuanto a si no recibían o recibían tratamiento coadyuvante con PRP autólogo durante el procedimiento de elongación. El grupo A no recibió tratamiento coadyuvante. El grupo B recibió tres dosis de PRP autólogo a lo largo del procedimiento (día “0”, día “10” y día “20”).

En el diseño inicial del estudio se planteó la posibilidad de administrar un coadyuvante “control” en el grupo A, para igualar los dos grupos en la metodología del procedimiento. Sin embargo, la posibilidad de estar diluyendo el coágulo inicial de la osteotomía y la incapacidad de ponderar este efecto hicieron necesario prescindir de terapia coadyuvante a la elongación en el grupo control (grupo A).

3.2. Asignación a los grupos

La asignación al grupo A o B se realizaba durante la jornada de la cirugía. Todo el estudio se realizó en grupos de 6 corderos (por necesidades de la estabulación) excepto el último grupo de 5 corderos. Los procedimientos que requerían anestesia o sedación eran más largos, por lo que limitaban el número de corderos a intervenir a dos por día.

Puesto que la primera intervención era la osteotomía percutánea e implantación del fijador junto con la administración o no de PRP, el primer día del procedimiento se asignaba definitivamente al grupo al que iba a pertenecer el cordero. Por sistema se asignaba al grupo B el primer cordero a intervenir, puesto que la extracción y administración del PRP requería mayor tiempo. El segundo cordero se asignaba al grupo A. Los corderos eran elegidos por la veterinaria del Institut de Recerca.

Cada pieza anatómica procesada fue renombrada con un número del 1 al 23, para simplificar la nomenclatura y manejo de las piezas y pruebas histológicas. La realización de las pruebas radiológicas (radiología simple y TC), las pruebas histológicas simples, inmunohistoquímica y de histomorfometría fueron idénticas para ambos grupos. El

personal colaborador en el estudio ha desconocido en todo momento a qué grupo pertenecía cada espécimen.

3.3. Criterios finales de exclusión

Se decidió excluir los especímenes con una desviación angular mayor de 15° en el plano coronal o con una distracción del foco menor de 5 mm. Ambos criterios de exclusión traducen una situación de consolidación precoz y puente óseo que impide la distracción por lo menos en una de las corticales de la diáfisis. Las dos situaciones pueden ser debidas o a una consolidación más rápida de lo habitual (sobre todo en la cortical interna) o a una técnica deficiente (persistencia de puentes óseos y osteotomía incompleta).

4. EVALUACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Examen clínico

Dentro del examen clínico se incluía el apoyo o no de la extremidad intervenida, la presencia de infección de los clavos o de la herida de osteotomía y la presencia de aflojamiento de dichos clavos o de otra complicación mecánica.

Se llevaba a cabo un control diario de todos los corderos presentes en la corralina del Estabulario, y se registraba en una hoja de recogida de datos el apoyo de la extremidad intervenida, durante las tres fases del procedimiento: latencia (10 días), distracción (20 días) y consolidación (10 días). Dicho registro lo realizaban miembros del equipo quirúrgico.

El control de las heridas de los clavos, así como su posible aflojamientos se registraba los días que se llevaban a cabo radiografías bajo sedación, momento que se aprovechaba para limpiar y desinfectar las heridas de los detritus acumulados.

Puesto que las variables recogidas respecto al examen clínico eran variables categóricas dicotómicas se realizó test tipo Chi-Cuadrado. (Tabla 3).

| Apoyo de la extremidad | Infección | Complicaciones mecánicas |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--|
| Latencia (No: 0, Sí: 1) | Superficial (No: 0, Sí: 1) | Aflojamiento (No: 0, Sí: 1) |
| Distracción (No: 0, Sí: 1) | Profunda (No: 0, Sí: 1) | Complicación mayor (No: 0, Sí: 1) |
| Consolidación (No: 0, Sí: 1) | | |

Tabla 3. Variables categóricas recogidas del Examen Clínico

4.2. Radiología simple

La información de la radiología simple se dividió en las tres fases de la elongación: latencia, distracción y consolidación. Un radiólogo que desconocía la pertenencia a cada grupo realizó el análisis de las radiografías.

4.2.1. Radiología de la fase de latencia

En la radiografía que se realizaba tras la cirugía se comprobaba la correcta realización de la osteotomía, alineación y ausencia de desplazamientos mayores. Así como la correcta colocación de los clavos, paralelos y a una distancia equidistante de la

osteotomía. Se describía la osteotomía como: transversa, oblicua o con tercer fragmento (Figura 102 a 104).



Figura 102. Ejemplo de osteotomía transversa.



Figura 103. Ejemplo de osteotomía oblicua.



Figura 104. Ejemplo de osteotomía con tercer fragmento.

En la radiografías simples realizadas al final de la fase de latencia, en el 10º día, se comprobaba la correcta alineación de los clavos y la ausencia o presencia de deformidad en varo.

4.2.2. Radiología en fase distracción

En las radiografías simples realizadas a la mitad de la fase de distracción, día 20, se comprobaba la correcta alineación de los clavos y ausencia o presencia de deformidad en varo. Se evaluaba la presencia o ausencia tanto de callo perióstico medial como circunferencial y la presencia o ausencia de una línea radiolúcida en la zona de osteotomía. Se evaluaba la presencia de lisis alrededor de los clavos.

4.2.3. Radiología en la fase de consolidación

En las radiografías simples realizadas al final de la fase de consolidación, día 40, se comprobaba la correcta alineación de los clavos y ausencia o presencia de deformidad en varo. Se evaluaba la presencia o ausencia de callo perióstico medial, circunferencial y la presencia o ausencia de una línea radiolúcida en la zona de osteotomía. Se registraba en escala ordinal el paso de trabéculas (0: ausencia, 1: escasas, 2: moderadas; 3: abundantes). Se evaluaba la presencia de lisis alrededor de los clavos.

En la tabla 4 se observan las variables registradas para cada fase, todas son categóricas. Las variables dicotómicas fueron analizadas mediante Chi-Cuadrado, las ordinales mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

| Latencia | Distracción | Consolidación |
|---|---|---|
| Alineación (varo <15°: 0, >15°: 1) Osteotomía (transversa: 1, oblicua: 2, con tercer fragmento: 3) | Alineación (varo <15°: 0, >15°: 1) Callo perióstico medial (No:0, Sí:1) Callo circunferencial (No:0, Sí:1) Línea radiolúcida (No:0, Sí:1) Lisis (No:0, Sí:1) | Alineación (varo <15°: 0, >15°: 1) Callo perióstico medial (No:0, Sí:1) Callo circunferencial (No:0, Sí:1) Línea radiolúcida (No:0, Sí:1) Trabéculas (0: ausencia, 1: escasas, 2: moderadas; 3: abundantes) Lisis (No:0, Sí:1) |

Tabla 4. Variables categóricas del estudio de radiología simple.

4.3. Tomografía Computerizada

Los distintos estudios con Tomografía Computerizada fueron analizados por un médico radiólogo especialista en radiología musculo-esquelética, el Dr. Ignasi Barber del Hospital Universitario Vall d'Hebron. El visionado y la cuantificación de las distintas variables se llevó a cabo con el software Osirix®, desarrollado por University of California, Los Angeles (UCLA). Dicho software permite realizar mediciones tanto de longitudes como de áreas, así como de densidad en Unidades Hounsfield.

El estudio se dividió en tres apartados. En el estudio morfométrico del fémur se analizaron los cambios sufridos en todo el fémur intervenido con respecto al contralateral. En el estudio morfométrico del callo se analizaron las distintas variables morfológicas que definían al callo de elongación. En el estudio densitométrico del callo en Unidades Hounsfield se estudió la densidad global del callo y por tercios interno, medio y externo.

4.3.1. Estudio morfométrico del fémur

Se midió la longitud del fémur control y del intervenido en milímetros, calculándose el incremento real en longitud con el procedimiento de elongación (asumiendo la simetría con el fémur contralateral). Se midieron el diámetro coronal en milímetros de la diáfisis justo por debajo del trocánter menor y a nivel epicondileo en la metáfisis distal del fémur. Se midieron las áreas de sección axial en cm^2 de la diáfisis por debajo del trocánter menor y a nivel epifiso-metafisario epicondileo.

Estas variables eran cuantitativas continuas y se evidenció que cumplían los criterios de normalidad, por lo que se analizaron con test paramétricos para la comparación de medias (Test de la T de Fisher). En la tabla 5 se observan las variables

cuantificadas del estudio morfométrico del fémur. En la figura 105 a 107 se observa un ejemplo de estudio morfométrico del fémur.

| Variables cuantitativas |
|---|
| Longitud Fémur Control (mm) |
| Longitud Fémur Intervenido (mm) |
| Diámetro Superior Fémur Intervenido (mm) |
| Diámetro Epicondíleo Fémur Intervenido (mm) |
| Área de sección de la diáfisis por debajo del trocánter menor (cm ²) |
| Área de sección Epicondíleo (cm ²) |

Tabla 5. Variables cuantitativas del estudio morfométrico del fémur.



Figura 105. Longitudes del fémur intervenido y del contralateral

Figura 106. Diámetros de diáfisis superior y epicondíleo.

Figura 107. Áreas de sección por debajo del trocánter y epicondíleo

4.3.2. Estudio morfométrico del callo de elongación

Se midió el diámetro coronal en milímetros 1 cm por encima y por debajo de la osteotomía, así como el diámetro coronal máximo de la zona central del callo. También se midió el diámetro sagital máximo en milímetros del callo. Se midió el área de sección axial en cm² a 1cm por encima y por debajo de la osteotomía, así como el área del callo en su zona central. Se llevó a cabo un registro cualitativo de la presencia o ausencia de callo óseo interno, así como de callo circunferencial (ausencia: 0, presencia: 1). Se evaluó el paso de trabéculas por el centro del callo con una escala ordinal (0: ausencia, 1: escasas, 2: moderadas, 3: abundantes).

Las primeras 7 variables eran cuantitativas continuas y se evidenció que cumplían los criterios de normalidad, por lo que se analizaron con test paramétricos para la comparación de medias (Test de la T de Fisher). Las variables dicotómicas se estudiaron mediante Chi-Cuadrado y la variable ordinal mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney. En la tabla 6 se encuentran las variables empleadas en el estudio morfométrico del callo de elongación.

| Variables cuantitativas | Variables categóricas |
|---|--|
| Diámetro coronal superior (mm) | Callo óseo interno (0: ausencia, 1: presencia) |
| Diámetro coronal inferior (mm) | Callo circunferencial (0: ausencia, 1: presencia) |
| Diámetro coronal central máximo (mm) | Paso de trabéculas (0: ausencia, 1: escasas, 2: moderadas, 3: abundantes) |
| Diámetro sagital central máximo (mm) | |
| Área axial superior (cm ²) | |
| Área axial central (cm ²) | |
| Área axial inferior (cm ²) | |

Tabla 6. Variables analizadas en el estudio morfométrico del callo.

4.3.2. Estudio de la densidad ósea del callo de elongación

Para el estudio de la densidad ósea del regenerado se llevó a cabo una cuantificación de la densidad en Unidades Hounsfield del callo en sección coronal y axial. El callo en sección coronal fue dividido en tres tercios: interno, medio y externo. El callo en sección axial no se dividió (Tabla 7). Estas variables eran cuantitativas continuas, se evidenció que cumplían los criterios de normalidad, por lo que se analizaron con test paramétricos para la comparación de medias (Test de la T de Fisher). En las figura 108 se observa la división realizada para la cuantificación de la densidad del callo en sección coronal.

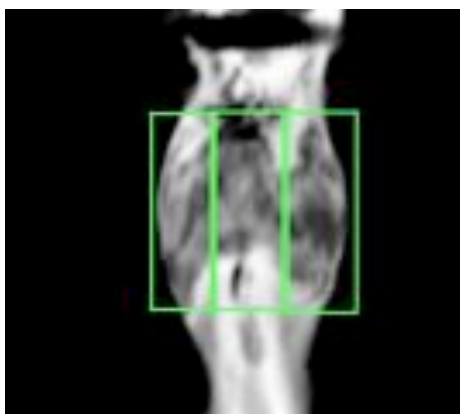


Figura 108. División en tres tercios del callo para el estudio de densidad.

| Variables cuantitativas |
|--|
| Densitometría del 1/3 interno del callo (UH) |
| Densitometría del 1/3 central del callo (UH) |
| Densitometría del 1/3 externo del callo (UH) |
| Densitometría axial global del callo (UH) |

Tabla 7. Variables analizadas en el estudio de la densidad ósea del callo.

4.4. Histología Simple

El estudio de los cortes histológicos de los callos de elongación fue realizado por un médico patólogo especialista en anatomía patológica del sistema músculo-esquelético, el Dr. Juan Carlos Sanz del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Donostia. Los cristales fueron estudiados en la tinción de Hematoxilina Eosina y Tricrómico de Masson, a aumento desde 2x hasta 10x. Cada callo se dividió en 3 zonas. La zona 1 (Z1) era la inmediatamente adyacente al hueso cortical, la zona 3 era la zona más central (Z3), y la zona 2 era definida como la zona intermedia (Z2) (Figura 109). El resultado de cada variable se expresa como la media o promedio de cada par de zonas simétricas (Z1 y Z1', Z2 y Z2', Z3 y Z3').

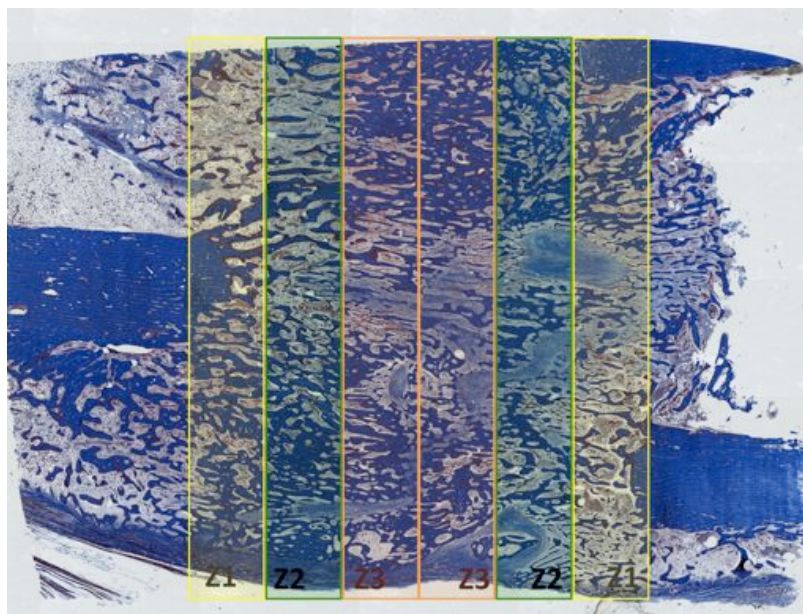


Figura 109. Definición de las zonas de estudio en corte histológico con Tricrómico de Masson.

4.4.1. Estudio histológico descriptivo del callo

Se determinó para cada zona una serie de aspectos histológicos relevantes (Tabla 8). Se llevó a cabo una determinación en cada zona del número de osteoblastos y osteoclastos por 10 campos de HPF (a 40x). Así como una determinación en cada zona del número de luces vasculares por 10 campos de HPF (a 40x). Se determinó la presencia de tejido fibroso y la de cartílago en cada zona (0: ausencia, 1: presencia). Se determinó la presencia de trabéculas en cada zona del callo (0: ausencia, 1: presencia, 2: abundancia). Se determinó el tipo de osificación predominante para todo el callo en conjunto (Z1, 2 y 3) : endocondral (1), intramembranosa (2), o mixta (3).

| Variables cuantitativas | Variables categóricas |
|---|--|
| Nº de osteoblastos por 10 campos por zona (Z1, 2 y 3) | Tejido fibroso por zona (Z1,2 y3) (0: ausencia, 1: presencia) |
| Nº de osteoclastos por 10 campos por zona (Z1, 2 y 3) | Tejido cartilaginoso por zona (Z1,2 y3) (0: ausencia, 1: presencia) |
| Nº de luces vasculares por 10 campos por zona (Z1, 2 y 3) | Presencia de trabéculas por zona (Z1,2 y 3) (0: ausencia, 1: presencia, 2: abundancia) |
| | Tipo de osificación global (1: endocondral, 2: intramembranosa, 3: mixta) |

Tabla 8. Variables analizadas en el estudio histológico descriptivo del callo.

4.4.2. Estudio histológico de la madurez del callo

Para estudiar la madurez del callo de elongación primero se analizó la presencia de trabéculas óseas en cada zona y su grado de maduración, así como el osteoide y su volumen relativo respecto al hueso mineralizado. También se evaluó el paso de trabéculas en la zona 3, concepto denominado bridging, aspecto que traduce una maduración del regenerado al ir desapareciendo la zona de mineralización. Posteriormente se evaluó la maduración del regenerado por zonas y en conjunto.

Mediante el microscopio de luz polarizada se observó si había trabéculas óseas o hueso lamelar maduro en cada zona, lo cual era esencial para determinar el grado de maduración del fenómeno regenerativo. Determinándose las siguientes posibilidades: ausencia de trabéculas (0), presencia de trabéculas óseas compuestas por hueso fibroreticular inmaduro que no muestran birrefringencia en el microscopio de luz

polarizada (1), y presencia de trabéculas óseas con tejido óseo lamelar con birrefringencia positiva en luz polarizada (2).

El paso de trabéculas por la zona 3, o bridging, se determinó en escala ordinal como ausencia de puentes óseos (0), incompleto (1), y completo (2).

Se calculó el Volumen Relativo de Osteoide (ROV) para cada zona. Para ello se empleó la tinción de Tricrómico de Masson, que tiñe de azul oscuro el osteoide y deja en rojo el hueso mineralizado, y se calculó con el microscopio con retícula de 100 puntos el número de puntos ocupados por osteoide y el número de puntos ocupados por tejido mineralizado y osteoide. El Volumen Relativo de Osteoide (ROV) se expresa en porcentaje.

Se determinó la fase de maduración de cada zona, determinando si se encontraba en equivalencia con la zona central de crecimiento (0), si equivalía a una zona de mineralización (1), a una zona de remodelación (2), o a una de tubulización (3). Ésta última consiste en la formación de hueso cortical y medular, y supone la fase última de la regeneración ósea.

La maduración del callo de elongación en conjunto se llevó a cabo por dos métodos. El primero fue mediante estimación de los días de maduración convertidos a una escala ordinal. Los primeros 3 días se definen como la fase hemorrágica (0); del día 3 al 7 es la inflamatoria (1), en la que se encuentra tejido de granulación y osteoide inmaduro; del día 7 al 35 se suele observar presencia de tejido fibroso, hueso lamelar y formación de cartílago (2); a partir del día 35 el callo suele caracterizarse por la presencia de hueso lamelar y actividad osteoclástica de remodelación (3).

El otro método empleado para describir la maduración del callo en su conjunto es la descripción del estadio del regenerado, también convertido a escala ordinal. El estadio de hematoma se da en las primeras horas y días (0); el estadio inflamatorio es a partir de las 48 horas (1); en el estadio de granulación se observan fibroblastos, capilares y células mesenquimales, se describe del día 3 al 12 (2); el estadio de callo blando destaca por el comienzo de formación de cartílago y trabéculas inmaduras (3); el estadio de callo duro presenta trabéculas maduras y puentes óseos que cruzan el foco (4); el estadio de remodelación presenta una sustitución del hueso fibroreticular por hueso lamelar y cortical, así como una tubulización y formación de endostio (5).

Las variables empleadas en el estudio de maduración se encuentran reflejadas en la Tabla 9. Las variables cuantitativas del estudio histológico fueron estudiadas mediante T de Fisher. Las variables dicotómicas mediante Chi-Cuadrado y las ordinales mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

| Variables cuantitativas | Variables categóricas |
|--|---|
| Volumen Relativo de Osteoide (ROV) por zona (Z1,2 y3) (%) | Madurez trabecular por zona (Z1, 2 y 3) (0: ausencia; 1:inmaduras; 2: lamelar) Paso de trabéculas por zona 3 (0:ausencia; 1:incompleta; 2:completa) Maduración por zona (Z1,2 y3) (0:zona central de crecimiento; 1:zona de mineralización; 2:zona de remodelación; 3:zona de tubulización) Maduración del callo en días (0: <3d; 1: 3-7d; 2: 7-35d; 3: >35d) Maduración del callo en estadios (0:hematoma; 1:inflamatorio; 2:granulación; 3:callo blando; 4:callo duro; 5:remodelación) |

Tabla 9. Variables analizadas en el estudio histológico de la madurez del callo.

4.5. Histomorfometría

El estudio histomorfométrico permite cuantificar aspectos relevantes de la estructura y actividad de un tejido. En nuestro estudio la histomorfometría está orientada a la determinación de la proporción de los principales tejidos presentes durante la osteogénesis a distracción. No se han incluido en el estudio histomorfométrico ni la cuantificación de células ni de luces vasculares, ya que el propio estudio histológico simple lo incluye. Tampoco se ha calculado ningún índice de madurez del regenerado ni de la madurez trabecular, puesto que también se ha realizado a partir de la histología simple.

Mediante el sistema ImajeJ® se ha determinado la superficie relativa cubierta de tejido óseo, de cartílago y de tejido fibroso. Para ello se ha llevado a cabo una determinación de la superficie total de cada regenerado para posteriormente sustraer el espacio intertrabecular ocupado o por grasa o por médula ósea. A partir de esta determinación, tomada como el 100% del regenerado se han ido determinando la superficie relativa de cada tejido. Mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina se calculaba la superficie relativa de tejido óseo tras aplicar el protocolo de análisis de imágenes digitalizadas. Para el cálculo de la superficie relativa de cartílago y tejido fibroso se empleaba la tinción de Tricrómico de Masson, siguiendo un protocolo específico para

cada tejido basado en la distinta tinción de cada uno. En la Tabla 10 se encuentran las variables estudiadas por la histomorfometría en este trabajo.

| Variables cuantitativas |
|--|
| Superficie relativa de tejido óseo (%) |
| Superficie relativa de cartilago (%) |
| Superficie relativa de tejido fibroso (%) |

Tabla 10. Variables estudiadas en el estudio histomorfométrico.

RESULTADOS

1. CONFIGURACIÓN DE LOS GRUPOS

1.1. Casos excluidos

Aplicando los criterios de exclusión se determinó que tres casos eran inválidos. Dos de los casos excluidos pertenecen a la primera tanda de 6 corderos. El tercer caso excluido pertenece a la tercera tanda de corderos intervenidos. Se describen a continuación los tres casos con la aplicación de los criterios que los convertían en casos inválidos.

1.1.1. Caso 7

El caso 7 del grupo A pertenece a la primera tanda de 6 corderos intervenidos, concretamente fue el primer cordero de toda la serie. Se realizaron todos los procedimientos según lo anteriormente descrito. El estudio radiológico mostró una desviación en varo de 12° en el día 10 del procedimiento, y de 17° en el día 30 y 40 del mismo (Figuras 110 a 112).



Figura 110. Caso 7.
Día 0: 2.4°



Figura 111. Caso 7.
Día 10: 12.25°



Figura 112. Caso 7.
0: 17.27°

1.1.2. Caso 8

El caso 8 del grupo A pertenece a la primera tanda de corderos intervenidos. El estudio radiológico mostró una desviación en varo de 18° al día 40 del procedimiento, no identificándose previamente esta deformidad por la mala calidad de las radiografías (Figura 113 a 115).



Figura 113. Caso 8.
Día 0: 3.4°



Figura 114. Caso 8.
Día 20: 0.69°

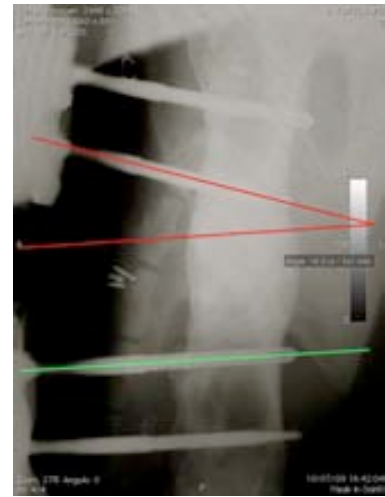


Figura 115. Caso 8.
Día 40: 18.31°

1.1.3. Caso 18

El caso 18 del grupo A pertenece a la tercera tanda de corderos intervenidos. El estudio radiológico mostró una desviación en varo de 1.78° el día 0, de 15.48° el día 30, y de 17.97° el día 40 (Figuras 116 a 118).



Figura 116. Caso 18.
Día 0: 1.78°

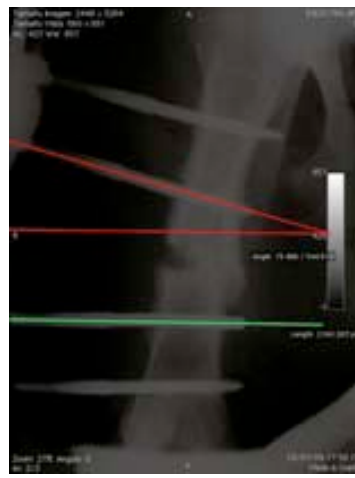


Figura 117. Caso 18.
Día 30: 15.48°

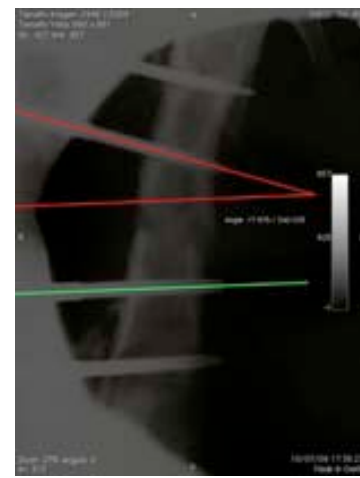


Figura 118. Caso 18.
Día 40: 17.97°

1.2. Configuración definitiva de los grupos

Tras haber realizado tres tandas de 6 corderos cada una, y haber excluido 3 corderos del grupo control A, se realizó una última tanda de 5 corderos, en la que no hubo que excluir ningún espécimen. Los grupos quedaron configurados en 10 corderos en el grupo A y 10 en el B. En la Tabla 11 puede observarse la distribución de los dos grupos. En la

exposición de los resultados se describirán en relación a su ID, y sólo se mostrarán los casos válidos.

| Cordero | ID | Grupo | Válidos |
|------------|-----------|----------|-----------------|
| 40 | 1 | B | Sí |
| 41 | 2 | B | Sí |
| 140 | 3 | B | Sí |
| 142 | 4 | B | Sí |
| 143 | 5 | B | Sí |
| 145 | 6 | A | Sí |
| 147 | 7 | A | EXCLUIDO |
| 148 | 8 | A | EXCLUIDO |
| 42 | 9 | B | Sí |
| 37 | 10 | A | Sí |
| 38 | 11 | A | Sí |
| 39 | 12 | A | Sí |
| 416 | 13 | A | Sí |
| 419 | 14 | A | Sí |
| 433 | 15 | A | Sí |
| 435 | 16 | A | Sí |
| 44 | 17 | A | Sí |
| 45 | 18 | A | EXCLUIDO |
| 46 | 19 | B | Sí |
| 47 | 20 | B | Sí |
| 48 | 21 | B | Sí |
| 1205 | 22 | B | Sí |
| 43 | 23 | A | Sí |

Tabla 11. Configuración definitiva de los grupos.

2. VALIDACIÓN DEL PRP

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) obtenido durante el primer procedimiento quirúrgico era analizado en laboratorio. Se llevaba a cabo una cuantificación de plaquetas por cada caso del grupo B. La concentración media de plaquetas administradas fue de 590.240 Plaquetas/ μ L, con un Intervalo de Confianza al 95% entre 490.998 y 689.481 Plaquetas/ μ L. En la Tabla 12 se muestran las concentraciones de plaquetas en cada caso del grupo B (PRP), y en la Figura 119 su distribución como variable.

| ID | Grupo | Concentración de plaquetas |
|----|-------|-------------------------------|
| 1 | B | 708.000 Plaquetas/ μ L |
| 2 | B | 658.200 Plaquetas/ μ L |
| 3 | B | 821.000 Plaquetas/ μ L |
| 4 | B | 347.000 Plaquetas/ μ L |
| 5 | B | 581.200 Plaquetas/ μ L |
| 9 | B | 531.000 Plaquetas/ μ L |
| 19 | B | 714.000 Plaquetas/ μ L |
| 20 | B | 493.000 Plaquetas/ μ L |
| 21 | B | 576.000 Plaquetas/ μ L |
| 22 | B | 473.000 Plaquetas/ μ L |

Tabla 12. Concentraciones de plaquetas en el PRP .

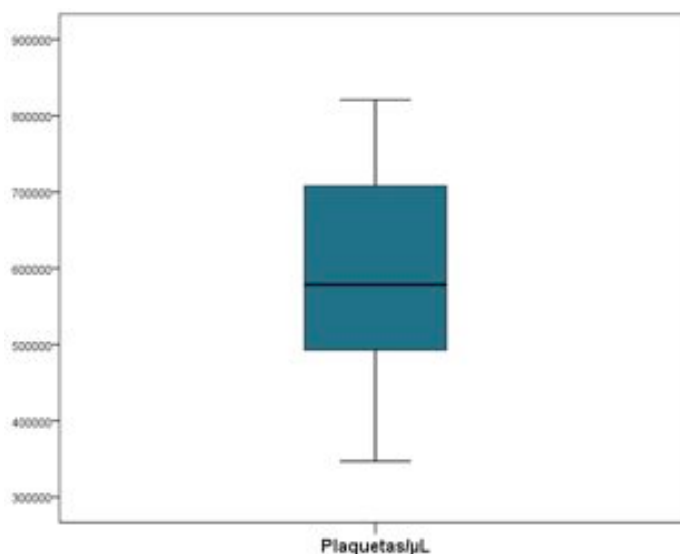


Figura 119. Gráfico BoxPlot que muestra la distribución de la concentración de plaquetas en el PRP.

Tomando el valor de referencia de plaquetas en sangre periférica en cordero joven descrito por Ramirez-Restrepo, $129.000 \text{ plaquetas}/\mu\text{L} \pm 28,58 \text{ plaquetas}/\mu\text{L}$, se calculó el número de veces que se había concentrado las plaquetas en el PRP respecto a la sangre periférica (334). La concentración media fue de 4,6 veces, con un rango entre 6,36 y 2,69 veces. En el gráfico 120 se muestra la distribución de concentraciones de plaquetas en el PRP administrado de cada cordero.

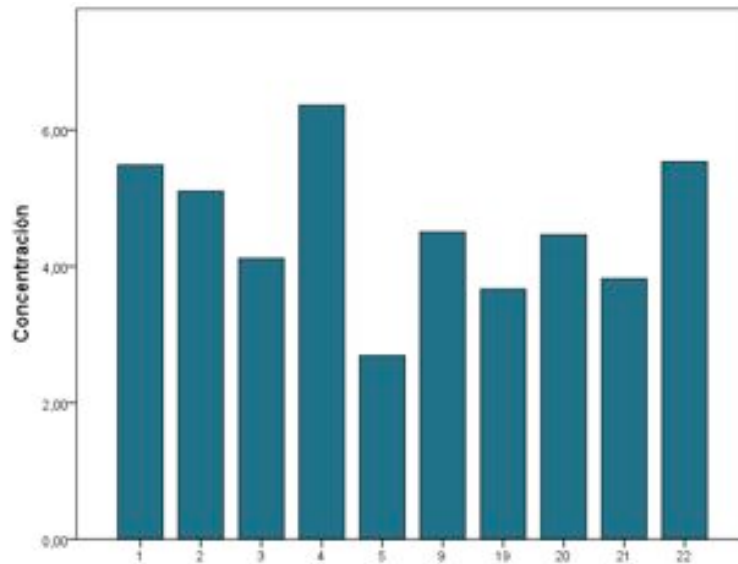


Figura 120. Concentración de las plaquetas en el PRP respecto a sangre periférica.

3. EXAMEN CLÍNICO

Diariamente se evaluaba a los corderos, observando si apoyaban la extremidad intervenida, llevando a cabo la elongación durante la fase de distracción y comprobando la presencia de complicaciones. Durante las limpiezas se valoraba la presencia de infección de la entrada de los clavos en la piel. En la Tabla 13 se exponen los datos recogidos referentes al examen clínico durante el procedimiento. Las variables son categóricas dicotómicas (0: ausencia y 1: presencia), excepto el aflojamiento clínico de los clavos que es cuantitativa. Posteriormente se analizan por grupos las distintas variables.

| ID | Grupo | Apoyo de extremidad (latencia) | Apoyo de extremidad (distracción) | Apoyo de extremidad (consolidación) | Infección superficial | Infección profunda | Aflojamiento clínico del clavo | Complicaciones mecánicas mayores |
|----|-------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 | B | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| 2 | B | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | B | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 4 | B | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | B | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 6 | A | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | B | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | A | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 11 | A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | A | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 4 | 1 |
| 13 | A | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | A | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 15 | A | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | A | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | A | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 4 | 0 |
| 19 | B | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 20 | B | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 21 | B | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 22 | B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 23 | A | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 13. Datos recogidos del examen clínico durante el procedimiento.

3.1. Apoyo de la extremidad

Durante los 40 días que duraba cada ciclo experimental los corderos eran observados diariamente. De modo que el apoyo de la extremidad era registrado en cada cordero durante las tres fases experimentales, la de latencia, distracción y consolidación. La mayoría de los corderos realizaron apoyo de la extremidad durante alguna de las fases experimentales. La fase en la que se registraron más corderos sin apoyo de la extremidad fue la de distracción, habiéndose registrado más corderos con apoyo de la extremidad en las fases de latencia y de consolidación. Durante las tres fases se estimulaba a los corderos

para que hiciesen apoyo activo de la extremidad en el espacio de la corralina del Estabulario (Figura 121).



Figura 121. Corderos en la fase de latencia cargando con la extremidad intervenida.

Los corderos que no cargaban la extremidad fueron observados con especial cuidado para detectar alguna complicación que interfiriese con el procedimiento. No se observaron complicaciones relevantes relacionadas con el procedimiento, a excepción de una infección profunda comentada en el siguiente apartado. Tres de los corderos que no realizaron carga en ninguna de las fases sufrieron una deformidad de la articulación distal de la pata, con un predominio de flexión y varización de la pezuña, como se puede observar en la Figura 122. De estos 3 casos 2 pertenecían al grupo B y 1 al grupo A.



Figura 122. Cordero que no realizó carga de la extremidad intervenida (fase de distracción).

Por grupos se observó un apoyo de la extremidad en la fase de latencia en 7 casos en el grupo A (Control) y 8 en el B (PRP). En la fase de distracción se observó un apoyo de 6 casos del grupo A (Control) y en 5 en el grupo B (PRP). En la fase de consolidación se observó un apoyo de la extremidad en 8 casos en el grupo A (Control) y de 8 en el grupo B (PRP). El estudio estadístico mediante Chi-Cuadrado no observó diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Figura 123 a 125).

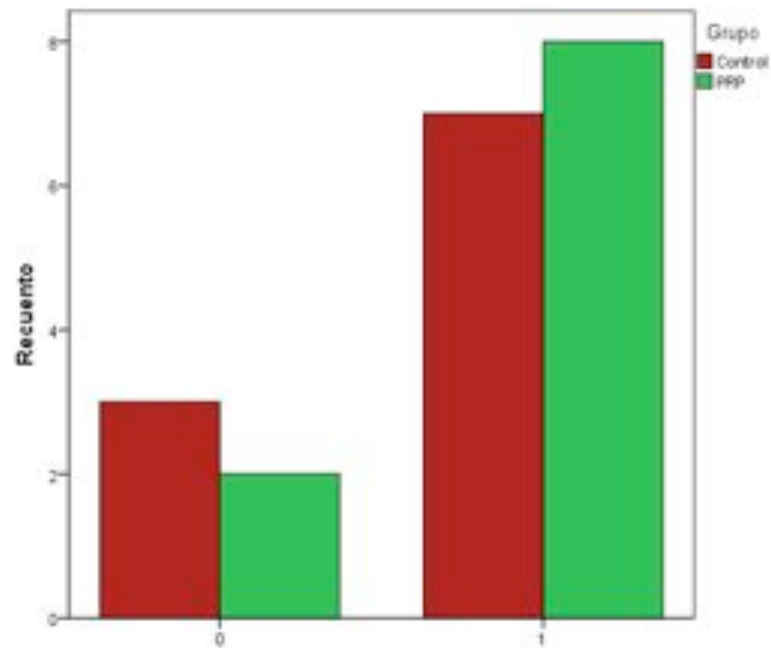


Figura 123. Gráfico de barras que muestra el apoyo de la extremidad por grupo en la fase de latencia (0: no apoyo, 1: apoyo).

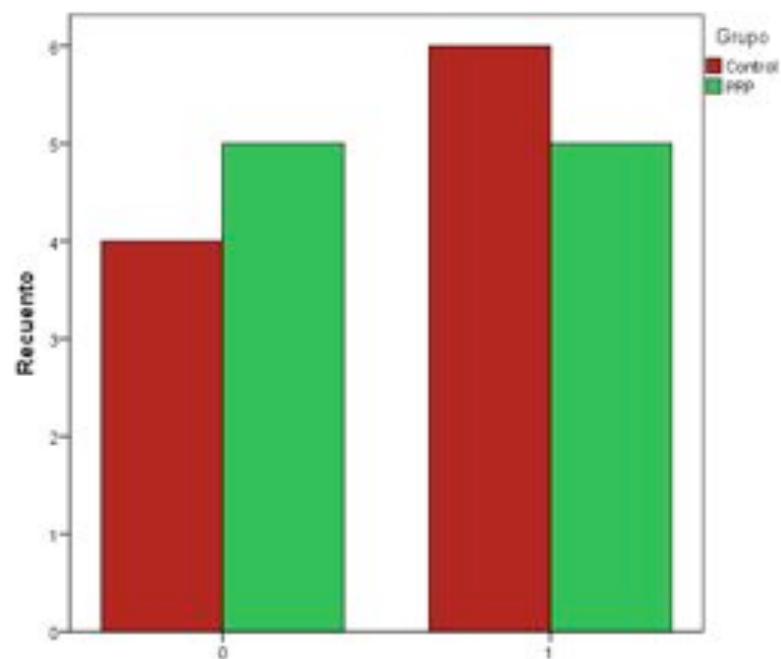


Figura 124. Gráfico de barras que muestra el apoyo de la extremidad por grupo en la fase de distracción (0: no apoyo, 1: apoyo).

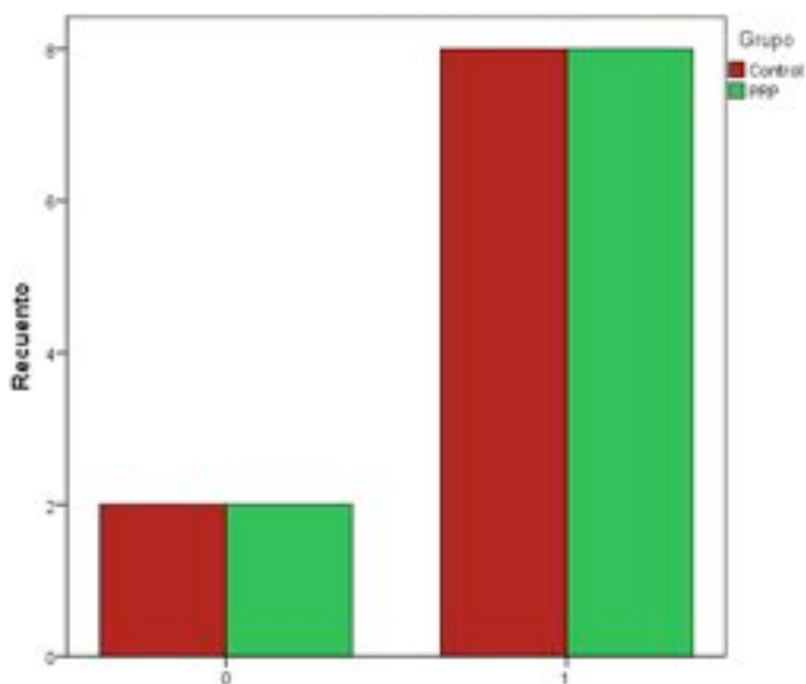


Figura 125. Gráfico de barras que muestra el apoyo de la extremidad por grupo en la fase de consolidación (0: no apoyo, 1: apoyo).

3.2. Infecciones

Durante los 40 días del ciclo experimental a cada cordero se le cambiaban los apósitos semanalmente, y cuando coincidía con la sedación para la realización de la radiología simple o la administración se llevaba a cabo una limpieza exhaustiva con esponjas y solución jabonosa quirúrgica.

Se registraron 5 casos de infecciones locales en clavos. De los cuales 3 fueron en el grupo A (Control) y 2 en el grupo B (PRP). Estas infecciones fueron diagnosticadas a partir de la fase de distracción y fueron tratadas con antibioterapia empírica, analgesia y limpieza repetida de apósitos. No se llevaron a cabo cultivos de heridas.

Se registró un caso de infección profunda, en el caso 1, perteneciente al grupo B (PRP). Dicho cordero no realizó apoyo correcto de la extremidad en ninguna de las fases del procedimiento. En la fase de consolidación realizaba apoyo parcial de la extremidad con la pezuña flexionada. Se le realizaron vendajes funcionales de la articulación distal de la pata sin conseguir apoyo fisiológico de la pezuña. En el estudio radiológico destacaba una línea radiolúcida con un ensanchamiento del callo perióstico importante (Figura 126 y 127). En el estudio con TC se observaron unas dimensiones importantes del callo, pero sin paso de trabéculas a través de la osteotomía. El diagnóstico de infección de la osteotomía

se realizó en el momento de extracción del fémur, observándose un fémur insuflado con un orificio tipo cloaca (Figura 128).



Figura 126. Radiografía postoperatoria del caso ID 1.



Figura 127. Radiografía al final de la fase de distracción en el caso 1.

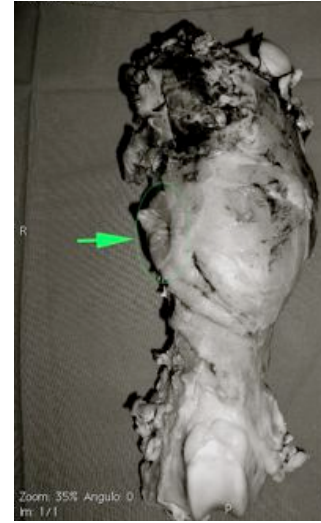


Figura 128. Pieza femoral del caso 1, donde se observa una cloaca (flecha).

El estudio estadístico llevado a cabo mediante Chi-Cuadrado no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en relación a la presencia de infección de clavos e infección profunda (Figura 129 y 130).

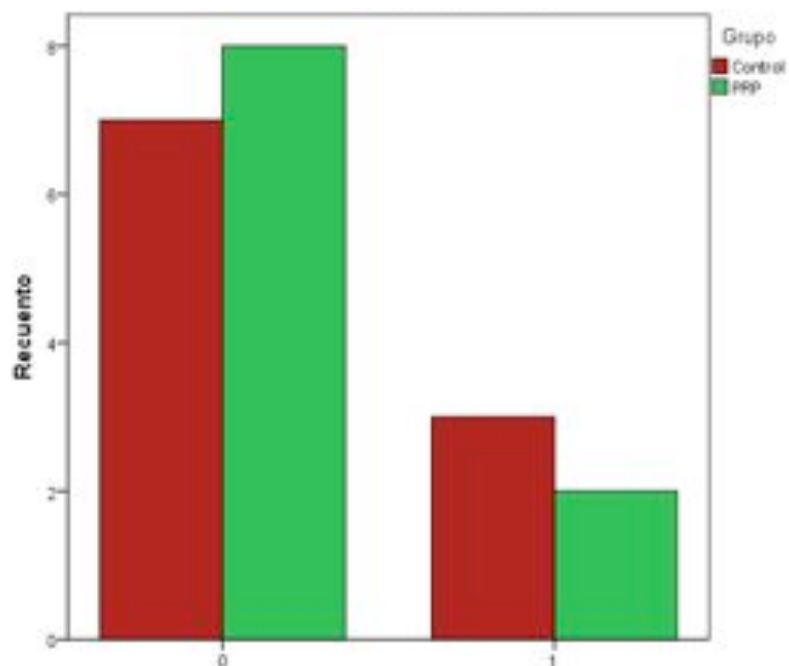


Figura 129. Gráfico de barras que muestra el número de infecciones superficiales por grupo (0: ausencia, 1: presencia).

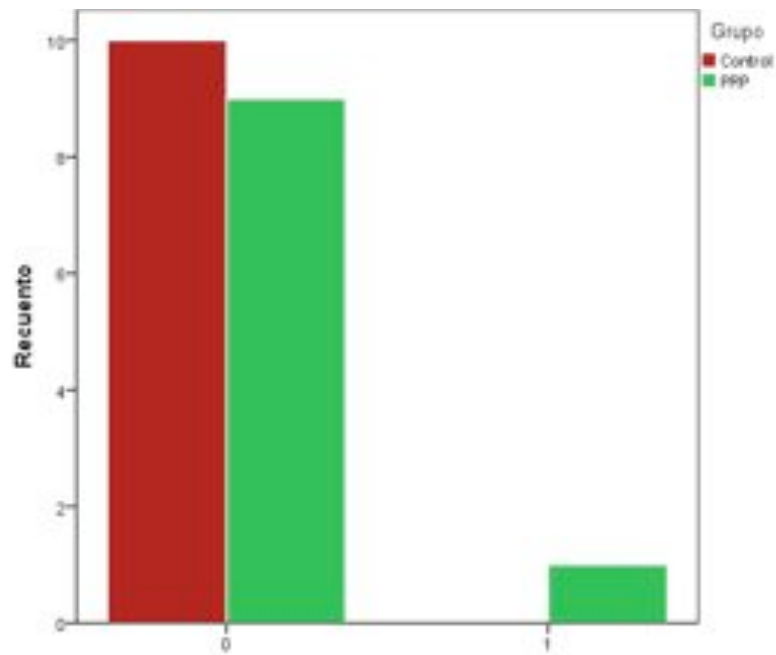


Figura 130. Gráfico de barras que muestra el número de infecciones profundas (0: ausencia, 1: presencia).

3.3. Complicaciones mecánicas

En el momento de la extracción del fijador, de los 40 clavos por cada grupo (4 por cordero) se observaron 11 casos de aflojamiento clínico en el grupo A (Control) y 9 en el grupo B (PRP). El aflojamiento se evidenciaba por una osteolisis importante alrededor del clavo en la radiología simple y se corroboraba durante la extracción de los clavos al final de la fase experimental (Figura 131 y 132). No todos los clavos con lisis radiológica presentaban un aflojamiento evidente.



Figura 131. Caso 17 del grupo A (Control), que presenta osteolisis especialmente del último clavo.



Figura 132. Caso 3 del grupo B (PRP), que presenta osteolisis del clavo más distal al final de la fase de consolidación.

Las complicaciones mayores sufridas se resumen en un solo caso que perdió todo el fijador 6 días antes de concluir el procedimiento experimental, el caso 12 y perteneciente al grupo A (Control). Dicho caso presentaba osteolisis de los 4 clavos. No sufrió fractura ni deformidad del regenerado óseo, y realizaba carga total de la extremidad. En el estudio con radiología simple se observaba un importante regenerado óseo con paso abundante de trabéculas. La osteolisis de los clavos no estaba presente en la fase de distracción y se hizo patente en la fase de consolidación (Figuras 133 a 136).



Figura 133. Radiografía del caso 12, en fase de distracción, con una línea radiolúcida y sin osteolisis importante de los clavos.



Figura 134. Radiología del mismo caso tras la pérdida del fijador. Se observa una importante osteolisis de los 4 clavos.



Figura 135. Caso 12, que en la última semana perdió el fijador externo en bloque, pese a lo que realizaba carga de la extremidad.



Figura 136. Fijador externo del caso 12 tal y como se encontró en la corralina.

Del anterior caso los 4 clavos que se encontraban aflojados y con osteolisis puntuaron en el registro de aflojamiento de clavos, por lo que aunque el grupo A presentaba más aflojamiento de clavos en conjunto presentaba menos corderos con este problema. El estudio estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas en las complicaciones mecánicas tras el estudio con U de Mann-Whitney (Figura 137 y 138). No se han incluido las complicaciones de desviaciones axiales puesto que se han considerado dentro de los criterios de exclusión.

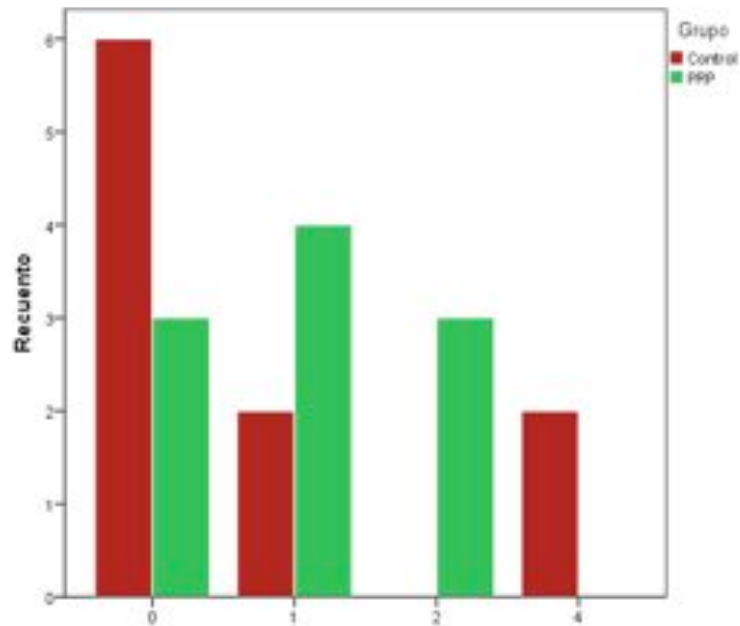


Figura 137. Gráfico de barras que muestra los casos con aflojamiento de 0 a los 4 clavos.

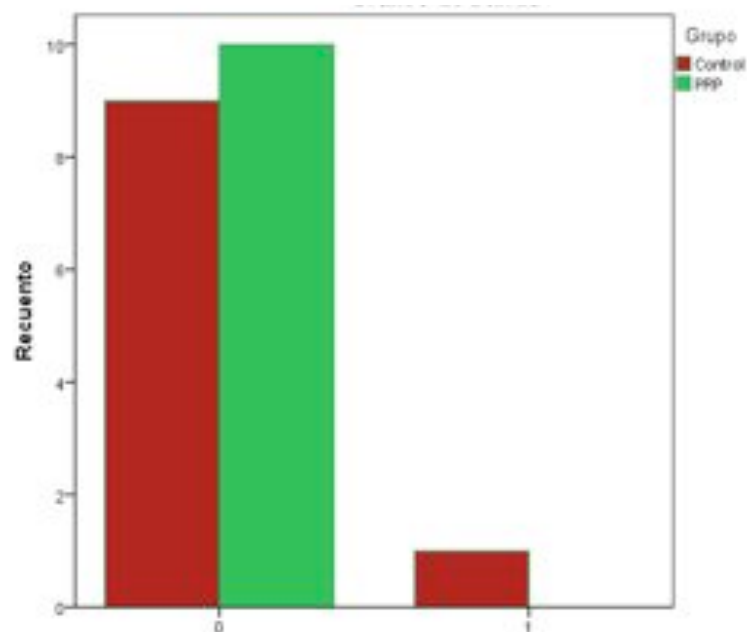


Figura 138. Gráfico de barras que muestra el número de complicaciones mecánicas mayores por grupo (0: ausencia, 1: presencia).

4. ESTUDIO DE RADIOLOGÍA SIMPLE

4.1. Radiología en fase de latencia

En la fase de latencia se comprobaba la correcta colocación del fijador, y se estudiaba la morfología de la osteotomía, así como la presencia o ausencia de una deformidad en varo. Todos los casos intervenidos presentaron una correcta colocación del fijador en el primer control radiológico.

La morfología de la osteotomía de cada caso no excluido se encuentra descrita en la Tabla 14. La distribución de esta variable por grupos se encuentra expresada en la Figura 139. El estudio estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el test no paramétrico empleado (U de Mann-Whitney).

| ID | Grupo | Morfología de la osteotomía |
|----|-------|-----------------------------|
| 1 | B | 1 |
| 2 | B | 1 |
| 3 | B | 3 |
| 4 | B | 1 |
| 5 | B | 1 |
| 6 | A | 1 |
| 9 | B | 3 |
| 10 | A | 1 |
| 11 | A | 1 |
| 12 | A | 2 |

| ID | Grupo | Morfología de la osteotomía |
|----|-------|-----------------------------|
| 13 | A | 2 |
| 14 | A | 1 |
| 15 | A | 1 |
| 16 | A | 3 |
| 17 | A | 3 |
| 19 | B | 2 |
| 20 | B | 3 |
| 21 | B | 1 |
| 22 | B | 2 |
| 23 | A | 2 |

Tabla 14. Morfología de la osteotomía en cada caso (1: transversa, 2: oblicua, 3: con tercer fragmento).

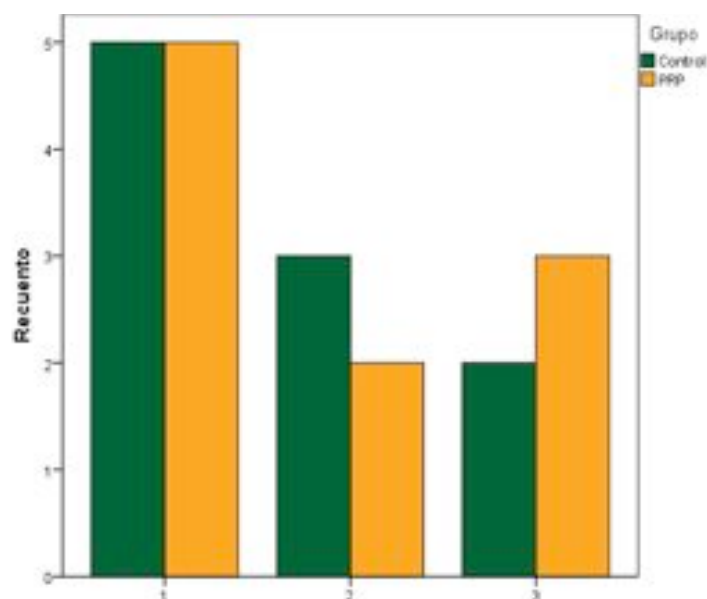


Figura 139. Distribución del tipo de osteotomía por grupos (1:transversa, 2:oblicua, 3: con tercer fragmento).

Ningún caso mostró una desviación angular en varo superior a 15° en el estudio radiológico de la fase de latencia. En las figuras 136 a 145 se observan casos de ambos grupos con distinto tipo de osteotomía.



Figura 140. Caso 6 del grupo A (Control) en el que se observa osteotomía transversa.



Figura 141. Caso 13 del grupo A (Control) en el que se observa osteotomía oblicua.



Figura 142. Caso 17 del grupo A (Control) con osteotomía con tercer fragmento.



Figura 143. Caso 21 del grupo B (PRP) en el que se observa osteotomía transversa.



Figura 144. Caso 19 del grupo B (PRP) en el que se observa osteotomía oblicua.



Figura 145. Caso 3 del grupo B (PRP) en el que se observa osteotomía con un tercer fragmento.

4.2. Radiología en fase de distracción

En las radiografías simples durante la fase de distracción eran realizadas el día 20 del procedimiento. En estas radiografías se comprobaba la alineación del fémur, constatando la ausencia o presencia de desviación en varo superior a 15°, aspecto que constituía criterio de exclusión del estudio. El cordero 45 del grupo A, con ID 18, fue excluido el día 20 del procedimiento al presentar una angulación de más de 15° de varo entre los clavos proximales y distales.

Se constataba la ausencia o presencia de callo perióstico medial, así como de callo circunferencial. Se constataba la presencia o ausencia de la línea radiolúcida. Por último se registraba la lisis alrededor de los clavos, enumerándose de proximal a distal. En la Tabla 15 se encuentran los registros del estudio radiológico en la fase de distracción, donde el valor 0 es ausencia y 1 es presencia.

| ID | Grupo | Callo perióstico medial | Callo circunferencial | Línea radiolúcida | Lisis clavo 1 | Lisis clavo 2 | Lisis clavo 3 | Lisis clavo 4 |
|----|-------|-------------------------|-----------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1 | B | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | B | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | B | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | B | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | B | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | A | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 9 | B | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | A | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | A | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | A | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | A | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | A | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | A | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | A | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 17 | A | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 19 | B | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | B | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | B | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | B | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | A | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 15. Datos recogidos del estudio radiológico simple en la fase de distracción, día 20 del procedimiento (0: ausencia, 1: presencia).

En las Figuras 146 a 149 se observan las distribuciones por grupos de las variables categóricas estudiadas en la fase de distracción.

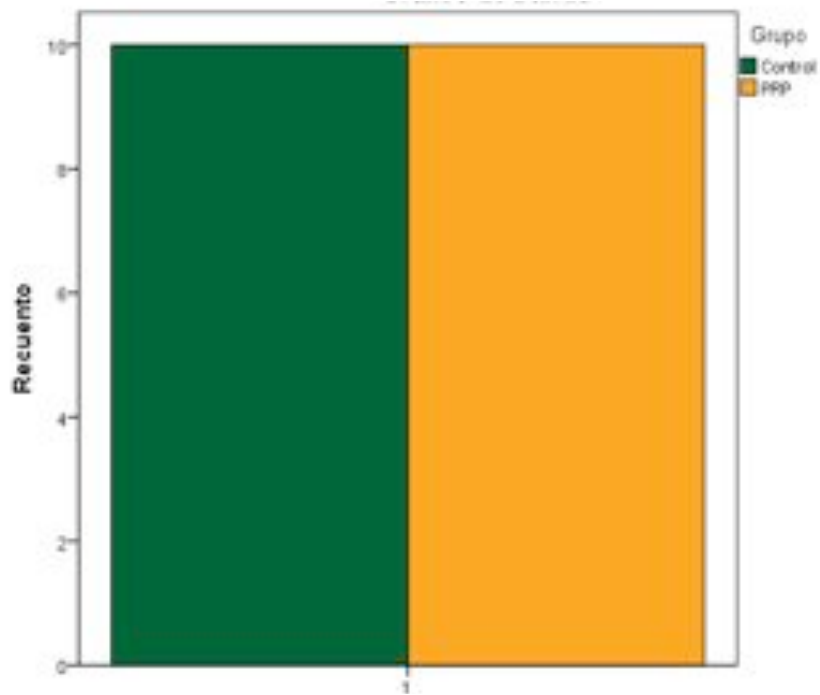


Figura 146. Distribución de la presencia de callo perióstico medial por grupos (0: ausencia, 1: presencia) .

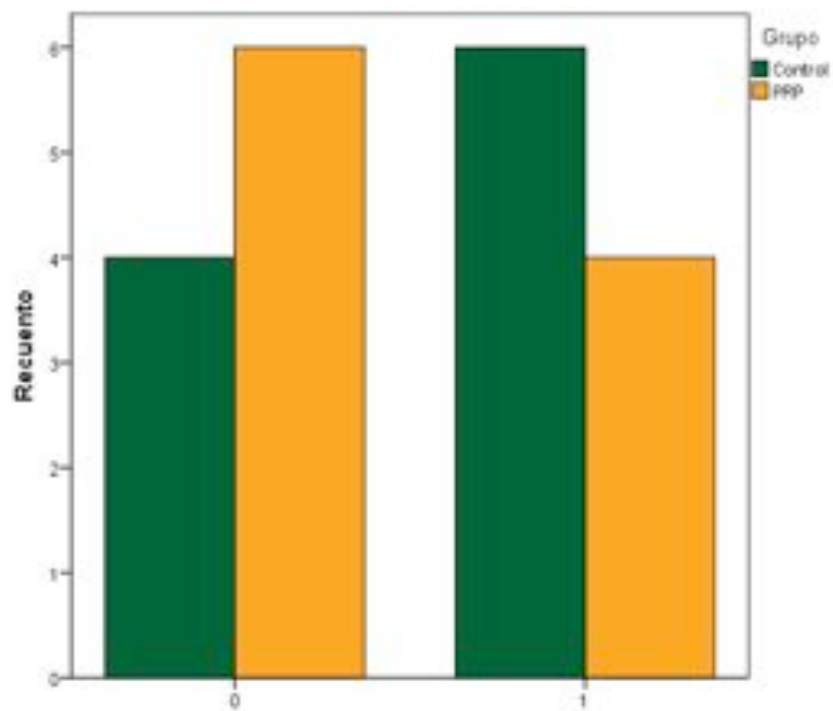


Figura 147. Distribución de la presencia de callo circunferencial por grupos (0: ausencia, 1: presencia).

El estudio estadístico mediante Chi-Cuadrado no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en relación a la presencia de callo perióstico medial y circunferencial en radiología simple durante la fase de distracción ($p > 0,05$).

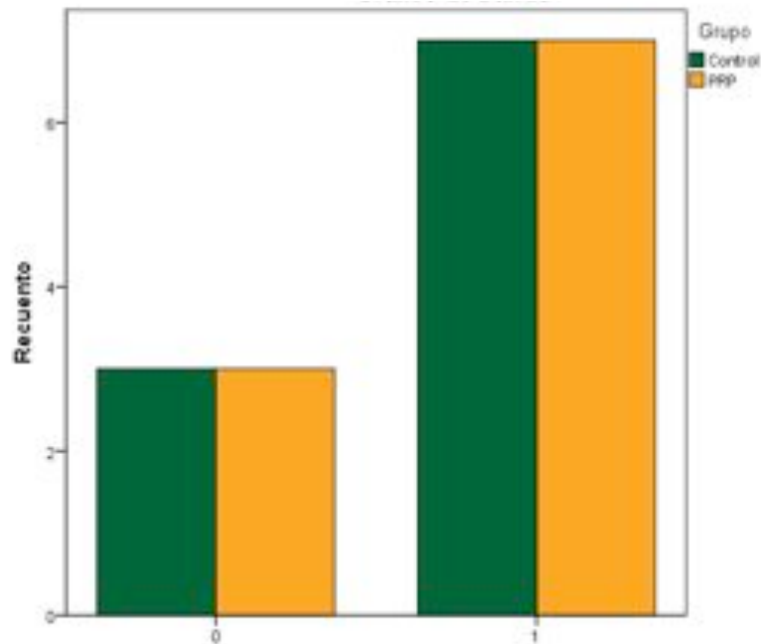


Figura 148. Distribución de la presencia de línea radiolúcida por grupos (0: ausencia, 1: presencia).

El estudio estadístico mediante Chi-Cuadrado no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en relación a la presencia de la línea radiolúcida.

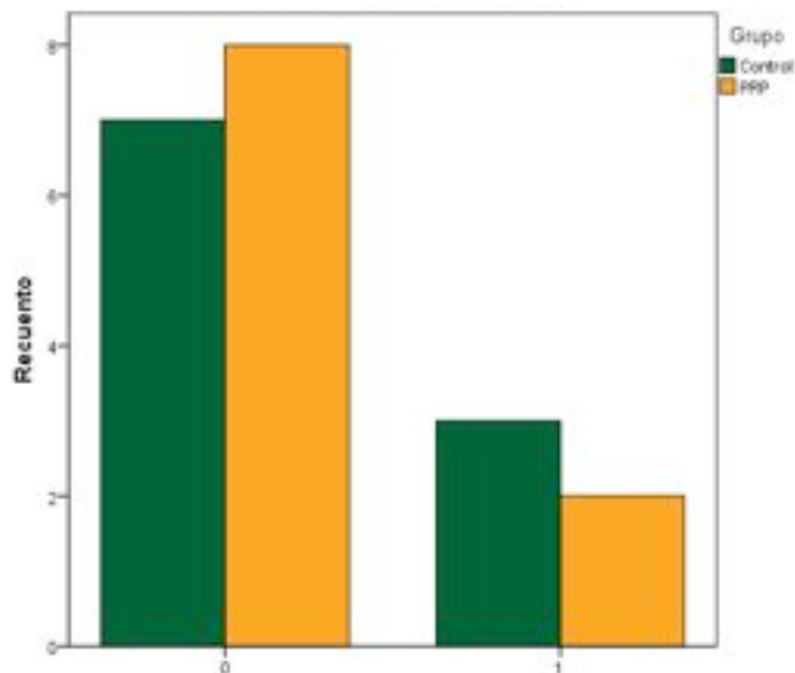


Figura 149. Distribución de la presencia por grupos de lisis alrededor de los clavos.

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas mediante Chi-Cuadrado por grupos, en relación a la lisis de los clavos durante la radiología simple de la fase de distracción. En las figuras 149 a 152 se observan casos de ambos grupos en la fase de distracción con distinto desarrollo del callo y ausencia o presencia de la línea radiolúcida.

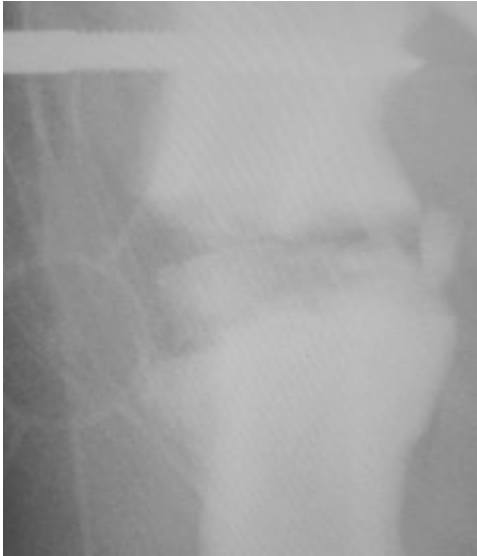


Figura 149. Caso 1 del grupo A (Control) durante la fase de distracción (día 20), en el que se puede observar presencia de callo perióstico medial y circunferencial, así como persistencia de la línea radiolúcida.

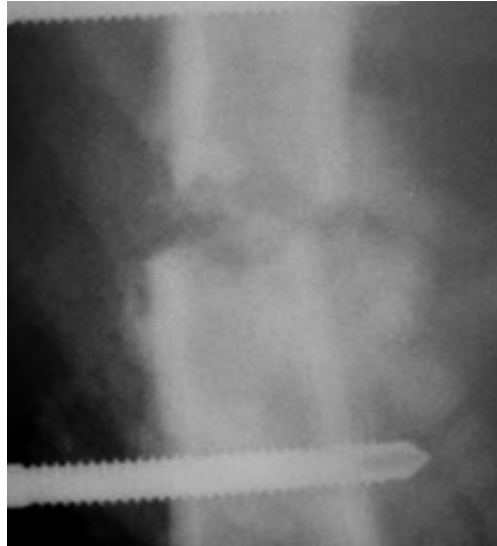


Figura 150. Caso 14 del grupo A (Control) durante la fase de distracción (día 20), en el que se puede observar callo perióstico medial, y ausencia del circunferencial, habiendo empezado a desaparecer la línea radiolúcida.



Figura 151. Caso 5 del grupo B (PRP) durante la fase de distracción (día 20), en el que se puede observar presencia de callo perióstico medial y circunferencial, así como persistencia de la línea radiolúcida.

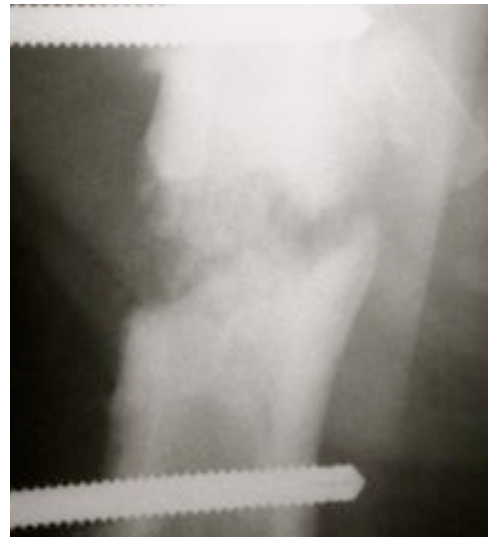


Figura 152. Caso 3 del grupo B (PRP) durante la fase de distracción (día 20), en el que se puede observar callo perióstico medial, y ausencia del circunferencial, habiendo desaparecido la línea radiolúcida.

4.3. Radiología en fase de consolidación

En la fase de consolidación se realizaba un último estudio con radiología simple, el día 40 del procedimiento, tras llevar 10 días desde el cese de la distracción. En este estudio radiológico se comprobaba que no existiese una deformidad en varo superior a 15° entre los clavos proximales y distales. Los corderos 147 y 148 del grupo A (con ID 7 y 8 respectivamente) fueron excluidos del estudio por presentar dicha deformidad en esta fase del estudio.

Se registró la presencia o ausencia de callo perióstico medial, circunferencial y de la línea radiolúcida (0: ausencia, 1: presencia). Se registró el paso de trabéculas a través del foco de osteotomía (0: ausencia, 1: escasas, 2: moderadas, 3: abundantes) y la presencia o ausencia de lisis alrededor de los clavos. En la tabla 16 se encuentran los datos registrados del estudio de radiología simple en fase de consolidación.

| ID | Grupo | Callo perióstico medial | Callo circunferencial | Línea radiolúcida | Paso de trabéculas | Lisis clavo 1 | Lisis clavo 2 | Lisis clavo 3 | Lisis clavo 4 |
|----|-------|-------------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1 | B | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 2 | B | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 3 | B | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | B | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 5 | B | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 6 | A | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 9 | B | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 10 | A | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 11 | A | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 12 | A | 1 | 1 | 0 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 13 | A | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | A | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | A | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 16 | A | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 17 | A | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 19 | B | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 20 | B | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | B | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 22 | B | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 23 | A | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Tabla 16. Datos recogidos del estudio radiológico en la fase de consolidación, día 40 del procedimiento.

Todos los casos presentaban callo perióstico medial visible en radiografías simples. El callo circunferencial estaba presente en 7 casos del grupo A y en 4 del grupo B. La persistencia de la línea radiolúcida fue identificada en 2 casos del grupo A y en 1 del grupo B. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con el test empleado (Chi-Cuadrado). En las figuras de 153 a 155 se puede observar la distribución de estas variables por grupos (0:ausencia, 1:presencia).

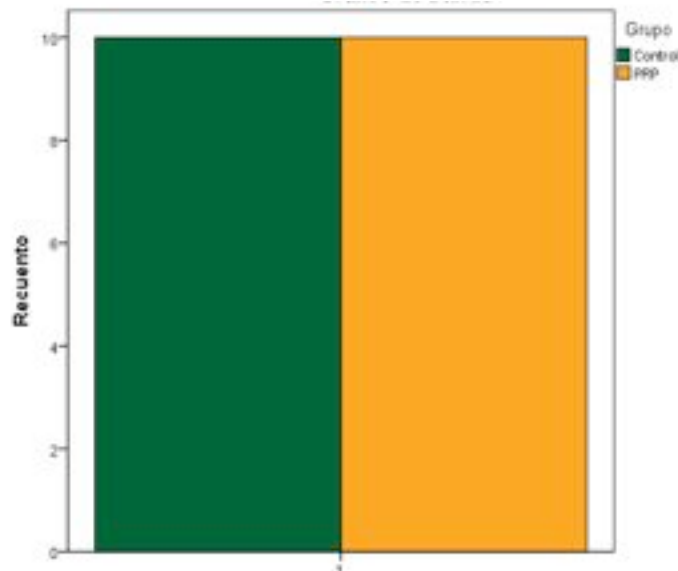


Figura 153. Distribución por grupos de la presencia de callo perióstico medial (1: presencia).

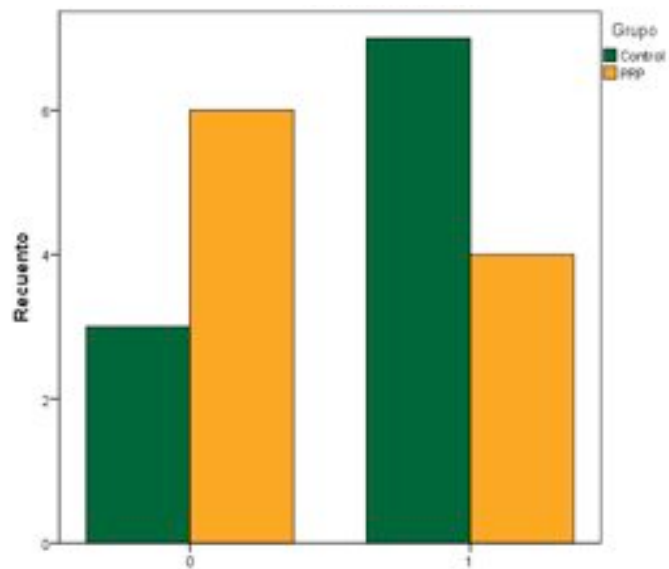


Figura 154. Distribución por grupos de la presencia de callo circunferencial (0: ausencia, 1: presencia) .

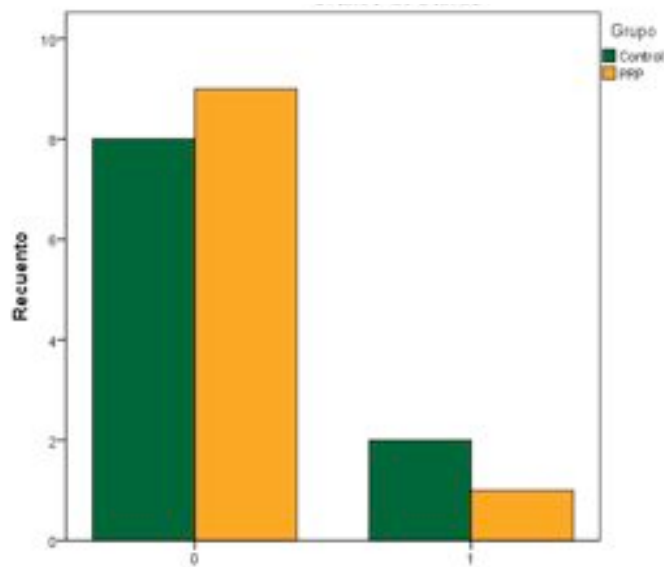


Figura 155. Distribución por grupos de la persistencia de la línea radiolúcida (0: ausencia, 1: presencia).

Todos los casos de ambos grupos presentaban paso de trabéculas a través del foco de osteotomía. Del grupo A (Control) 3 casos presentaban de trabéculas escaso, 3 moderadas y 4 abundantes. Del grupo B (PRP) 1 caso presentaba escasas trabéculas, 2 casos moderadas y 7 abundantes.

El estudio estadístico empleado observó diferencias estadísticamente significativas a favor de un mayor paso de trabéculas en el grupo B (PRP) ($p < 0,05$ en test no paramétrico de U de Mann-Whitney). En la figura 156 puede observarse la distinta distribución por grupos de esta variable.

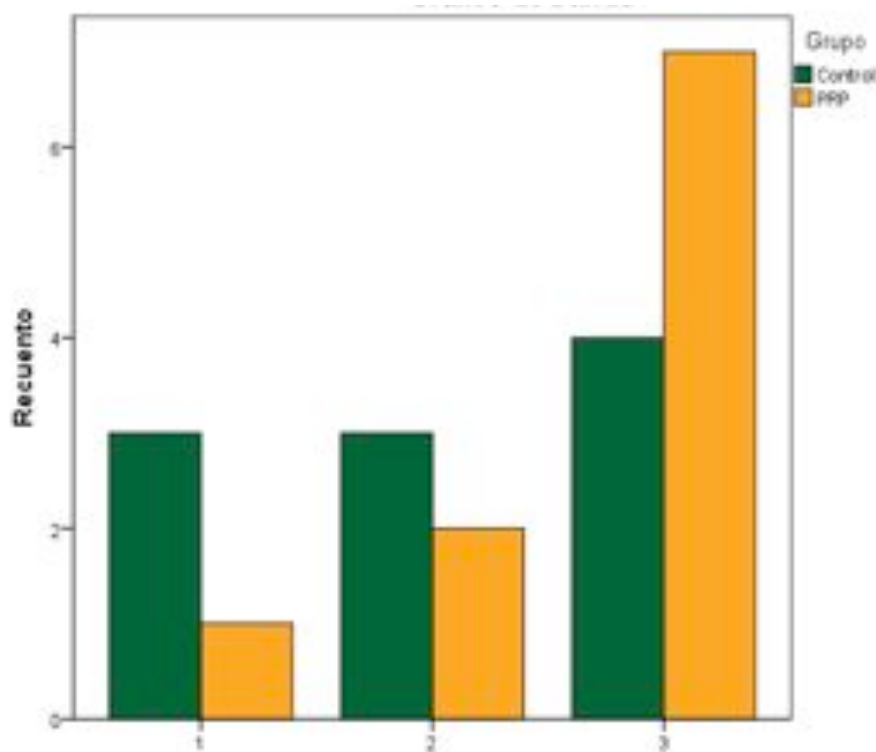


Figura 156. Distribución por grupos del paso radiológico de trabéculas a través del foco de osteotomía en fase de consolidación (1: escasas, 2: moderadas, 3: abundantes).

El estudio estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas mediante Chi-Cuadrado en la distribución de la lisis de los clavos distales entre los dos grupos. En la Figura 157 y 158 se puede observar la distribución por grupos de esta variable.

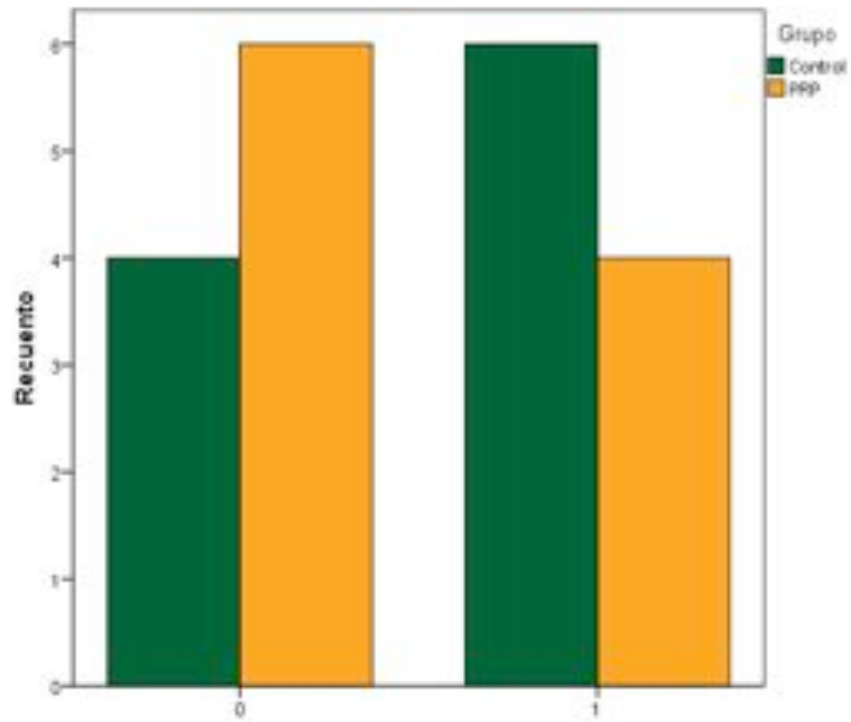


Figura 157. Distribución por grupos de la lisis radiológica del clavo 3 (0:ausencia, 1:presencia).

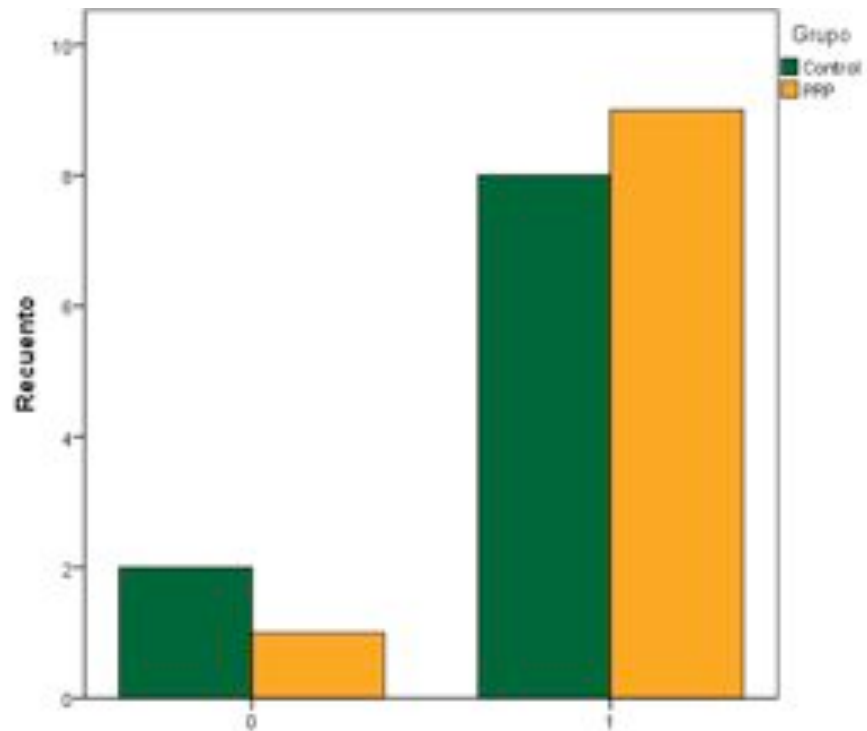


Figura 158. Distribución por grupos de la lisis radiológica de los clavos más distales (clavo 4; 0:ausencia, 1:presencia).

En las Figuras 159 a 162 se muestran las imágenes radiológicas con distintas características del regenerado óseo.



Figura 159. Caso 10 del grupo A (Control) en el que hay persistencia de la línea radiolúcida y presencia de callo medial y circunferencial.

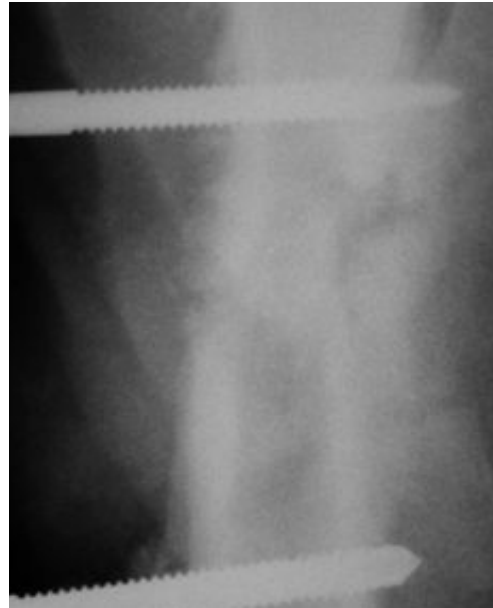


Figura 160. Caso 13 del grupo A (Control) en el que destaca un paso abundante de trabéculas y presencia de callo medial sin circunferencial.



Figura 161. Caso 4 del grupo B (PRP) en el que destaca un paso abundante de trabéculas, con presencia de callo medial y no circunferencial.

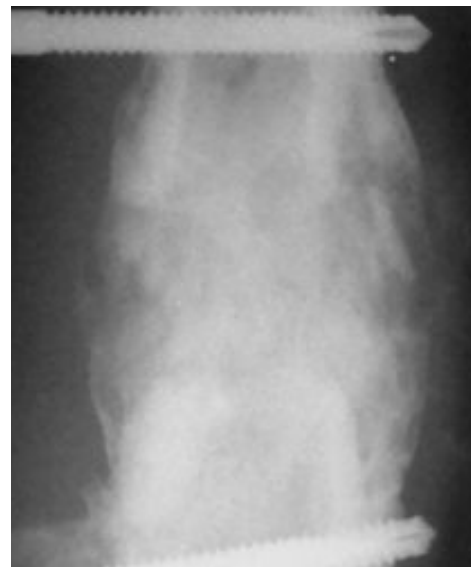


Figura 162. Caso 2 del grupo B (PRP) en el que destaca un paso abundante de trabéculas con presencia de callo medial y circunferencial.

5. ESTUDIO DE TC

5.1. Estudio morfométrico del fémur

En la Tabla 17 se muestran los valores de la morfometría del fémur intervenido y del contralateral, recogidos en los casos no excluidos. Posteriormente se exponen los resultados estadísticos descriptivos e inferenciales.

| ID | Grupo | Longitud fémur control | Longitud fémur intervenido | Diámetro superior fémur intervenido | Diámetro epicondíleo fémur intervenido |
|----|-------|------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--|
| 1 | B | 177 | 188 | 28 | 35 |
| 2 | B | 188 | 207 | 29 | 31 |
| 3 | B | 167 | 178 | 24 | 28 |
| 4 | B | 171 | 176 | 29 | 26 |
| 5 | B | 167 | 179 | 26 | 34 |
| 6 | A | 163 | 172 | 27 | 31 |
| 9 | B | 176 | 185 | 29 | 30 |
| 10 | A | 174 | 180 | 34 | 33 |
| 11 | A | 178 | 189 | 38 | 27 |
| 12 | A | 168 | 186 | 33 | 34 |
| 13 | A | 170 | 180 | 29 | 31 |
| 14 | A | 177 | 193 | 29 | 35 |
| 15 | A | 175 | 188 | 26 | 37 |
| 16 | A | 174 | 188 | 28 | 32 |
| 17 | A | 192 | 208 | 31 | 35 |
| 19 | B | 177 | 202 | 21 | 35 |
| 20 | B | 194 | 195 | 28 | 31 |
| 21 | B | 188 | 201 | 24 | 30 |
| 22 | B | 169 | 180 | 26 | 33 |
| 23 | A | 173 | 184 | 29 | 28 |

Tabla 17. Datos de la morfometría del fémur intervenido y contralateral.

El estudio morfométrico del fémur elongado y del contralateral mostró un incremento medio en longitud de 12,05 mm, con Intervalo de Confianza al 95% entre 9,76 y 15,04 mm, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) el incremento medio fue de 11,70 mm, con Intervalo de Confianza al 95% entre 6,93 y 16,47 mm. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 163).

El estudio morfométrico del diámetro coronal de la diáfisis a nivel infratrocantereo mostró un diámetro medio de 26,40 mm, con un Intervalo de Confianza al 95% entre 24,46 y 28,34 mm, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) el diámetro medio

fue de 30,40 mm, con un Intervalo de Confianza entre 27,78 y 33,02 mm. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos diámetros, siendo superiores en el grupo B (PRP) (prueba T con $p < 0,05$) (Figura 164).

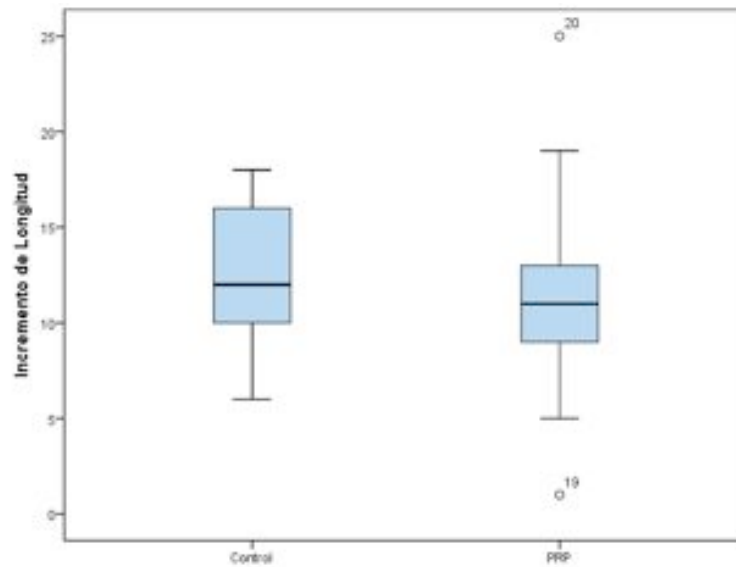


Figura 163. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos del incremento en longitud (mm).

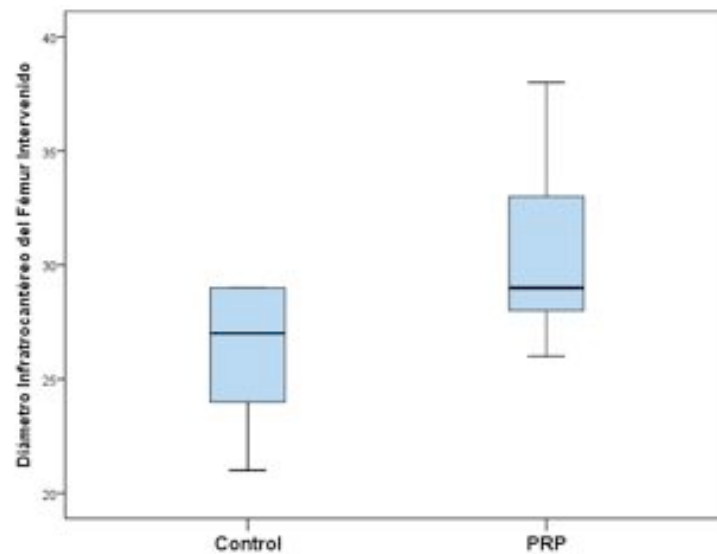


Figura 164. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos del diámetro infratrocantereo (mm).

El estudio morfométrico del diámetro coronal metafisario epicondíleo mostró un diámetro medio de 31,30 mm, con Intervalo de Confianza al 95% entre 29,17 y 33,43 mm, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) el diámetro medio fue de 32,30 mm, con Intervalo de Confianza al 95% entre 30,04 y 34,56 mm. Existen diferencias entre ambos grupos aunque no estadísticamente significativas (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 165).

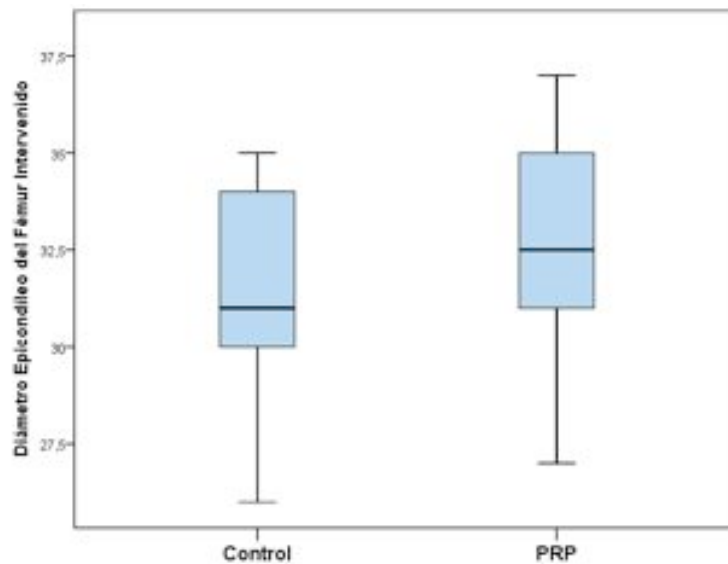


Figura 165. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos del diámetro epicondileo (mm).

En la Tabla 18 se muestran los valores de las áreas de sección a nivel del trocánter menor y de la línea epicondilea, en los casos no excluidos.

| ID | Grupo | Área de Sección Infratrocantereo | Área de Sección Epicondileo |
|----|-------|----------------------------------|-----------------------------|
| 1 | B | 5,18 | 16,41 |
| 2 | B | 5,31 | 16,03 |
| 3 | B | 5,35 | 15,97 |
| 4 | B | 4,86 | 16,11 |
| 5 | B | 5,42 | 15,15 |
| 6 | A | 5,49 | 14,25 |
| 9 | B | 4,71 | 16,31 |
| 10 | A | 4,67 | 16,2 |
| 11 | A | 5,13 | 15,65 |
| 12 | A | 4,86 | 15,98 |
| 13 | A | 5,21 | 15,73 |
| 14 | A | 5,02 | 14,79 |
| 15 | A | 4,74 | 15,96 |
| 16 | A | 4,57 | 14,78 |
| 17 | A | 4,68 | 15,34 |
| 19 | B | 5,31 | 16,12 |
| 20 | B | 5,43 | 16,73 |
| 21 | B | 5,68 | 15,15 |
| 22 | B | 5,25 | 16,21 |
| 23 | A | 4,36 | 15,54 |

Tabla 18. Datos de las áreas de sección del fémur intervenido.

El estudio morfométrico del área de sección a nivel infratrocantereo de la diáfisis mostró una superficie media de 4,87 cm² en el grupo A (Control), con un Intervalo de Confianza al 95% entre 4,63 y 5,11 cm². En el grupo B (con PRP) la superficie media fue de 5,24 cm², con un Intervalo de Confianza entre 5,05 y 5,45 cm² (Figura 166). El grupo

del PRP presentó unos valores superiores a los del grupo Control con diferencias estadísticamente significativas (prueba T con $p < 0,05$).

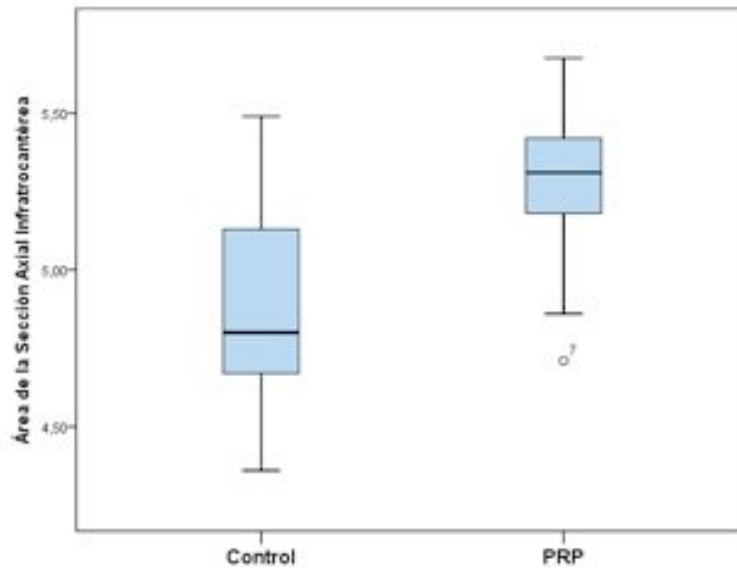


Figura 166. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos del área de acción infratrocantereo (cm^2).

El estudio morfométrico del área de sección a nivel epicondíleo mostró una superficie media de $15,32 \text{ cm}^2$ en el grupo A (Control), con un Intervalo de Confianza al 95% entre $14,88$ y $15,76 \text{ cm}^2$. En el grupo B (con PRP) la superficie media fue de $16,01 \text{ cm}^2$, con un Intervalo de Confianza entre $15,65$ y $16,38 \text{ cm}^2$ (Figura 167). El grupo del PRP presentó unos valores superiores a los del grupo Control con diferencias estadísticamente significativas (prueba T con $p < 0,05$).

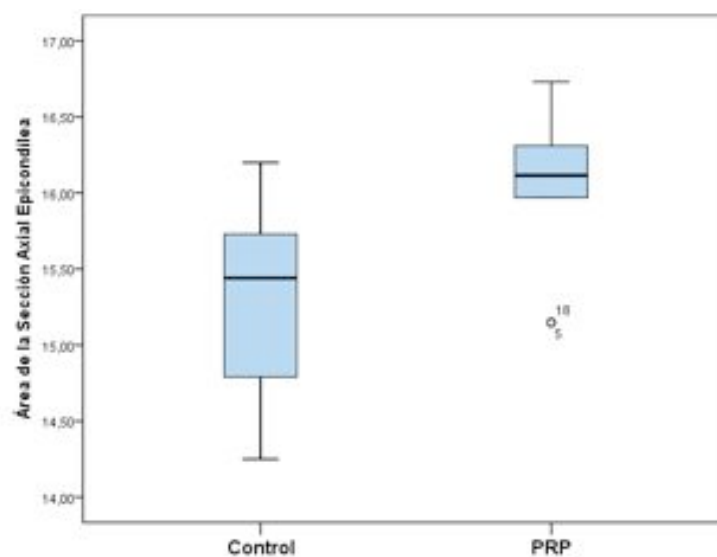


Figura 167. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos del área de sección epicondíleo (cm^2).

5.2. Estudio morfométrico del callo de elongación

En la Tabla 19 se muestran los datos recogidos de la morfometría del callo de elongación de los casos no excluidos. Posteriormente se expone la estadística descriptiva e inferencial de las variables descritas en la tabla.

| ID | Grupo | Diám. superior callo | Diám. inferior callo | Diám. coronal máximo del callo | Diám. sagital máximo del callo |
|----|-------|----------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 | B | 34 | 30 | 41 | 31 |
| 2 | B | 30 | 42 | 50 | 33 |
| 3 | B | 29 | 31 | 41 | 29 |
| 4 | B | 31 | 28 | 33 | 28 |
| 5 | B | 31 | 32 | 36 | 26 |
| 6 | A | 25 | 28 | 30 | 24 |
| 9 | B | 28 | 30 | 40 | 25 |
| 10 | A | 30 | 30 | 47 | 29 |
| 11 | A | 44 | 44 | 52 | 25 |
| 12 | A | 40 | 40 | 43 | 28 |
| 13 | A | 27 | 22 | 44 | 27 |
| 14 | A | 29 | 34 | 42 | 30 |
| 15 | A | 32 | 23 | 41 | 27 |
| 16 | A | 28 | 29 | 32 | 31 |
| 17 | A | 35 | 34 | 43 | 25 |
| 19 | B | 25 | 28 | 29 | 31 |
| 20 | B | 34 | 29 | 41 | 25 |
| 21 | B | 29 | 34 | 37 | 29 |
| 22 | B | 25 | 30 | 32 | 26 |
| 23 | A | 27 | 27 | 37 | 28 |

Tabla 19. Datos de las morfometría del callo de elongación.

El estudio morfométrico del callo de elongación mostró un diámetro superior del callo (1cm por encima de la osteotomía) de 31,70 mm de media, con Intervalo de Confianza al 95% entre 27,28 y 36,12 mm, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) el diámetro superior medio fue de 29,60 mm, con Intervalo de Confianza al 95% entre 27,36 y 31,84 mm. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 168).

El estudio morfométrico del callo de elongación mostró un diámetro inferior del callo (1cm por debajo de la osteotomía) de 31,10 mm de media, con Intervalo de Confianza al 95% entre 26,08 y 36,12 mm, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) el diámetro inferior medio fue de 31,40 mm, con Intervalo de Confianza al 95% entre 28,44 y 34,36 mm. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 169).

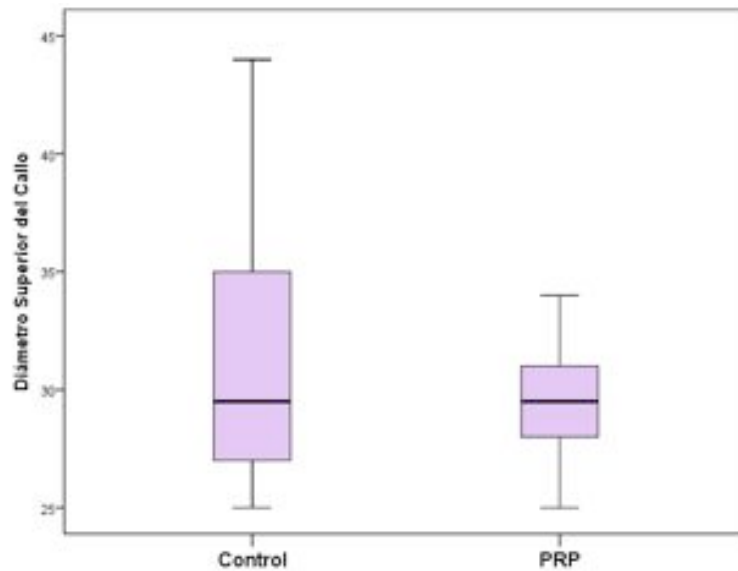


Figura 168. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos del diámetro superior del callo (mm).

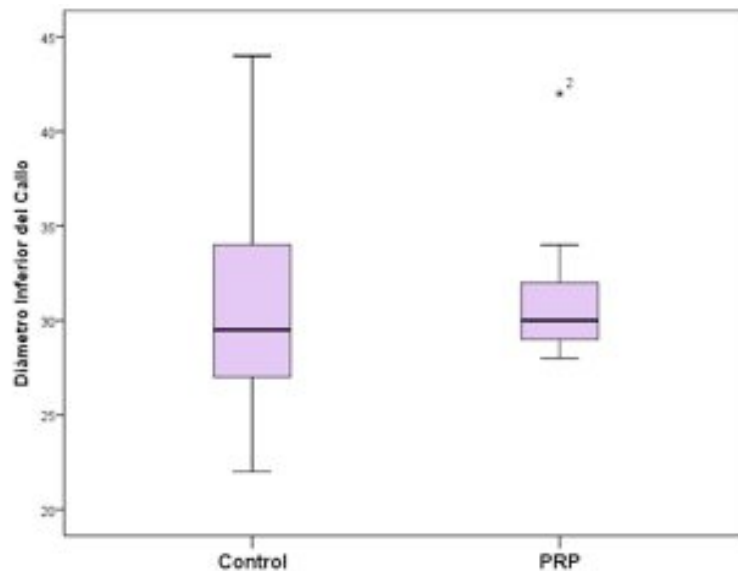


Figura 169. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos del diámetro inferior del callo (mm).

El estudio morfométrico del callo de elongación mostró un diámetro coronal máximo del callo de 41,10 mm de media, con Intervalo de Confianza al 95% entre 36,37 y 45,83 mm, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) el diámetro coronal máximo del callo fue de 38,00 mm, con Intervalo de Confianza al 95% entre 33,72 y 42,28 mm. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 170).

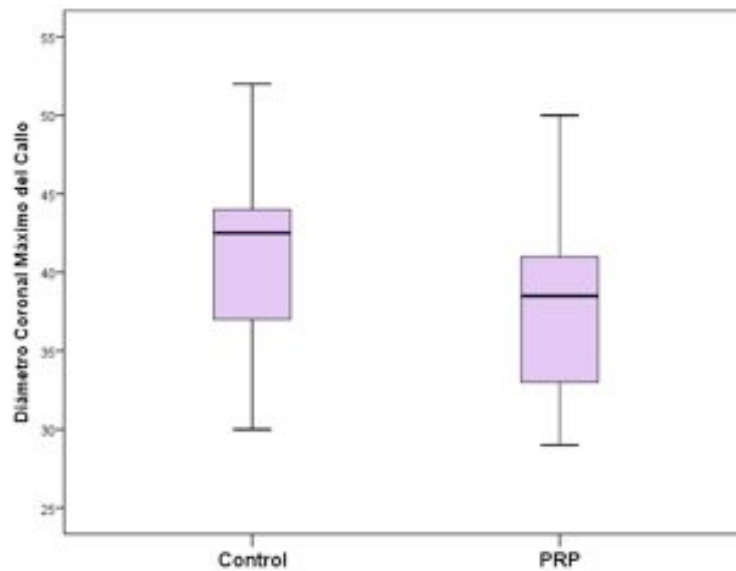


Figura 170. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos del diámetro coronal máximo del callo (mm).

El estudio morfométrico del callo de elongación mostró un diámetro sagital máximo del callo de 27,20 mm de media, con Intervalo de Confianza al 95% entre 25,27 y 29,13 mm, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) el diámetro sagital máximo del callo fue de 28,50 mm, con Intervalo de Confianza al 95% entre 26,65 y 30,35 mm. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 171).

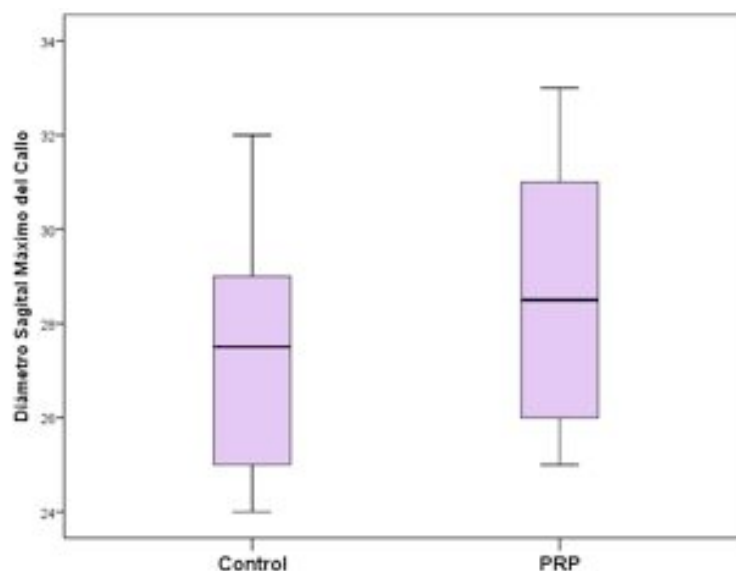


Figura 171. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos del diámetro sagital máximo de callo (mm).

En la Figura 172 y 173 se observan dos ejemplos de estudio morfométrico del callo con Tomografía Computerizada.

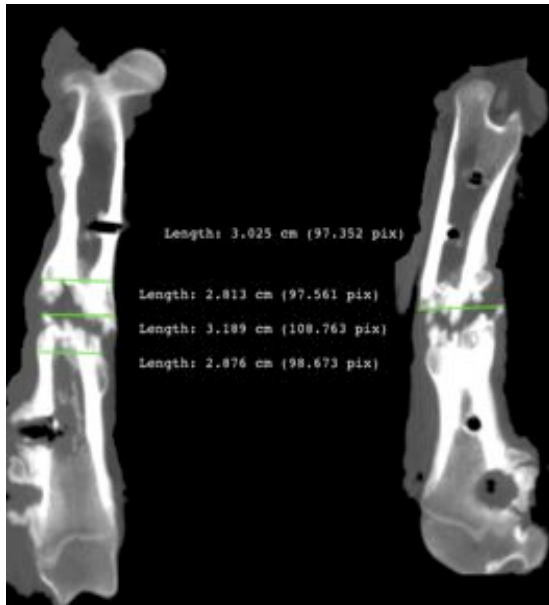


Figura 172. Estudio morfométrico del callo de elongación del caso 16 (Grupo A), con mediciones coronales y sagitales.



Figura 173. Estudio morfométrico del callo de elongación del caso 4 (Grupo B), con mediciones coronales y sagitales.

En la Tabla 20 se muestran los datos recogidos de las áreas de sección del callo de elongación de los casos no excluidos. Posteriormente se expone la estadística descriptiva e inferencial de las variables descritas en la tabla.

| ID | Grupo | Área de sección a 1cm superior de la osteotomía | Área de sección máxima del callo de elongación | Área de sección a 1cm inferior de la osteotomía |
|----|-------|---|--|---|
| 1 | B | 6,33 | 8,22 | 7,1 |
| 2 | B | 6,01 | 7,86 | 6,34 |
| 3 | B | 4,78 | 5,26 | 4,01 |
| 4 | B | 5,21 | 6,34 | 5,36 |
| 5 | B | 5,22 | 7,54 | 6,34 |
| 6 | A | 4,59 | 5,11 | 3,94 |
| 9 | B | 4,68 | 5,18 | 4,43 |
| 10 | A | 6,1 | 7,3 | 6,53 |
| 11 | A | 6,02 | 7,37 | 6,88 |
| 12 | A | 5,88 | 6,59 | 5,88 |
| 13 | A | 6,02 | 7,37 | 6,88 |
| 14 | A | 5,88 | 6,59 | 5,88 |
| 15 | A | 6,54 | 7,26 | 6,65 |
| 16 | A | 5,42 | 6,11 | 5,71 |
| 17 | A | 6,05 | 7,12 | 6,23 |
| 19 | B | 6,63 | 8,27 | 6,75 |
| 20 | B | 6,45 | 7,83 | 6,22 |
| 21 | B | 6,56 | 8,59 | 6,17 |
| 22 | B | 5,89 | 6,97 | 5,86 |
| 23 | A | 5,21 | 6,39 | 5,95 |

Tabla 20. Datos de las áreas de sección del callo de elongación

El estudio morfométrico del callo de elongación mostró un área de sección por encima de la osteotomía de $5,58 \text{ cm}^2$ de media, con Intervalo de Confianza al 95% entre $5,12$ y $6,04 \text{ cm}^2$, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) la media del área de sección por encima del callo fue de $5,79 \text{ cm}^2$, con Intervalo de Confianza al 95% entre $5,28$ y $6,30 \text{ cm}^2$. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 174).

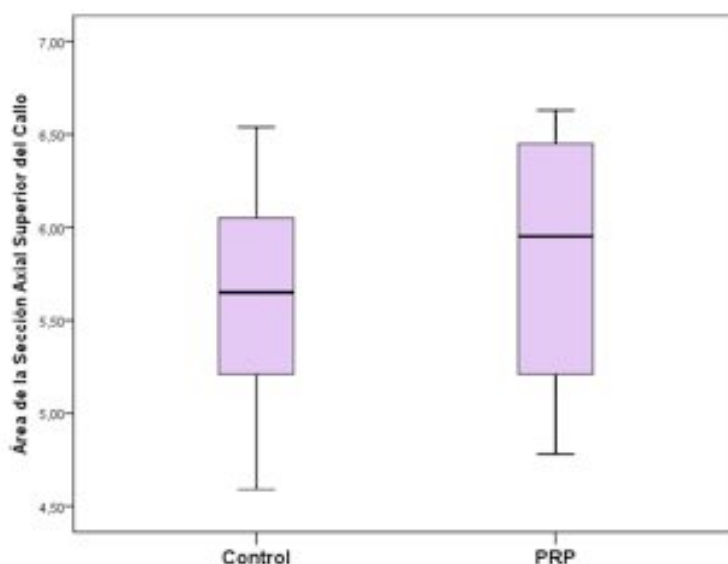


Figura 174. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos del área de sección axial superior del callo (cm^2).

El estudio morfométrico del callo de elongación mostró un área máxima de sección en el callo de $6,41 \text{ cm}^2$ de media, con Intervalo de Confianza al 95% entre $5,80$ y $7,03 \text{ cm}^2$, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) la media del área máxima de sección en el callo fue de $7,29 \text{ cm}^2$, con Intervalo de Confianza al 95% entre $6,50$ y $8,07 \text{ cm}^2$. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 175).

El estudio morfométrico del callo de elongación mostró un área de sección por debajo de la osteotomía de $5,76 \text{ cm}^2$ de media, con Intervalo de Confianza al 95% entre $5,08$ y $6,44 \text{ cm}^2$, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) la media del área de sección por debajo del callo fue de $5,92 \text{ cm}^2$, con Intervalo de Confianza al 95% entre $5,28$ y $6,56 \text{ cm}^2$. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 176).

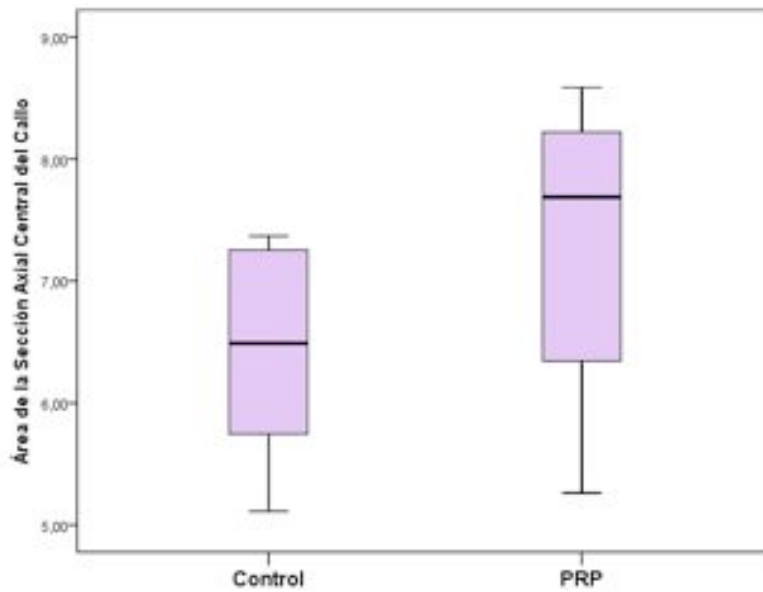


Figura 175. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos del área máxima de sección del callo (cm²).

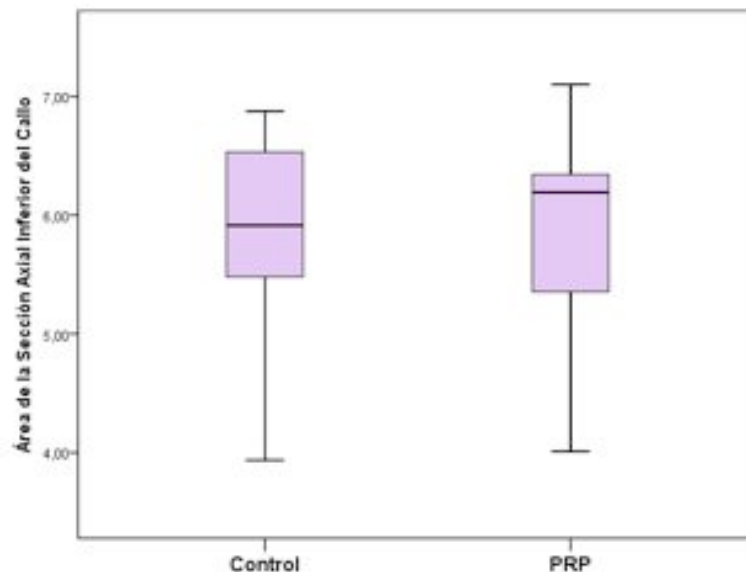


Figura 176. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos del área de sección axial inferior del callo (cm²).

En la Figura 177 y 178 se observan dos ejemplos del estudio de las secciones del callo con Tomografía Computerizada de cada grupo.

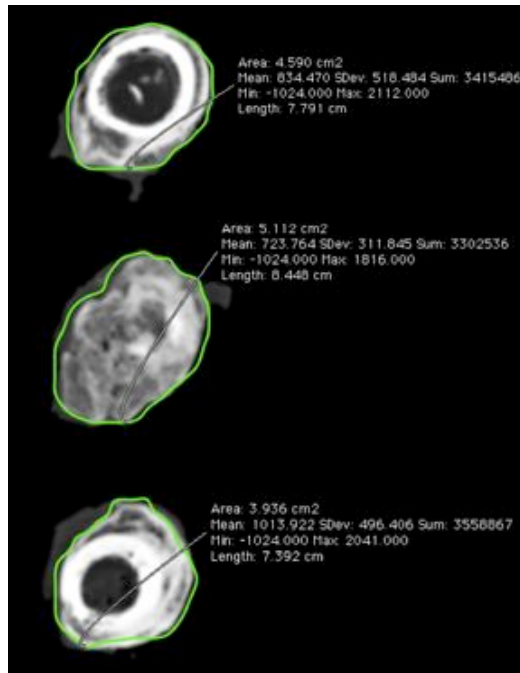


Figura 177. Estudio morfométrico del callo de elongación del caso 6 (grupo A) en el que se observan las distintas áreas de sección estudiadas.

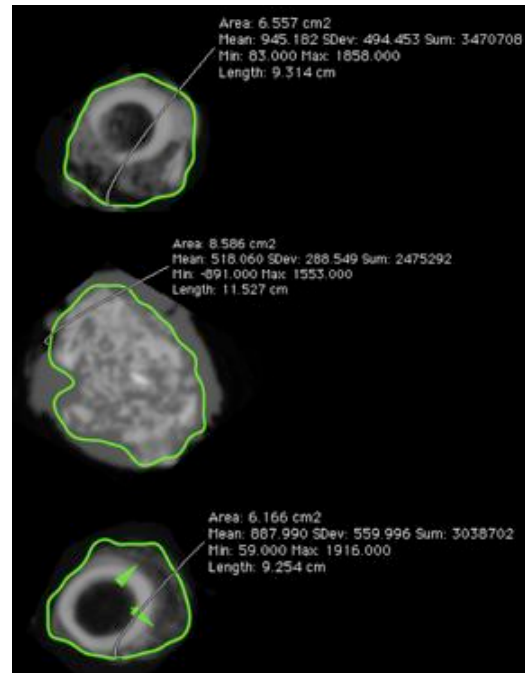


Figura 178. Estudio morfométrico del callo de elongación del caso 21 (grupo B) en el que se observan las distintas áreas de sección estudiadas.

En la Tabla 21 se muestran los registros cualitativos del callo de elongación, la presencia de callo óseo interno, callo circunferencial (0:ausencia, 1:presencia) y el paso de trabéculas por el callo endóstico (escala ordinal de 0 a 3). Posteriormente se expone la estadística descriptiva e inferencial de las variables descritas en la tabla.

| ID | Grupo | Callo medial | Callo circunferencial | Paso de trabéculas por el callo endóstico |
|----|-------|--------------|-----------------------|---|
| 1 | B | 1 | 1 | 0 |
| 2 | B | 1 | 1 | 1 |
| 3 | B | 1 | 1 | 3 |
| 4 | B | 1 | 1 | 3 |
| 5 | B | 1 | 1 | 0 |
| 6 | A | 1 | 1 | 3 |
| 9 | B | 1 | 1 | 0 |
| 10 | A | 0 | 1 | 0 |
| 11 | A | 0 | 1 | 0 |
| 12 | A | 1 | 1 | 3 |
| 13 | A | 1 | 1 | 0 |
| 14 | A | 1 | 1 | 2 |
| 15 | A | 1 | 1 | 2 |
| 16 | A | 0 | 1 | 0 |
| 17 | A | 1 | 1 | 1 |
| 19 | B | 1 | 1 | 0 |
| 20 | B | 1 | 1 | 1 |
| 21 | B | 1 | 1 | 2 |
| 22 | B | 0 | 0 | 0 |
| 23 | A | 1 | 1 | 2 |

Tabla 21. Registros categóricos del callo de elongación.

De los 10 casos del grupo A (Control) 7 presentan un claro callo perióstico mineralizado en la zona interna o medial. Mientras que en el grupo B (PRP) de los 10 casos 9 presentan claro desarrollo del callo mineralizado en la zona medial (Figura 179). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el test de Chi-Cuadrado ($p>0,05$).

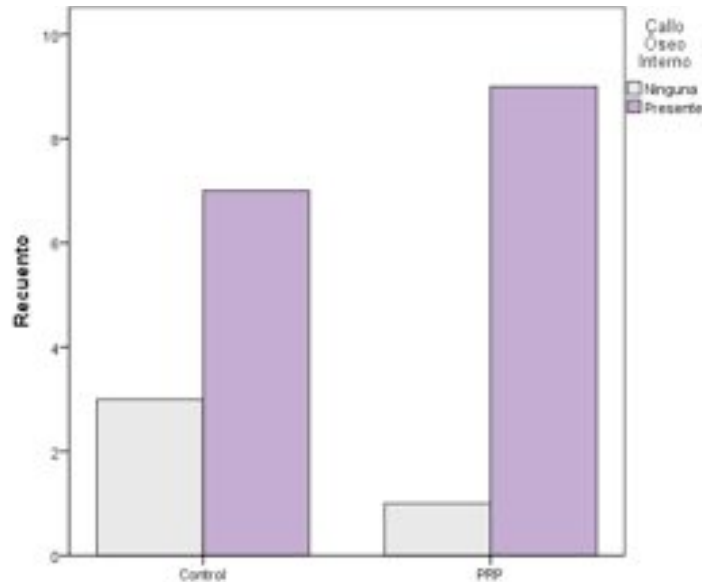


Figura 179. Gráfico de Barras que muestra la presencia por grupos de Callo Óseo Interno.

De los 10 casos del grupo A (Control) 10 presentan un callo perióstico circunferencial no necesariamente mineralizado. Mientras que en el grupo B (PRP) de los 10 casos 9 presentan dicho callo perióstico circunferencial (Figura 180). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el test de Chi-Cuadrado ($p>0,05$).

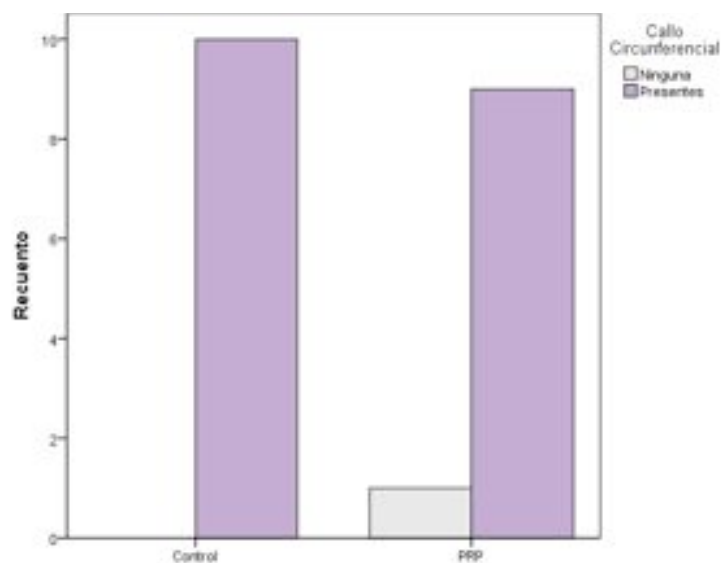


Figura 180. Gráfico de Barras que muestra la presencia por grupos de Callo Circunferencial.

De los 10 casos del grupo A (Control) 4 no presentan ningún paso de trabéculas por la zona central del callo de elongación. En 1 caso hay paso de escasas trabéculas. En 3 casos hay un paso moderado de trabéculas y en 2 casos paso de abundantes trabéculas. En el grupo B (PRP) de los 10 casos 5 no presentan ningún paso de trabéculas por la zona central del callo de elongación. En 2 casos hay paso de escasas trabéculas. En 1 caso hay un paso moderado de trabéculas y en 2 casos paso de abundantes trabéculas (Figura 181). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en las pruebas estadísticas no paramétricas (Prueba U de Mann-Whitney con $p > 0,05$).

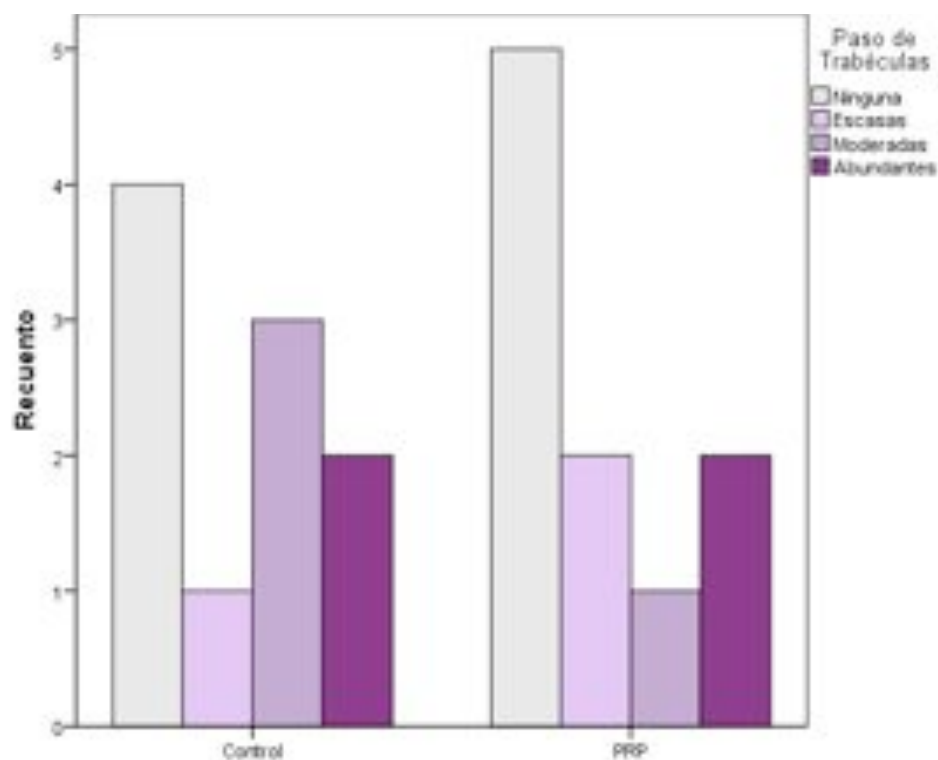


Figura 181. Gráfico de Barras que muestra la presencia por grupos de paso de trabéculas por la zona central del callo.

En las Figuras de 182 a 185 se observan 4 casos pertenecientes a los dos grupos con distintas características cualitativas del callo de elongación.

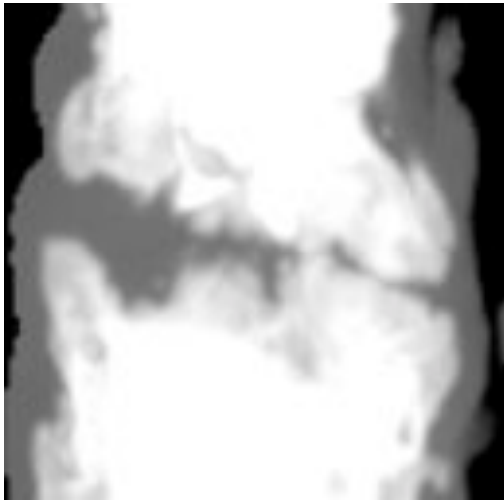


Figura 182. Estudio de TC del caso 13 (Grupo A), en el que destaca la presencia de callo medial, ausencia de paso de trabéculas y algo de callo circunferencial.

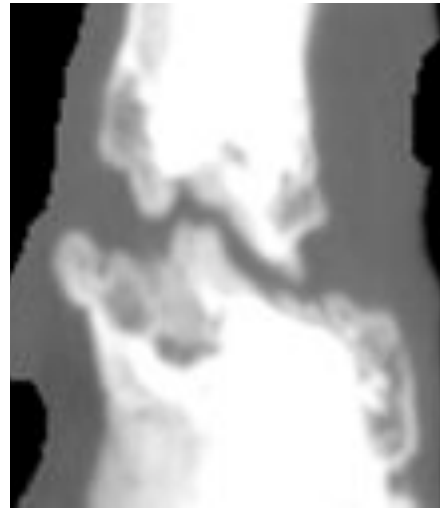


Figura 183. Estudio de TC del caso 22 (Grupo B), en el que destaca la ausencia de callo medial, de paso de trabéculas y de callo circunferencial.

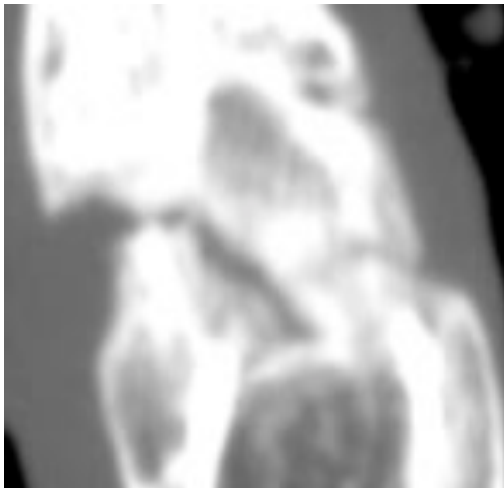


Figura 184. Estudio de TC del caso 17 (Grupo A), en el que destaca presencia de callo medial, paso escaso de trabéculas y ausencia de callo circunferencial.

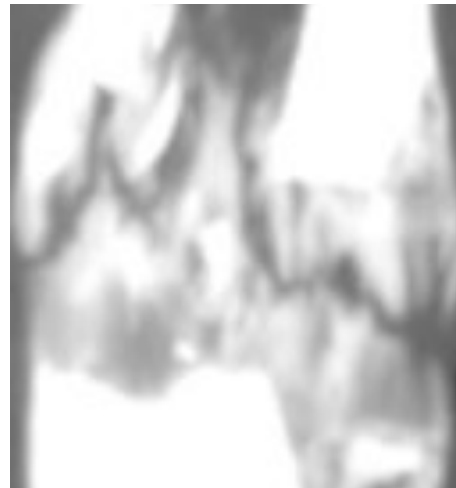


Figura 185. Estudio de TC del caso 21 (Grupo B), en el que destaca la presencia de callo medial, de paso moderado de trabéculas y de callo circunferencial.

5.3. Estudio de densidad en UH del callo de elongación

En la Tabla 22 se describen los datos del estudio de densidad ósea en Unidades Hounsfield (UH) del callo de elongación, en la sección axial del callo y en las secciones coronales del tercio medio, central y externo.

| ID | Grupo | Densidad global axial del callo (UH) | Densidad coronal tercio interno (UH) | Densidad coronal tercio central (UH) | Densidad coronal tercio externo (UH) |
|----|-------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | B | 409 | 529 | 508 | 588 |
| 2 | B | 483 | 551 | 566 | 464 |
| 3 | B | 630 | 792 | 517 | 183 |
| 4 | B | 981 | 1089 | 622 | 1326 |
| 5 | B | 438 | 472 | 635 | 511 |
| 6 | A | 719 | 952 | 580 | 560 |
| 9 | B | 487 | 260 | 470 | 827 |
| 10 | A | 217 | 177 | 185 | 296 |
| 11 | A | 226 | 252 | 70 | 55 |
| 12 | A | 505 | 372 | 573 | 482 |
| 13 | A | 318 | 700 | 268 | 268 |
| 14 | A | 647 | 890 | 290 | 435 |
| 15 | A | 592 | 790 | 618 | 446 |
| 16 | A | 482 | 293 | 248 | 334 |
| 17 | A | 515 | 754 | 755 | 357 |
| 19 | B | 661 | 721 | 667 | 231 |
| 20 | B | 693 | 1044 | 401 | 684 |
| 21 | B | 476 | 409 | 580 | 580 |
| 22 | B | 350 | 270 | 206 | 270 |
| 23 | A | 782 | 828 | 579 | 652 |

Tabla 22. Datos del estudio de densidad ósea del callo de elongación.

El estudio de densidad ósea del callo de elongación presenta una densidad media en la sección axial del callo de 500,30 UH, con Intervalo de Confianza al 95% entre 359,95 y 640,65 UH, en el grupo A (Control). En el grupo B (PRP) la densidad media del callo en sección axial es de 560,80 UH, con Intervalo de Confianza al 95% entre 428,01 y 693,59 UH. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 186).

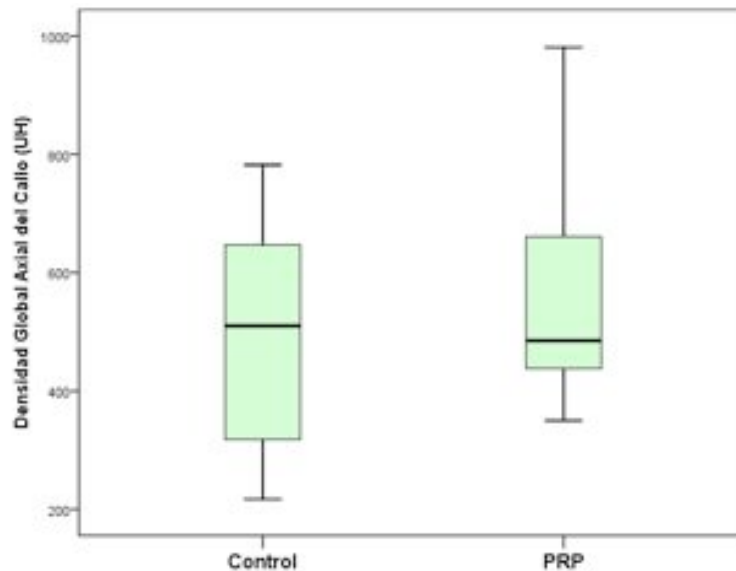


Figura 186. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos de la densidad global axial del callo (UH).

El estudio de densidad ósea del callo de elongación presenta una densidad media en el tercio interno en sección coronal del callo de 600,80 UH, con Intervalo de Confianza al 95% entre 390,74 y 810,86 UH, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) la densidad media del callo en el tercio interno de la sección es de 613,70 UH, con Intervalo de Confianza al 95% entre 404,36 y 823,04 UH. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 187).

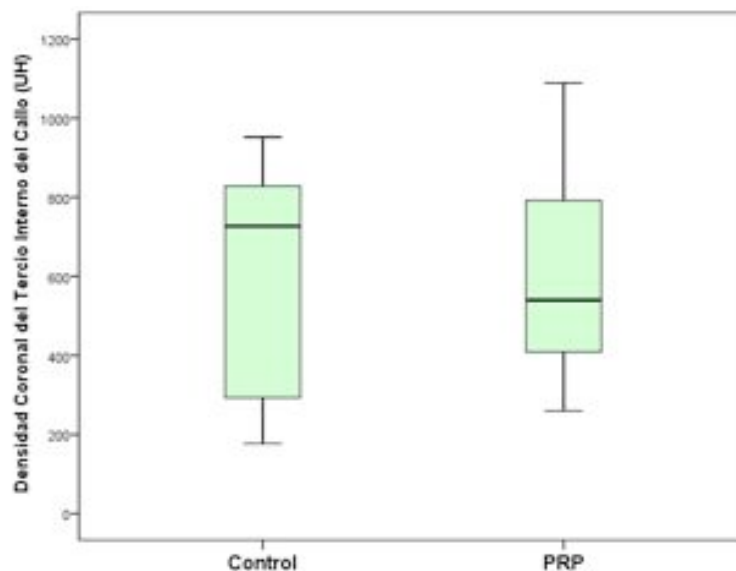


Figura 187. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos de la densidad coronal del tercio interno del callo (UH).

El estudio de densidad ósea del callo de elongación presenta una densidad media en el tercio central en sección coronal del callo de 416,60 UH, con Intervalo de Confianza al 95% entre 252,62 y 580,58 UH, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) la

densidad media del callo en el tercio central de la sección es de 517,20 UH, con Intervalo de Confianza al 95% entre 419,96 y 614,44 UH. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 188).

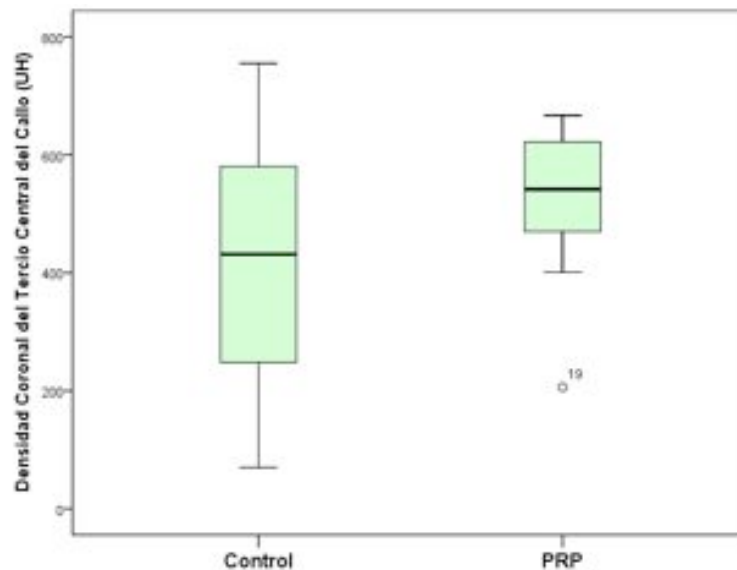


Figura 188. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos de la densidad coronal del tercio central del callo (UH).

El estudio de densidad ósea del callo de elongación presenta una densidad media en el tercio externo en sección coronal del callo de 388,50 UH, con Intervalo de Confianza al 95% entre 268,96 y 508,04 UH, en el grupo A (Control). En el grupo B (con PRP) la densidad media del callo en el tercio externo de la sección es de 566,40 UH, con Intervalo de Confianza al 95% entre 325,54 y 807,26 UH. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba T con $p > 0,05$) (Figura 189).

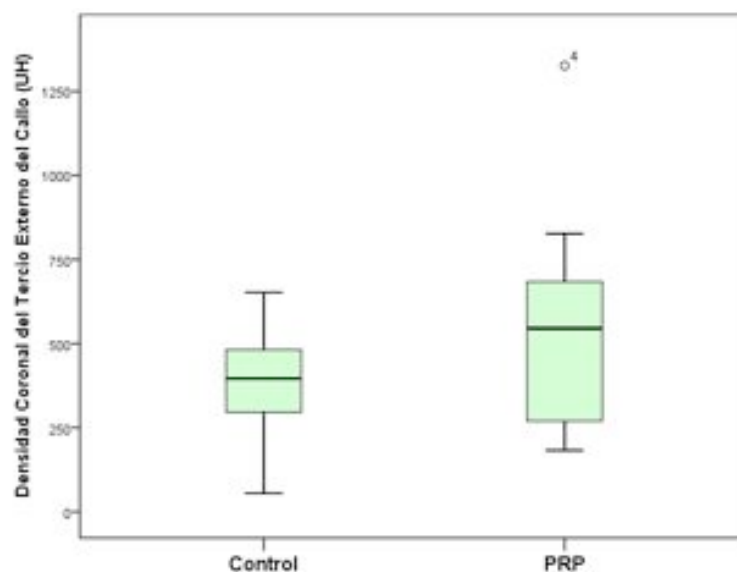


Figura 189. Gráfico BoxPlot de la distribución por grupos de la densidad coronal del tercio externo del callo (UH).

6. ESTUDIO DE HISTOLOGÍA SIMPLE

6.1. Estudio histológico descriptivo del callo

En la Tabla 23 se muestran los valores de la cuantificación celular por zonas en los casos no excluidos. Posteriormente se exponen los resultados estadísticos descriptivos e inferenciales.

| ID | Grupo | Osteoblastos en Z1 | Osteoblastos en Z2 | Osteoblastos en Z3 | Osteoclastos en Z1 | Osteoclastos en Z2 | Osteoclastos en Z3 |
|----|-------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | B | 584 | 424 | 220 | 2 | 2 | 74 |
| 2 | B | 678 | 604 | 680 | 8 | 28 | 2 |
| 3 | B | 340 | 732 | 498 | 14 | 36 | 0 |
| 4 | B | 394 | 516 | 442 | 2 | 6 | 10 |
| 5 | B | 414 | 494 | 626 | 2 | 12 | 0 |
| 6 | A | 424 | 558 | 356 | 6 | 8 | 0 |
| 9 | B | 608 | 920 | 510 | 2 | 4 | 8 |
| 10 | A | 578 | 746 | 428 | 8 | 0 | 0 |
| 11 | A | 464 | 576 | 320 | 12 | 12 | 0 |
| 12 | A | 614 | 856 | 576 | 6 | 0 | 0 |
| 13 | A | 710 | 434 | 430 | 12 | 4 | 0 |
| 14 | A | 548 | 842 | 878 | 4 | 12 | 0 |
| 15 | A | 698 | 860 | 592 | 8 | 0 | 0 |
| 16 | A | 758 | 556 | 372 | 14 | 6 | 0 |
| 17 | A | 616 | 682 | 528 | 14 | 10 | 2 |
| 19 | B | 490 | 638 | 604 | 4 | 6 | 0 |
| 20 | B | 446 | 550 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 21 | B | 530 | 750 | 662 | 4 | 4 | 0 |
| 22 | B | 630 | 562 | 360 | 2 | 0 | 0 |
| 23 | A | 348 | 540 | 582 | 6 | 6 | 4 |

Tabla 23. Datos de la cuantificación celular por zonas.

En la zona más adyacente a la cortical (Z1) la cuantificación de osteoblastos a 10 campos de HPF (40x) en el grupo A (Control) fue de 575 osteoblastos de media, con un Intervalo de Confianza al 95% de 481 a 670 osteoblastos. En el grupo B (PRP) la cuantificación media fue de 511 osteoblastos, con un Intervalo de Confianza al 95% de 430 a 591 osteoblastos (Figura 190). No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (prueba T con $p > 0,05$).

En la zona intermedia (Z2) la cuantificación de osteoblastos a 10 campos de HPF (40x) en el grupo A (Control) fue de 665 osteoblastos de media, con un Intervalo de Confianza al 95% de 554 a 775 osteoblastos. En el grupo B (PRP) la cuantificación media fue de 619 osteoblastos, con un Intervalo de Confianza al 95% de 514 a 723 osteoblastos

(Figura 191). No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (prueba T con $p > 0,05$).

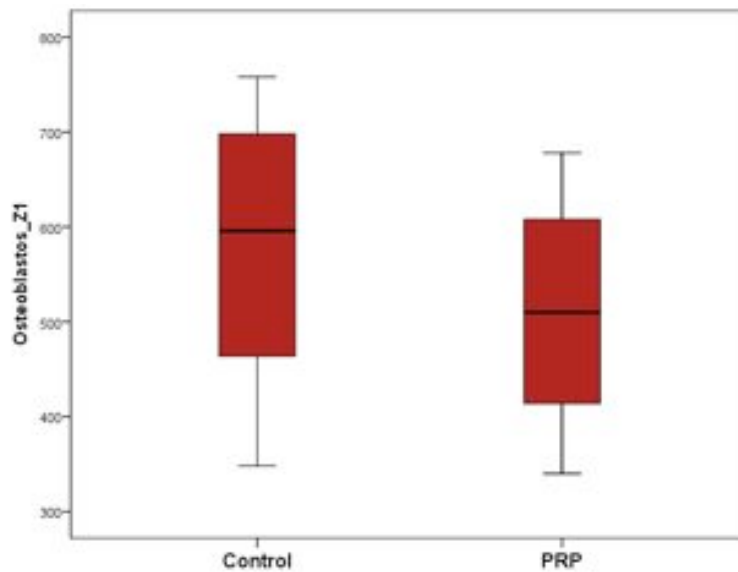


Figura 190. Gráfico Box-Plot que muestra la distribución por grupos de la cuantificación de osteoblastos en Z1.

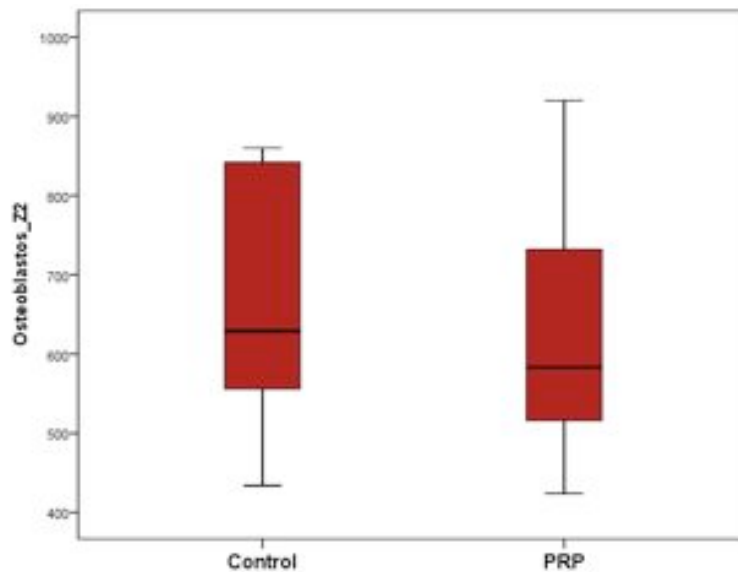


Figura 191. Gráfico Box-Plot que muestra la distribución por grupos de la cuantificación de osteoblastos en Z2.

En la zona más central del callo (Z3) la cuantificación de osteoblastos a 10 campos de HPF (40x) en el grupo A (Control) fue de 506 osteoblastos de media, con un Intervalo de Confianza al 95% de 388 a 623 osteoblastos. En el grupo B (PRP) la cuantificación media fue de 460 osteoblastos, con un Intervalo de Confianza al 95% de 305 a 614 osteoblastos (Figura 192). No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (prueba T con $p > 0,05$).

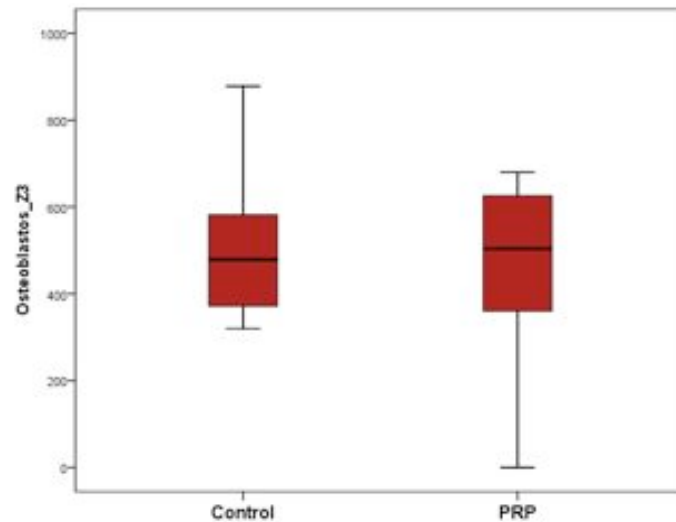


Figura 192. Gráfico Box-Plot que muestra la distribución por grupos de la cuantificación de osteoblastos en Z3.

En la zona más adyacente a la cortical (Z1) la cuantificación de osteoclastos a 10 campos de HPF (40x) en el grupo A (Control) fue de 9 osteoclastos de media, con un Intervalo de Confianza al 95% de 6,37 a 11,63 osteoclastos. En el grupo B (PRP) la cuantificación media fue de 4 osteoclastos, con un Intervalo de Confianza al 95% de 1 a 6,9 osteoclastos (Figura 193). Se evidenció un mayor número de osteoclastos en el grupo A (Control) que en el B (PRP), con diferencias estadísticamente significativas (prueba T con $p < 0,05$).

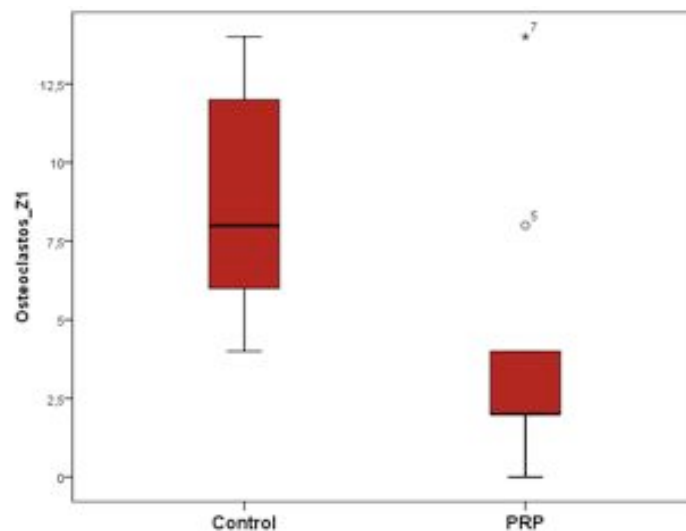


Figura 193. Gráfico Box-Plot que muestra la distribución por grupos de la cuantificación de osteoclastos en Z1.

En la zona intermedia (Z2) la cuantificación de osteoclastos a 10 campos de HPF (40x) en el grupo A (Control) fue de 5,8 osteoclastos de media, con un Intervalo de Confianza al 95% de 2,4 a 9,4 osteoclastos. En el grupo B (PRP) la cuantificación media fue de 9,90 osteoclastos, con un Intervalo de Confianza al 95% de 1,1 a 18,6 osteoclastos

(Figura 194). No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (prueba T con $p > 0,05$).

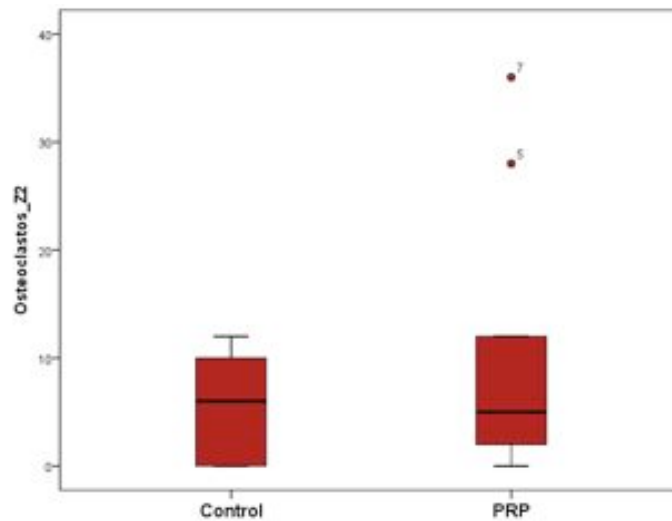


Figura 194. Gráfico Box-Plot que muestra la distribución por grupos de la cuantificación de osteoclastos en Z2.

En la zona más central del callo (Z3) la cuantificación de osteoclastos a 10 campos de HPF (40x) en el grupo A (Control) fue de 0,6 osteoclastos de media, con un Intervalo de Confianza al 95% de 0 a 1,6 osteoclastos. En el grupo B (PRP) la cuantificación media fue de 9,4 osteoclastos, con un Intervalo de Confianza al 95% de 0 a 72 osteoclastos (Figura 195). La mediana en ambos grupos era de 0 osteoclastos. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (prueba T con $p > 0,05$).

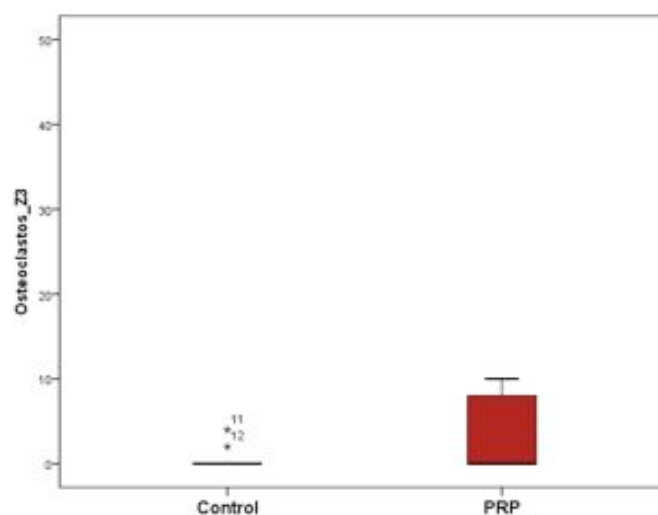


Figura 195. Gráfico Box-Plot que muestra la distribución por grupos de la cuantificación de osteoclastos en Z3.

En las Figuras 196 a 199 se observan imágenes histológicas de este estudio relacionadas con la cuantificación celular.

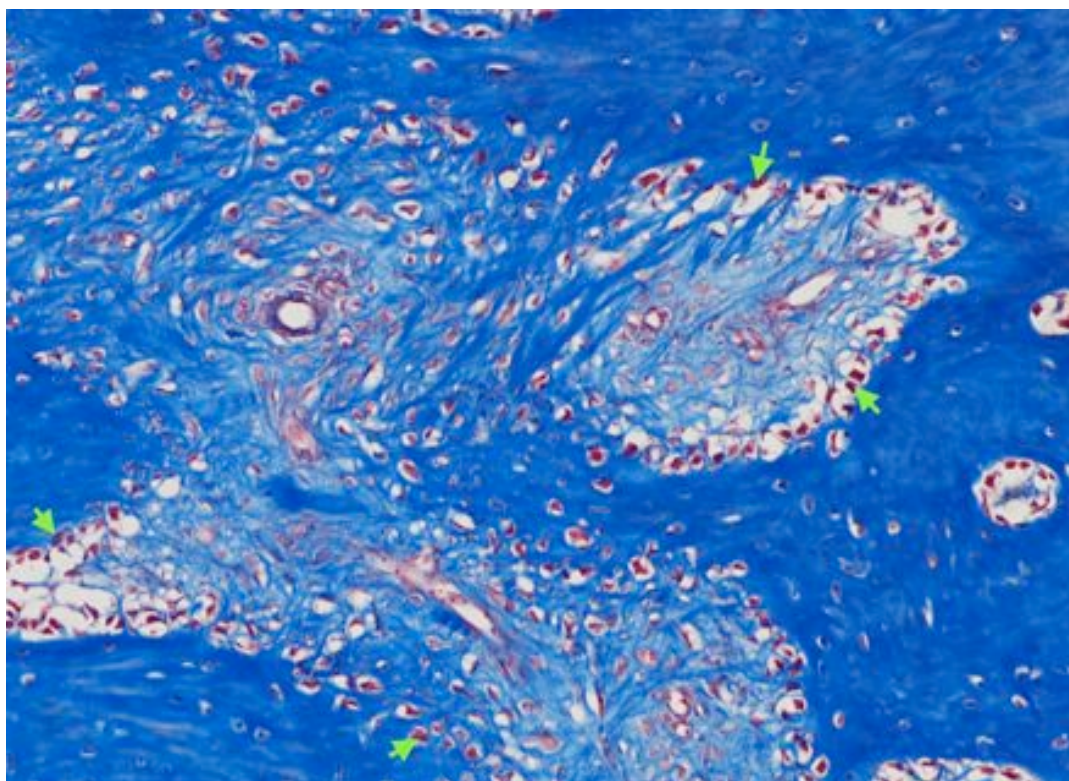


Figura 196. Histología de la cuantificación de osteoblastos en la Z2 del caso 15, las flechas verdes marcan algunos de los osteoblastos cuantificados (Tricrómico de Masson a 10x).

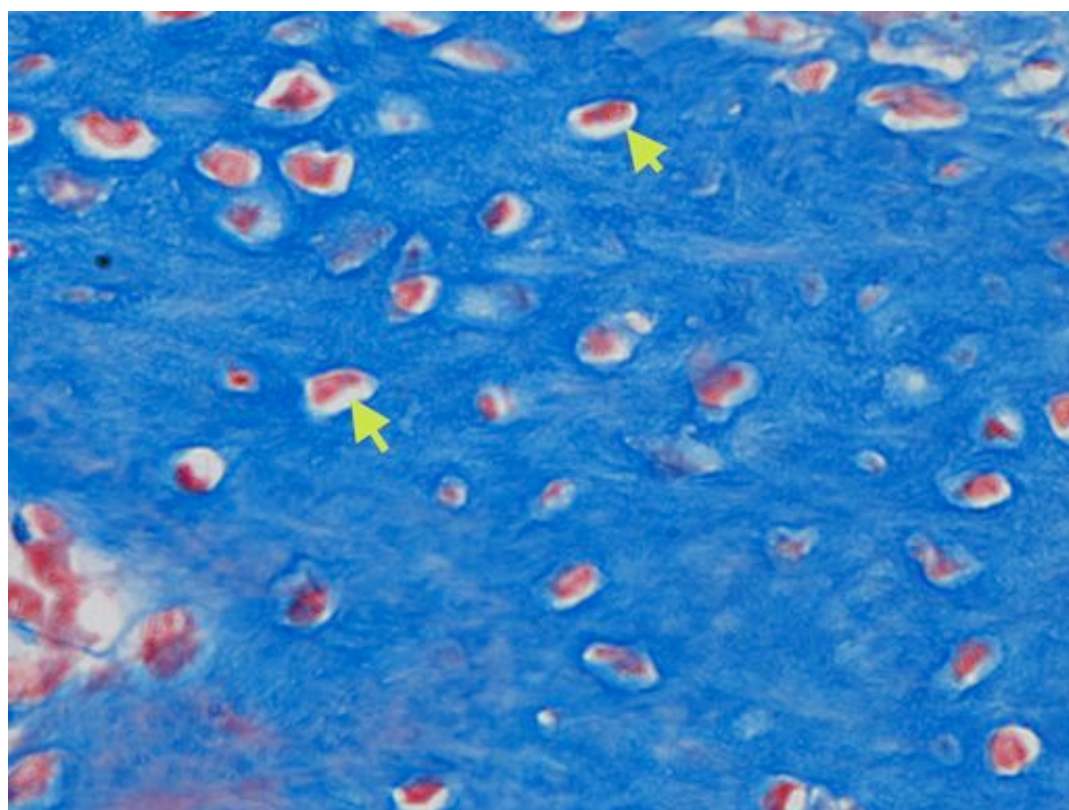


Figura 197. Histología de la cuantificación de osteoblastos en Z2 del caso 16, las flechas verdes marcan dos osteoblastos en el interior del osteoide (Tricrómico de Masson a 40x).

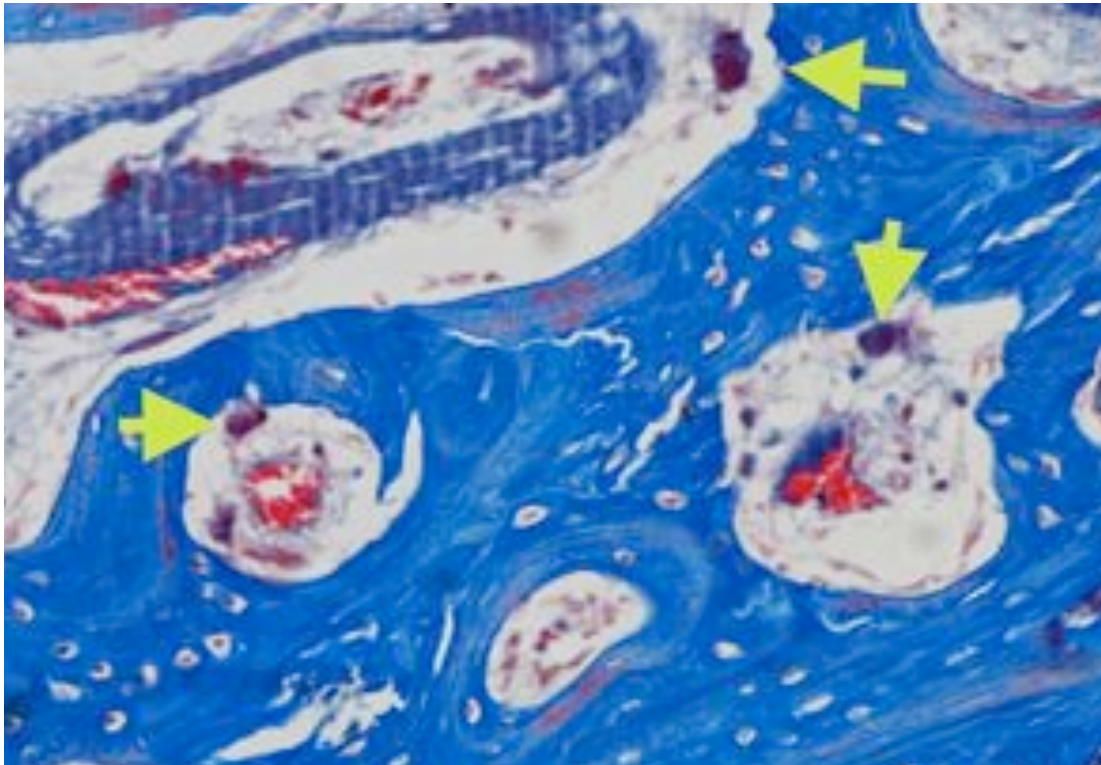


Figura 198. Histología de cuantificación de los osteoclastos en Z3 del caso 16, las flechas verdes marcan la posición de algunos osteoclastos (Tricrómico de Masson a 10x).

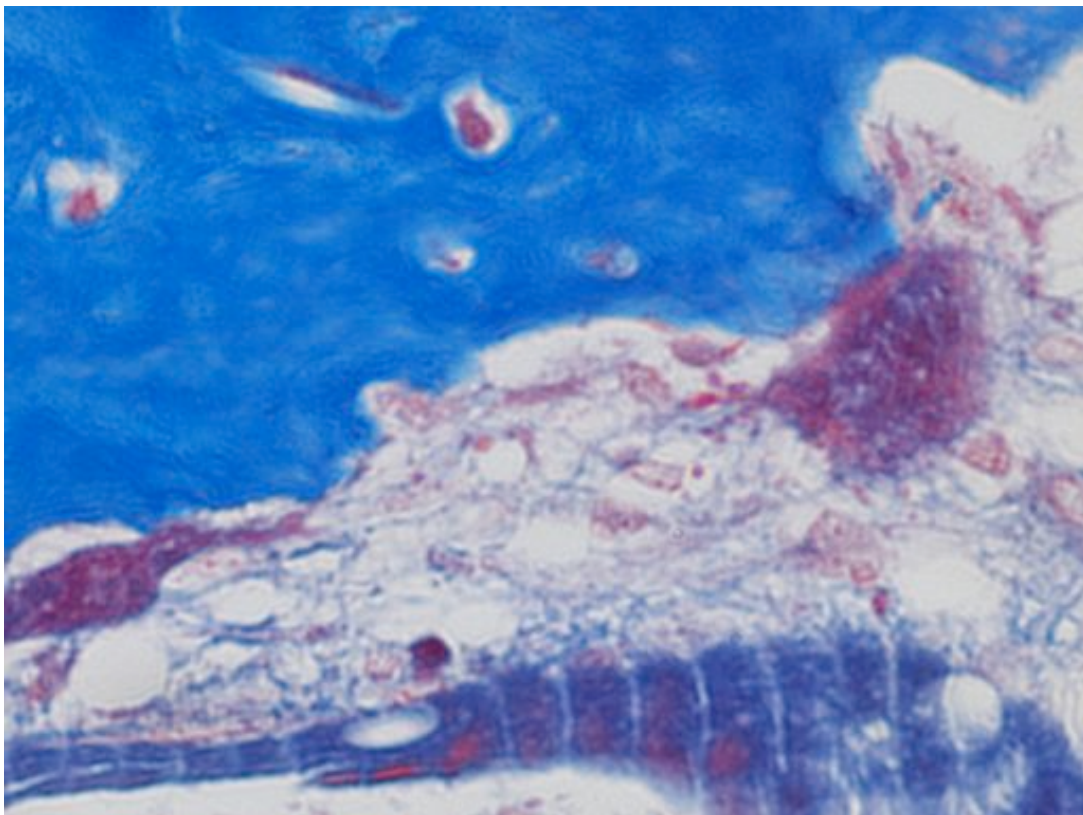


Figura 199. Detalle de histología de cuantificación de osteoclastos en Z2 del caso 16 donde se puede observar un osteoclasto adherido a la trabécula (Tricrómico de Masson a 60x).

En la Tabla 24 se muestran los valores de la cuantificación de nuevos vasos por zonas del callo en los casos no excluidos. Posteriormente se exponen los resultados estadísticos descriptivos e inferenciales.

| ID | Grupo | Luces vasculares en Z1 | Luces vasculares en Z2 | Luces vasculares en Z3 |
|----|-------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | B | 31 | 58 | 46 |
| 2 | B | 30 | 54 | 6 |
| 3 | B | 48 | 54 | 11 |
| 4 | B | 38 | 20 | 38 |
| 5 | B | 32 | 24 | 18 |
| 6 | A | 44 | 60 | 50 |
| 9 | B | 24 | 40 | 24 |
| 10 | A | 38 | 84 | 44 |
| 11 | A | 34 | 54 | 106 |
| 12 | A | 26 | 46 | 52 |
| 13 | A | 54 | 27 | 26 |
| 14 | A | 42 | 70 | 50 |
| 15 | A | 44 | 32 | 42 |
| 16 | A | 32 | 58 | 50 |
| 17 | A | 34 | 40 | 32 |
| 19 | B | 30 | 24 | 22 |
| 20 | B | 28 | 52 | 56 |
| 21 | B | 26 | 74 | 54 |
| 22 | B | 8 | 25 | 46 |
| 23 | A | 32 | 28 | 24 |

Tabla 24. Datos de la cuantificación de vasos por zona.

En la zona más adyacente a la cortical (Z1) la cuantificación de luces vasculares a 10 campos de HPF (40x) en el grupo A (Control) fue de 38 luces vasculares de media, con un Intervalo de Confianza al 95% de 32 a 43,8 luces vasculares. En el grupo B (PRP) la cuantificación media fue de 29,5 luces vasculares, con un Intervalo de Confianza al 95% de 22,2 a 36,8 luces vasculares (Figura 200). El grupo A (Control) mostró un mayor número de luces vasculares en la zona Z1 en comparación con el grupo B (PRP), sin llegar a mostrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (prueba T con $p>0,05$).

En la zona intermedia (Z2) la cuantificación de luces vasculares a 10 campos de HPF (40x) en el grupo A (Control) fue de 50 luces vasculares de media, con un Intervalo de Confianza al 95% de 36,4 a 63,4 luces vasculares. En el grupo B (PRP) la cuantificación media fue de 42,5 luces vasculares, con un Intervalo de Confianza al 95% de 29,2 a 55,8 luces vasculares (Figura 201). No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (prueba T con $p>0,05$).

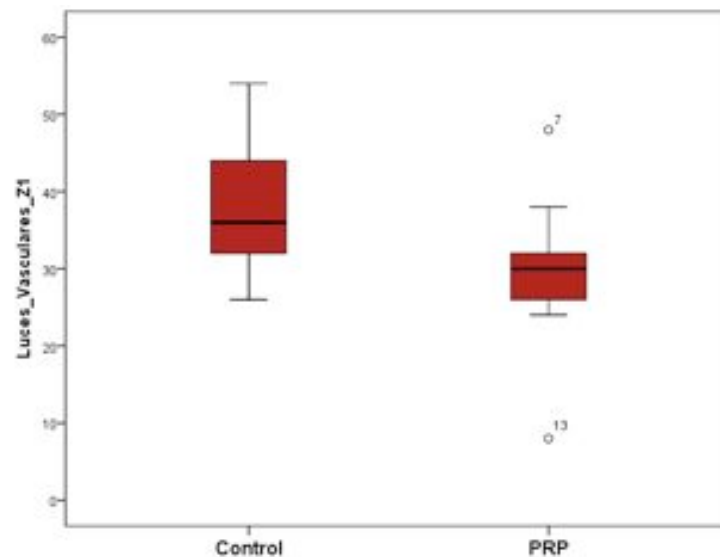


Figura 200. Gráfico Box-Plot que muestra la distribución por grupos de la cuantificación de luces vasculares en Z1.

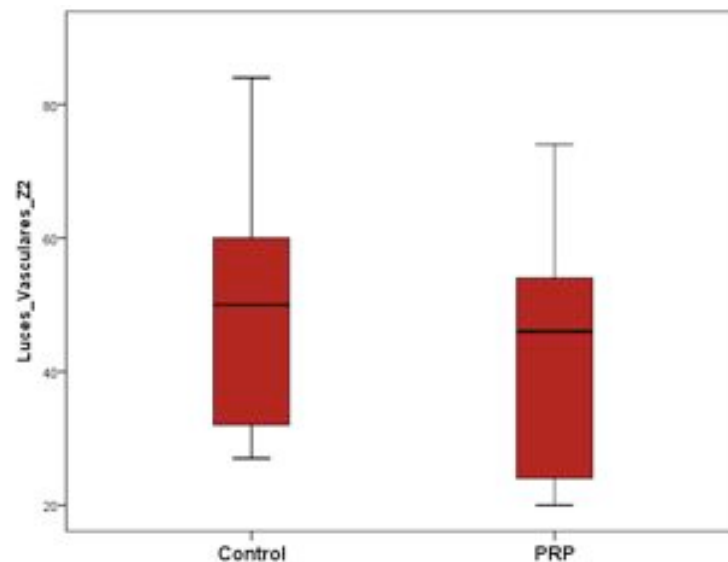


Figura 201. Gráfico Box-Plot que muestra la distribución por grupos de la cuantificación de luces vasculares en Z2.

En la zona más central del callo (Z3) la cuantificación de luces vasculares a 10 campos de HPF (40x) en el grupo A (Control) fue de 47,6 luces vasculares de media, con un Intervalo de Confianza al 95% de 31,1 a 64 luces vasculares. En el grupo B (PRP) la cuantificación media fue de 32 luces vasculares, con un Intervalo de Confianza al 95% de 19 a 45 luces vasculares (Figura 202). No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (prueba T con $p > 0,05$).

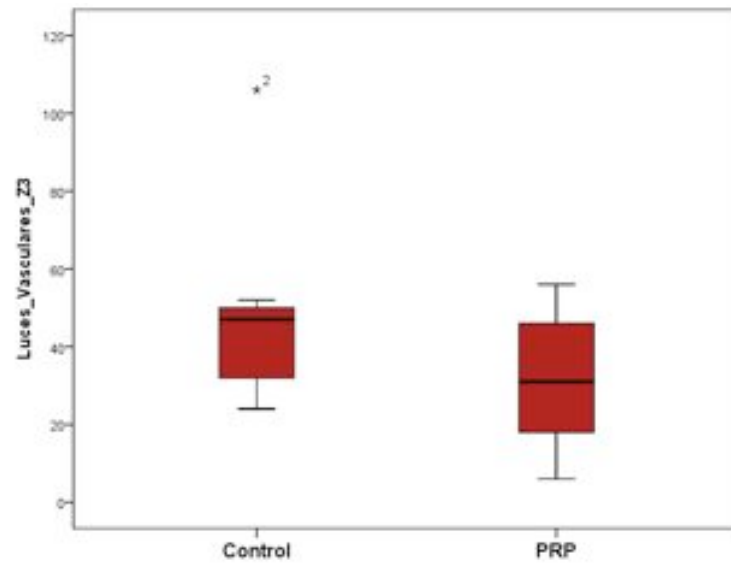


Figura 202. Gráfico Box-Plot que muestra la distribución por grupos de la cuantificación de luces vasculares en Z3.

En las Figuras 203 y 204 se observan imágenes histológicas de este estudio relacionadas con la cuantificación de luces vasculares.

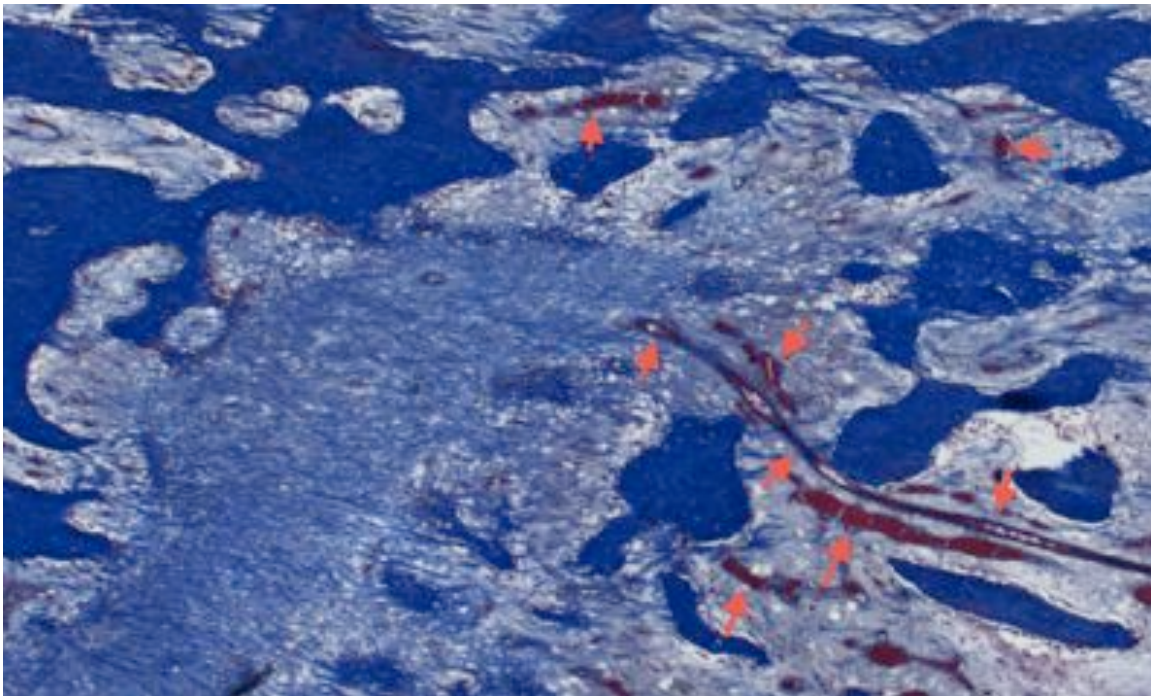


Figura 203. Histología de la cuantificación de luces vasculares en la que se encuentran marcadas con flecha roja algunas luces vasculares en Z3 del caso 4 (Tricrómico de Masson a 2x).

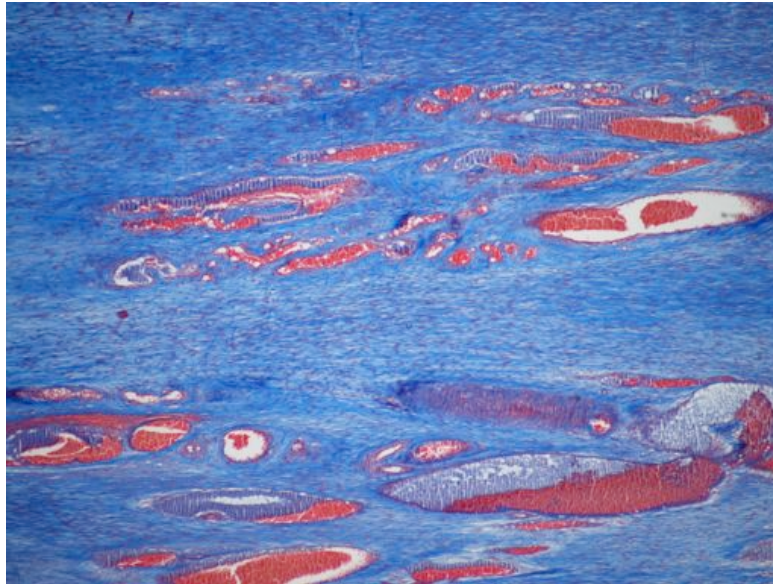


Figura 204. Detalle de la histología para cuantificación de luces vasculares en Z3 del caso 6 (Tricrómico de Masson a 4x).

En la Tabla 25 se muestran los valores de la variable ordinal que expresa la presencia de tejido fibroso y cartílago por zonas del callo (0: ausencia, 1: presencia). También se expresa el tipo de osificación predominante en el callo (1: endocondral, 2: intramembranosa, 3: mixta). Posteriormente se exponen los resultados estadísticos descriptivos e inferenciales.

| ID | Grupo | Tejido fibroso en Z1 | Tejido fibroso en Z2 | Tejido fibroso en Z3 | Cartílago en Z1 | Cartílago en Z2 | Cartílago en Z3 | Tipo de osificación predominante |
|----|-------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------------|
| 1 | B | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| 2 | B | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 3 | B | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 |
| 4 | B | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 5 | B | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 6 | A | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 9 | B | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 10 | A | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 11 | A | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 12 | A | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 13 | A | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 14 | A | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 15 | A | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 16 | A | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 17 | A | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 19 | B | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 |
| 20 | B | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 21 | B | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 |
| 22 | B | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 23 | A | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |

Tabla 25. Datos de la presencia de tejido fibroso y cartílago por zona del callo.

El estudio del tejido fibroso en la zona más proximal a las corticales (Z1) mostró ausencia en los 10 casos del grupo A (Control) y en 9 del grupo B (PRP) (Figura 205). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de esta variable (Chi-cuadrado con $p > 0,05$).

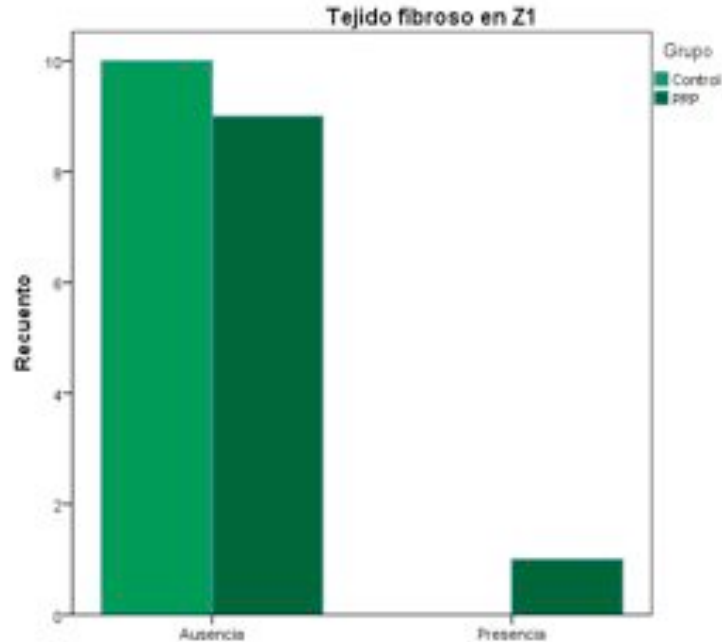


Figura 205. Distribución de la ausencia de tejido fibroso por grupos en Z1.

El estudio del tejido fibroso en la zona intermedia (Z2) mostró ausencia idéntica en ambos grupos A (Control) y B (PRP), con 4 casos de ausencia y 6 de presencia de tejido fibroso (Figura 206 y 207).

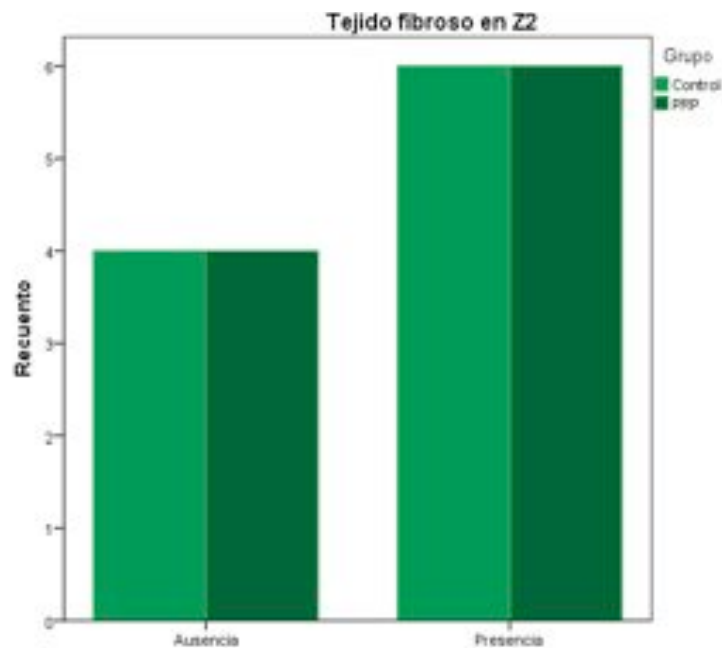


Figura 206. Distribución de la presencia de tejido fibroso por grupos en Z2.

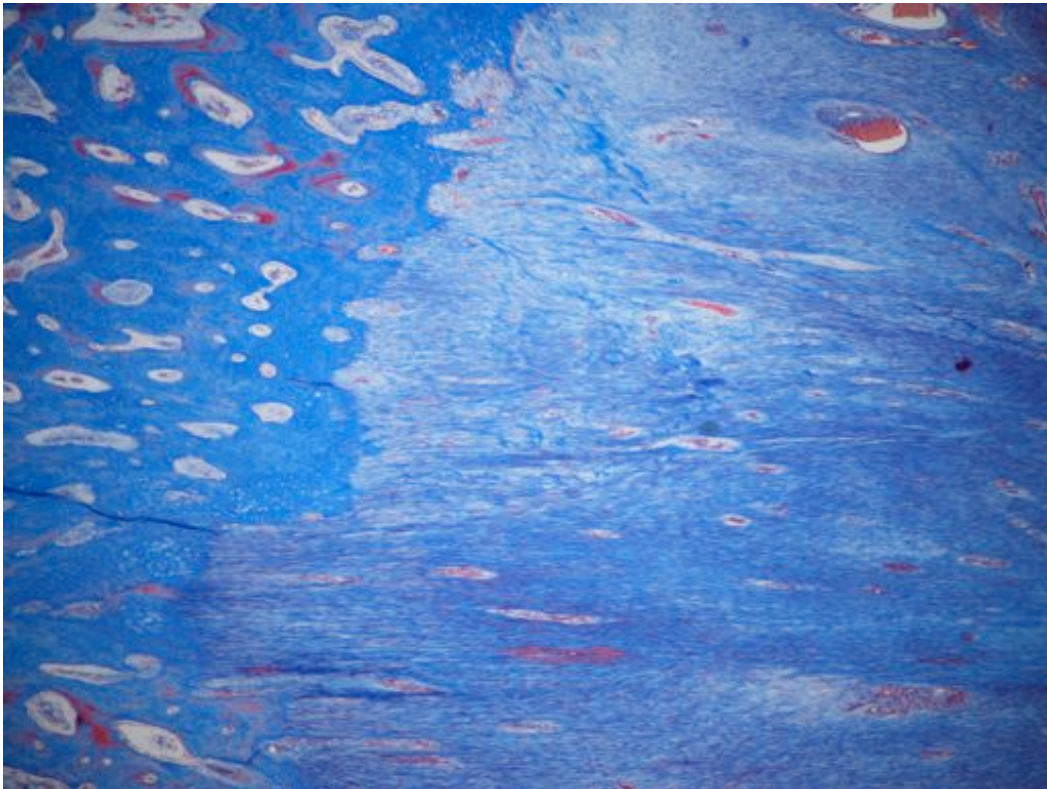


Figura 207. Histología que muestra la abundante tejido fibroso en Z2 y Z3 del caso 10 (Tricrómico de Masson a 2x).

El estudio del tejido fibroso en la zona medial del callo (Z3) mostró idéntica distribución en los dos grupos, con presencia de tejido fibroso en todos los casos (Figura 208 y 209).

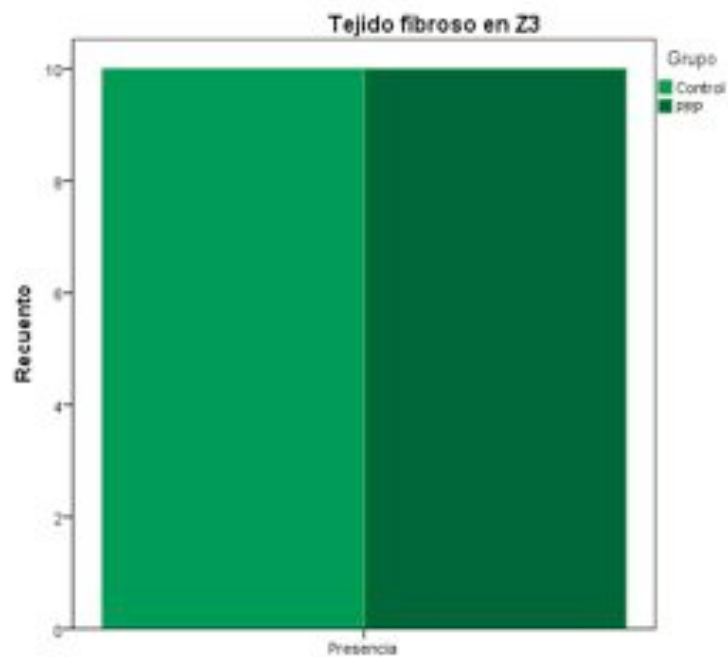


Figura 208. Distribución de la presencia de tejido fibroso por grupos en Z3.



Figura 209. Detalle histológico de la Z3 del caso 16, en el que se observa un importante componente fibrótico y de fibroblastos (flechas) (Tricrómico de Masson a 4x).

El estudio de la presencia de cartílago en la zona más proximal a las corticales (Z1) mostró ausencia en los 10 casos del grupo A (Control) y en 9 del grupo B (PRP) (Figura 210). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de esta variable (Chi-cuadrado con $p > 0,05$).

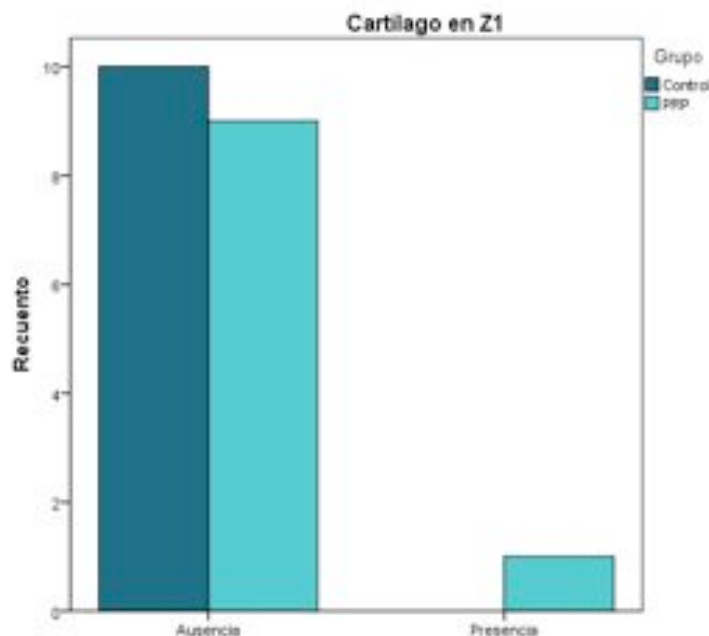


Figura 210. Distribución de la ausencia de cartílago por grupos en Z1.

El estudio de la presencia de cartílago en la zona intermedia (Z2) mostró ausencia en 9 casos del grupo A (Control) y en 3 del grupo B (PRP) (Figura 211). El estudio

estadístico realizado reveló diferencias estadísticamente significativas con una mayor presencia de cartílago en el grupo B (PRP) (Chi-cuadrado con $p < 0,05$).

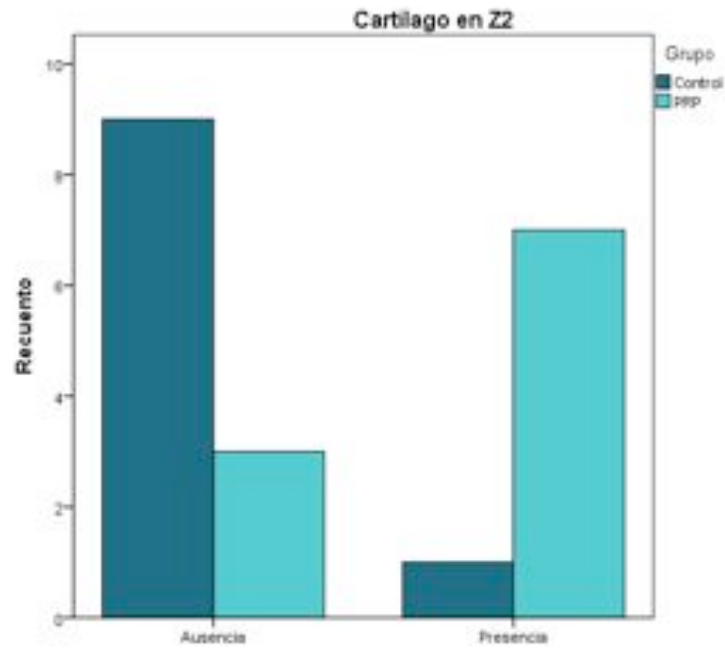


Figura 211. Distribución de la ausencia y presencia de cartílago por grupos en Z2.

El estudio del tejido cartilaginoso en la zona central del callo (Z3) mostró ausencia en 6 casos del grupo A (Control) y en 5 del grupo B (PRP) (Figura 212 y 213). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de esta variable (Chi-cuadrado con $p > 0,05$).

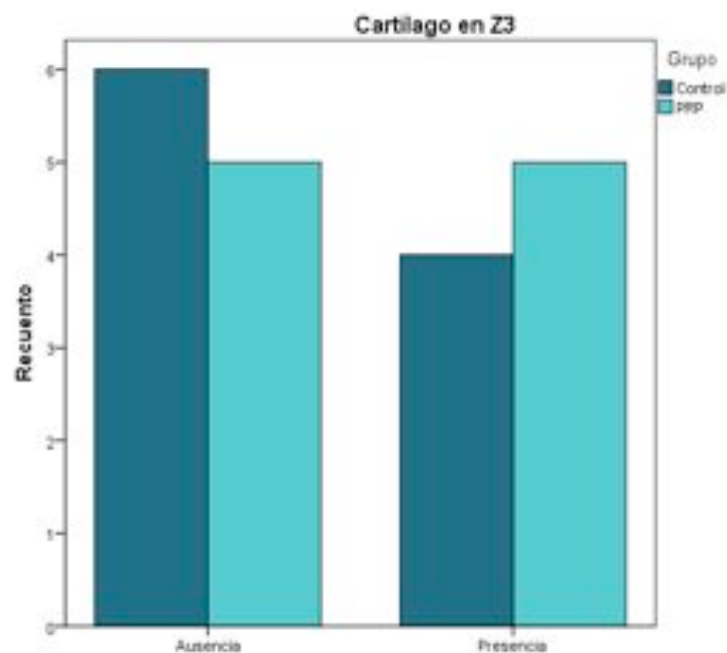


Figura 212. Distribución de la ausencia y presencia de cartílago por grupos en Z3.



Figura 213. Histología de la Z3 del caso 14, en la que se identifica la zona central de crecimiento (flechas verdes) y lagunas de cartilago (flechas naranjas) (Tricrómico de Masson a 2x).

El estudio del tipo de osificación predominante global del callo óseo mostró que en el grupo A (Control) 4 casos presentaban osificación endocondral, 4 casos osificación intramembranosa y 2 casos osificación de patrón mixto. En el grupo B (PRP) se observó que un solo caso presentaba osificación endocondral pura, 3 casos osificación intramembranosa y 6 casos osificación de patrón mixto. Pese existir una distinta distribución el estudio estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas con el test no paramétrico U de Mann-Whitney (Figura 214).

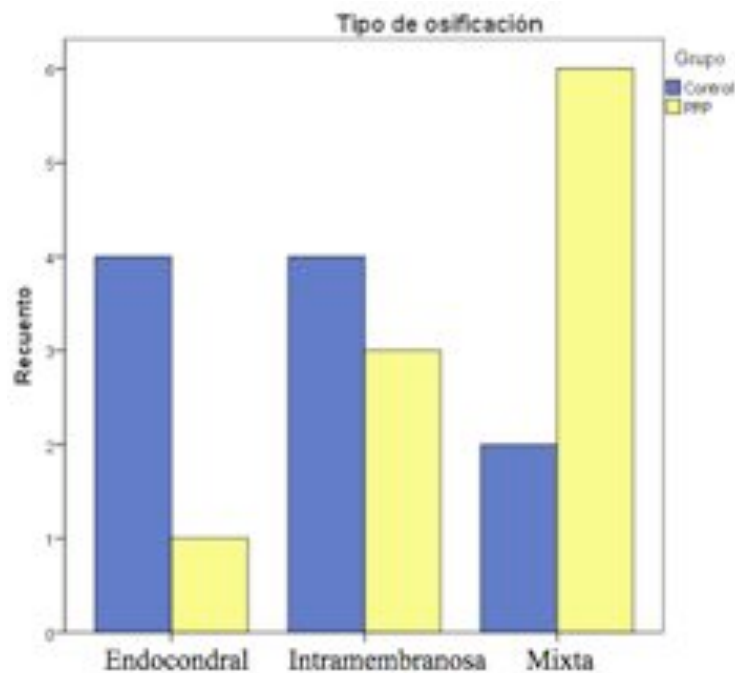


Figura 214. Distribución del tipo de osificación predominante.

En las Figuras 215 y 216 se observan cortes histológicos con distinto tipo de osificación.

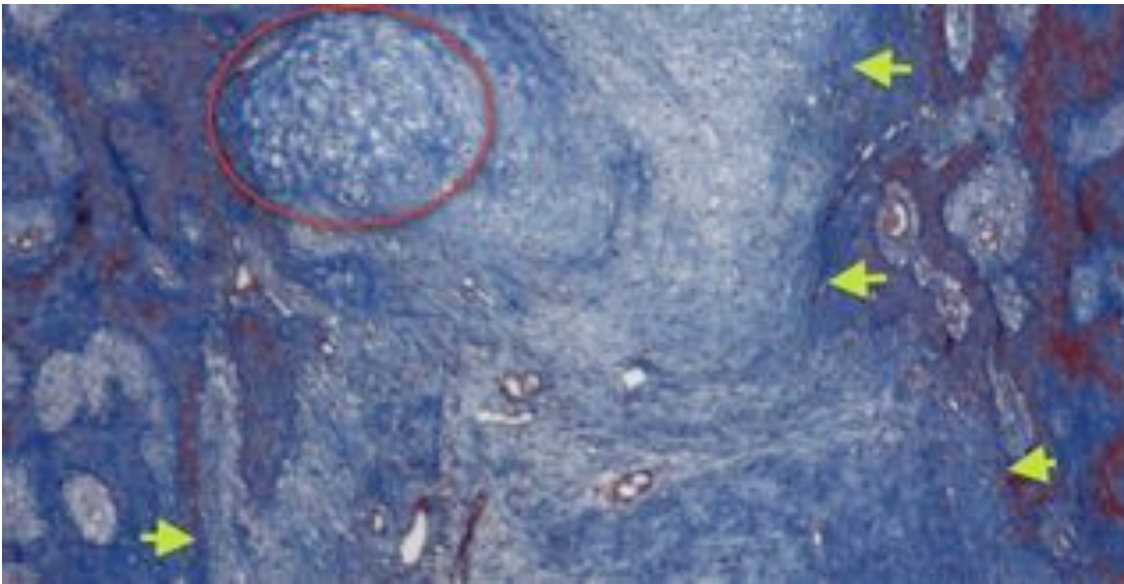


Figura 215. Histología de la zona central de crecimiento en Z3 del caso 9 en donde se observa el límite con la zona de mineralización (flechas verdes) y lagunas de cartílago (círculo rojo) dando lugar a un patrón de osificación mixta (Tricrómico de Masson a 4x)

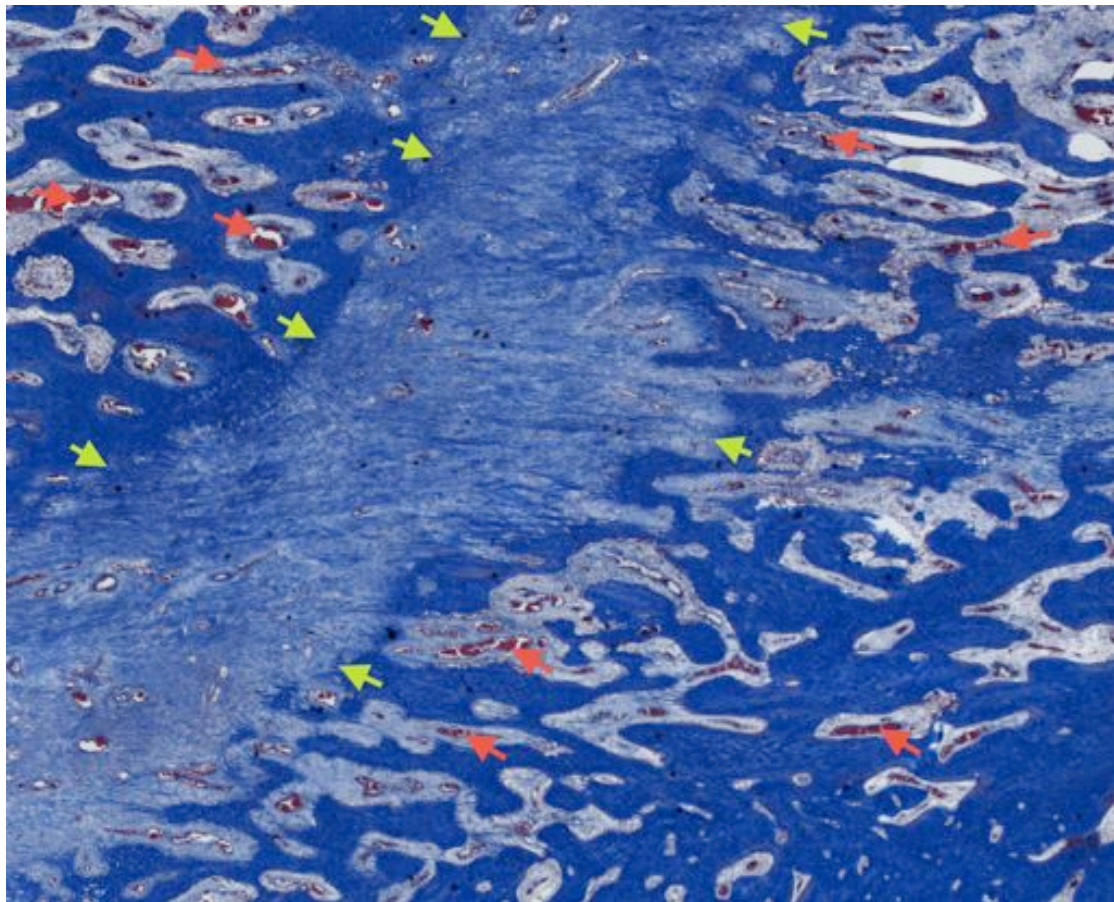


Figura 216. Histología de la zona central de crecimiento del caso 11, en el que predomina una osificación intramembranosa sin cartílago. La flechas verdes delimitan la zona central de crecimiento y las rojas vasos sanguíneos (Tricrómico de Masson a 4x).

6.2. Estudio histológico de la madurez del callo

En la Tabla 26 se muestran los valores de la variable ordinal que expresa la madurez de trabéculas óseas por zonas del callo (0: ausencia de trabéculas, 1: presencia de trabéculas de hueso fibroreticular inmaduro, 2: presencia de trabéculas de hueso lamelar). Posteriormente se exponen los resultados estadísticos descriptivos e inferenciales.

| ID | Grupo | Trabéculas en Z1 | Trabéculas en Z2 | Trabéculas en Z3 |
|----|-------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | B | 2 | 2 | 0 |
| 2 | B | 2 | 2 | 1 |
| 3 | B | 2 | 2 | 1 |
| 4 | B | 2 | 2 | 2 |
| 5 | B | 2 | 2 | 0 |
| 6 | A | 2 | 2 | 2 |
| 9 | B | 2 | 2 | 1 |
| 10 | A | 2 | 1 | 0 |
| 11 | A | 2 | 2 | 1 |
| 12 | A | 2 | 2 | 0 |
| 13 | A | 2 | 2 | 1 |
| 14 | A | 2 | 2 | 1 |
| 15 | A | 2 | 2 | 1 |
| 16 | A | 2 | 2 | 0 |
| 17 | A | 2 | 2 | 1 |
| 19 | B | 2 | 2 | 1 |
| 20 | B | 2 | 2 | 1 |
| 21 | B | 2 | 2 | 1 |
| 22 | B | 2 | 1 | 0 |
| 23 | A | 2 | 2 | 2 |

Tabla 26. Datos de la madurez de las trabéculas por zona.

En la zona más próxima a las corticales (Z1) todos los casos del grupo A (Control) y del grupo B (PRP) mostraban presencia de trabéculas óseas maduras (Figura 217).

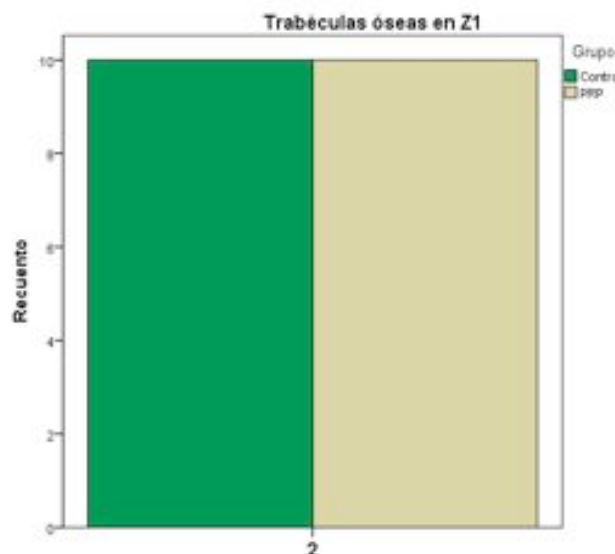


Figura 217. Distribución de la madurez de trabéculas óseas en Z1.

En la zona intermedia del callo (Z2) se observaban trabéculas de hueso lamelar maduro en 9 casos del grupo A (Control) y en 9 del grupo A (PRP). Sólo 1 caso del grupo A (Control) y 1 caso del B (PRP) presentaba trabéculas de hueso inmaduro (Figura 218).

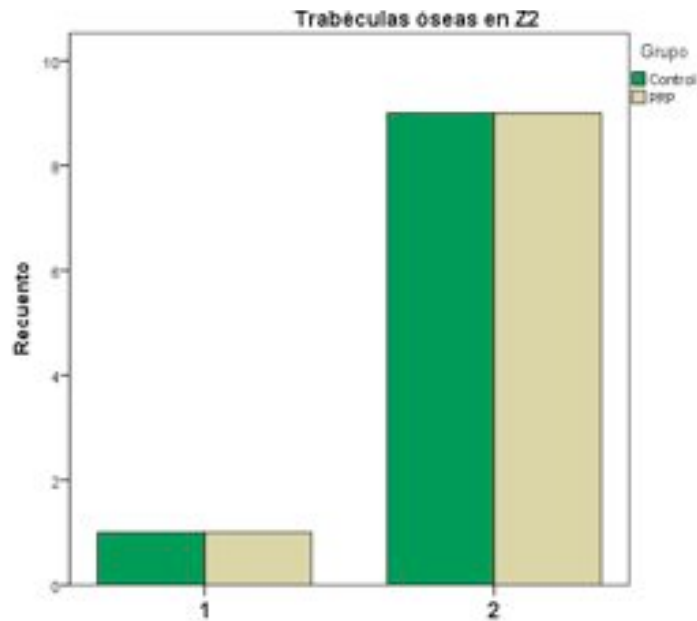


Figura 218. Distribución de la madurez de las trabéculas en Z2.

En la zona medial del callo (Z3) se observaba ausencia de trabéculas en 3 casos del grupo A (Control) y en 3 del grupo B (PRP). En 5 casos del grupo A (Control) y en 6 del grupo B (PRP) se observaban trabéculas de hueso fibroreticular inmaduro. En 2 casos del grupo A (Control) y en 1 caso del grupo B (PRP) se observaban trabéculas de hueso lamelar maduro (Figura 219). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de esta variable (U de Mann-Whitney con $p > 0,05$).

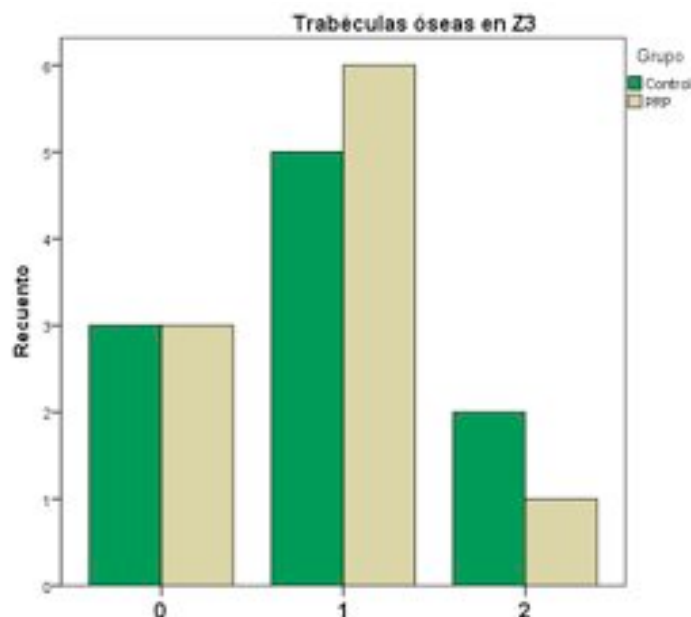


Figura 219. Distribución de la madurez de las trabéculas en Z3.

En la Tabla 27 se encuentran los datos referentes a variables que se relacionan con la madurez del callo. El Volumen Relativo de Osteoide (ROV%) es el porcentaje de trabécula que presenta osteoide no mineralizado. La fase de madurez por zonas expresa la madurez global del callo en las distintas zonas determinando si se encontraba en equivalencia con las zonas funcionales del callo ya descritas (0: zona central de crecimiento, 1: zona de mineralización, 2: zona de remodelación, 3: zona de tubulización). El paso de trabéculas o bridging en Z3 expresa la fase final de cruce de trabéculas por la zona central del callo (0: ausencia, 1: incompleta, 2: completa). Se emplearon dos escalas de madurez global en escala ordinal, la primera se basa en los teóricos días de evolución (0: <3d; 1: 3-7d; 2: 7-35d; 3: >35d) , la segunda en la similitud con el estadio evolutivo del callo (0: hematoma, 1: inflamatorio, 2: granulación, 3: callo blando, 4: callo duro, 5: remodelación). Posteriormente se exponen los resultados estadísticos descriptivos e inferenciales.

| ID | Grupo | ROV% en Z1 | ROV% en Z2 | ROV% en Z3 | Fase de madurez de Z1 | Fase de madurez de Z2 | Fase de madurez de Z3 | Paso de trabéculas en Z3 (Bridging) | Madurez (Escala "Días de Maduración") | Madurez (Escala "Estadio de Maduración") |
|----|-------|------------|------------|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 1 | B | 62 | 70 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 2 | 3 |
| 2 | B | 23 | 38 | 96 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 5 |
| 3 | B | 40 | 42 | 82 | 3 | 1 | 0 | 0 | 3 | 4 |
| 4 | B | 38 | 56 | 74 | 3 | 1 | 0 | 1 | 3 | 4 |
| 5 | B | 33 | 44 | 0 | 2 | 2 | 0 | 1 | 3 | 3 |
| 6 | A | 80 | 74 | 89 | 3 | 2 | 1 | 1 | 3 | 4 |
| 9 | B | 11 | 40 | 42 | 3 | 2 | 1 | 1 | 3 | 4 |
| 10 | A | 15 | 47 | 24 | 3 | 2 | 0 | 0 | 3 | 4 |
| 11 | A | 28 | 53 | 66 | 3 | 1 | 0 | 1 | 3 | 4 |
| 12 | A | 31 | 33 | 53 | 3 | 2 | 0 | 0 | 3 | 4 |
| 13 | A | 50 | 47 | 73 | 3 | 2 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 14 | A | 47 | 27 | 43 | 2 | 2 | 1 | 1 | 3 | 4 |
| 15 | A | 50 | 73 | 71 | 2 | 2 | 0 | 0 | 3 | 4 |
| 16 | A | 50 | 76 | 0 | 2 | 2 | 1 | 1 | 3 | 4 |
| 17 | A | 30 | 59 | 70 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 5 |
| 19 | B | 28 | 27 | 62 | 2 | 2 | 0 | 1 | 3 | 5 |
| 20 | B | 28 | 75 | 44 | 2 | 2 | 1 | 2 | 3 | 5 |
| 21 | B | 43 | 78 | 48 | 2 | 2 | 1 | 2 | 3 | 5 |
| 22 | B | 38 | 89 | 42 | 2 | 2 | 1 | 1 | 3 | 5 |
| 23 | A | 30 | 34 | 42 | 3 | 2 | 0 | 1 | 3 | 5 |

Tabla 27. Variables recogidas relacionadas con la madurez del callo de elongación.

En la zona más próxima a las corticales (Z1) el grupo A (Control) presenta un Volumen Relativo de Osteoide (ROV%) medio de 41%, con un Intervalo de Confianza al 95% entre 28,07 y 54,1% del volumen trabecular. En el grupo B (PRP) el Volumen Relativo de Osteoide (ROV%) medio es de 34%, con un Intervalo de Confianza al 95%

entre 24,7 y 44,1% del volumen trabecular (Figura 220). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (prueba T con $p > 0,05$).

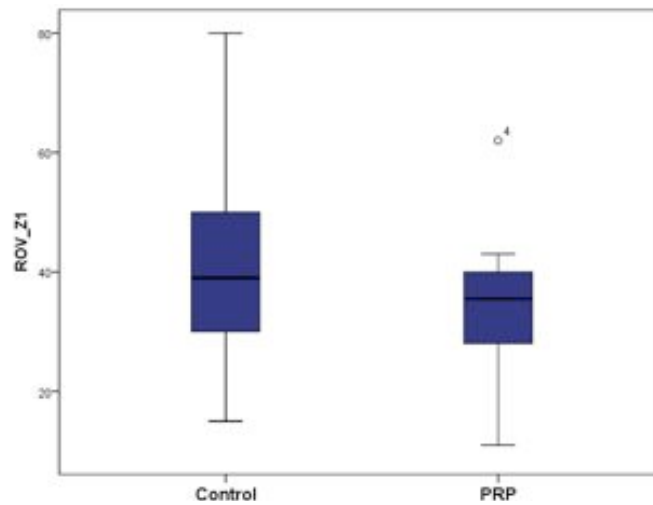


Figura 220. Distribución por grupos del Volumen Relativo de Osteoide (ROV%) en Z1.

En la zona intermedia del callo (Z2) el grupo A (Control) presenta un Volumen Relativo de Osteoide (ROV%) medio de 52,3%, con un Intervalo de Confianza al 95% entre 39,44 y 65,16% del volumen trabecular. En el grupo B (PRP) el Volumen Relativo de Osteoide (ROV%) medio es de 55,9%, con un Intervalo de Confianza al 95% entre 41 y 70,8% del volumen trabecular (Figura 221). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (prueba T con $p > 0,05$).

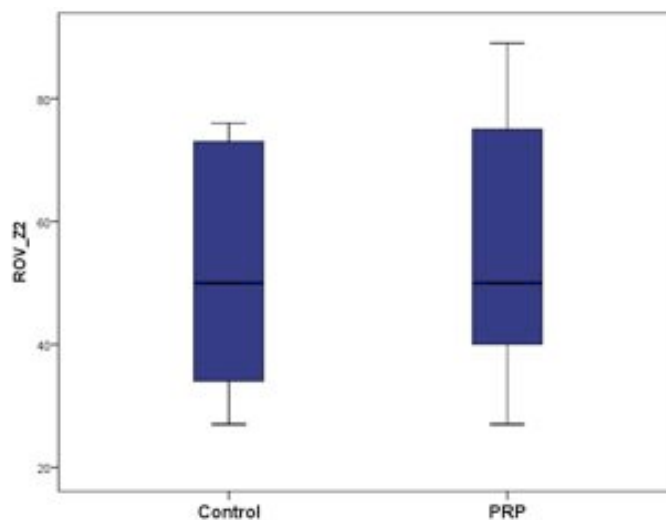


Figura 221. Distribución por grupos del Volumen Relativo de Osteoide (ROV%) en Z2.

En la zona central del callo (Z3) el grupo A (Control) presenta un Volumen Relativo de Osteoide (ROV%) medio de 53,1%, con un Intervalo de Confianza al 95% entre 34,1 y 72,1% del volumen trabecular. En el grupo B (PRP) el Volumen Relativo de Osteoide (ROV%) medio es de 49%, con un Intervalo de Confianza al 95% entre 26,36 y 71,64%

del volumen trabecular (Figura 222). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (prueba T con $p > 0,05$).

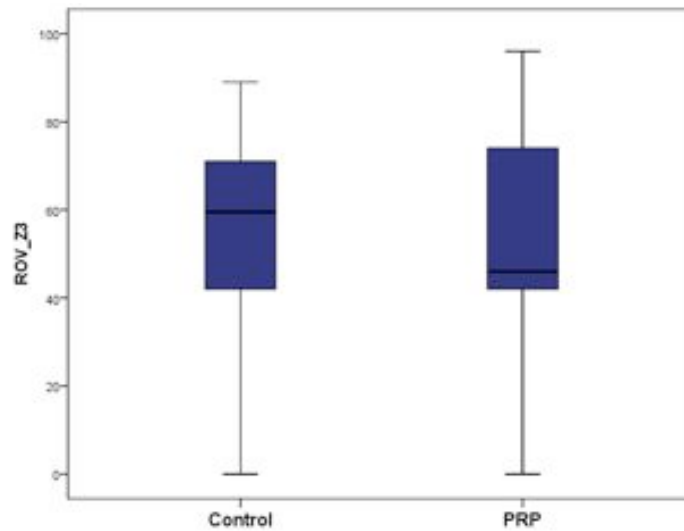


Figura 222. Distribución por grupos del Volumen Relativo de Osteoide (ROV%) en Z3.

El estudio de la madurez de cada zona mostró en la zona más proximal a las corticales (Z1) que en el grupo A (Control) existían 3 casos con equivalencia a zona de remodelación y 7 a zona de tubulización. En el grupo B (PRP) se observó que 6 casos se encontraban en equivalencia con zona de remodelación y 4 en tubulización (Figura 223). No se identificaron diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney con $p > 0,05$).

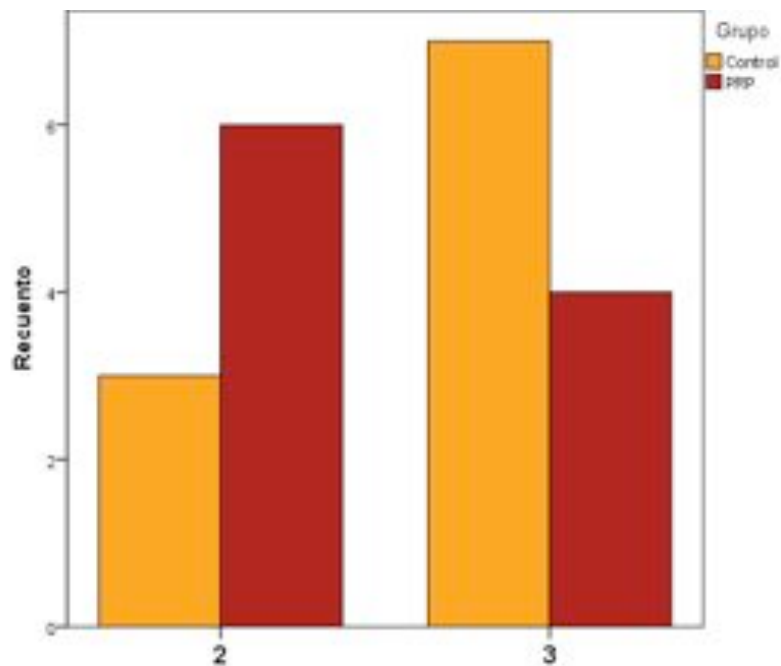


Figura 223. Distribución por grupos de la fase de maduración de la Z1 (0: zona central de crecimiento, 1: zona de mineralización, 2: zona de remodelación, 3: zona de tubulización).

El estudio de la madurez de cada zona mostró en la zona intermedia del callo (Z2) que en el grupo A (Control) existían 1 caso con equivalencia a zona de mineralización y 9 con zona de remodelación. En el grupo B (PRP) se observó que 6 casos se encontraban en equivalencia con zona de mineralización y 8 en remodelación (Figura 224). No se identificaron diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney con $p > 0,05$).

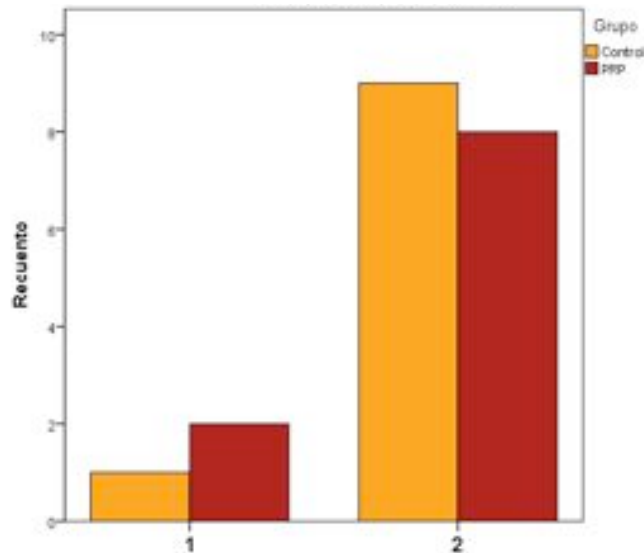


Figura 224. Fase de maduración de la Z2 (1: zona de mineralización, 2: zona de remodelación).

El estudio de la madurez de cada zona mostró en la zona central del callo (Z3) que en el grupo A (Control) existían 5 casos con equivalencia a zona central de crecimiento, 3 con zona de mineralización y 2 con zona de remodelación (Figura 226). En el grupo B (PRP) se observó que 5 casos se encontraban en equivalencia con zona central de crecimiento y 5 con zona de mineralización (Figura 225). No se identificaron diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney con $p > 0,05$).

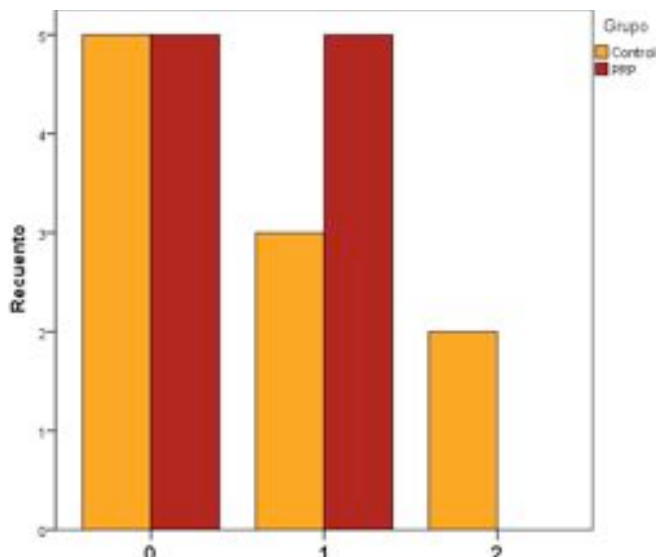


Figura 225. Fase de maduración de la Z3 (0: zona central de crecimiento, 1: zona de mineralización, 2: zona de remodelación).

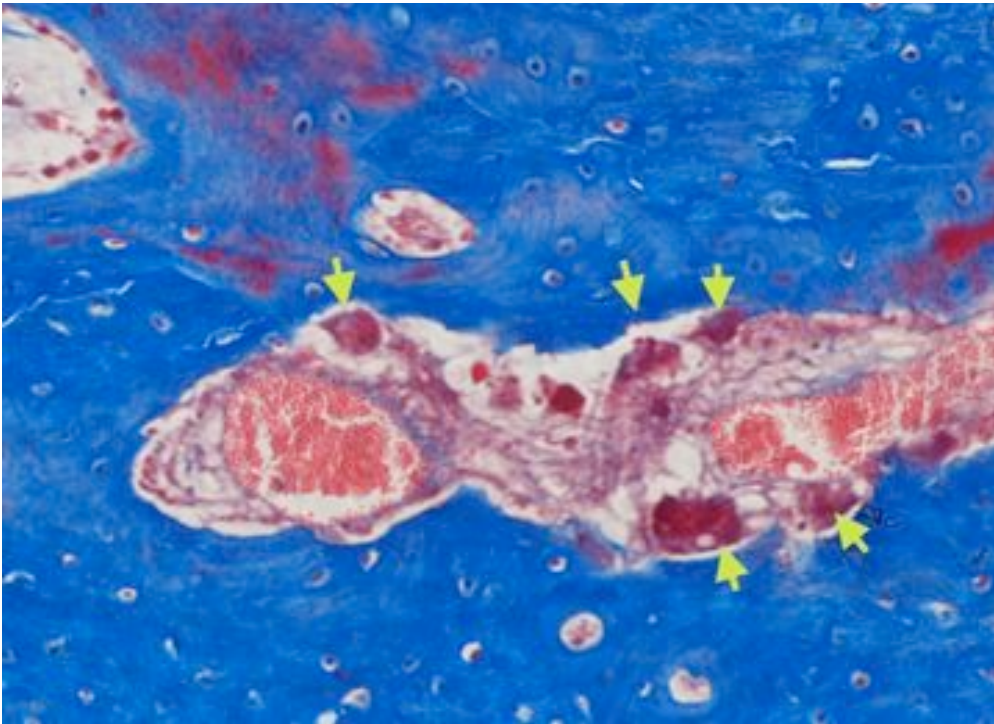


Figura 226. Histología de la Z3 del caso 23, en el que se identifica un estadio de remodelación, con actividad osteoclástica (flechas verdes) (Tricrómico de Masson a 10x).

El paso de trabéculas por Z3 o Bridging mostró en el grupo A (Control) 4 casos de ausencia de paso de trabéculas, 3 casos de paso incompleto y 3 casos de paso completo. En el grupo B (PRP) se observó 1 caso con ausencia de paso de trabéculas, 7 casos con paso incompleto y 2 casos con paso completo de trabéculas. El estudio estadístico reveló diferencias significativas entre los dos a favor de un grado mayor de paso de trabéculas por Z3 en el grupo B (PRP) (U de Mann-Withney con $p < 0,05$) (Figura 227 a 230).

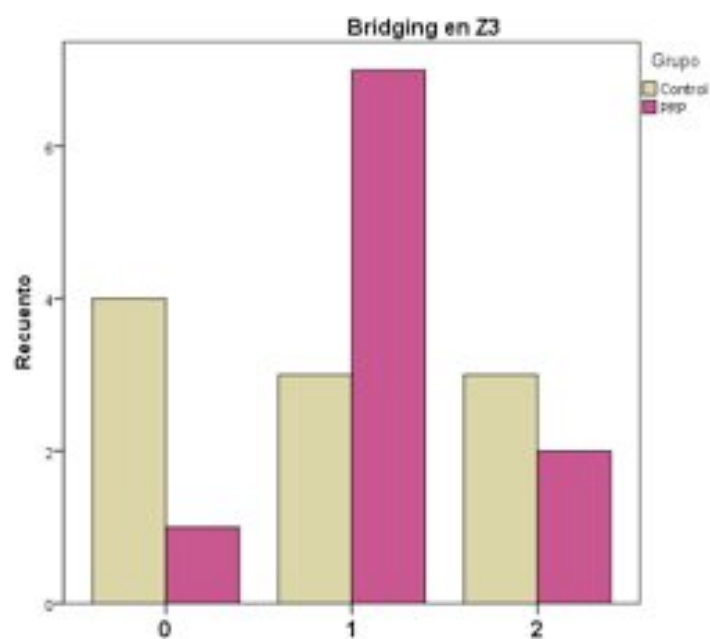


Figura 227. Distribución por grupos del paso de trabéculas por Z3 (0: ausencia, 1: incompleto, 2: completo).

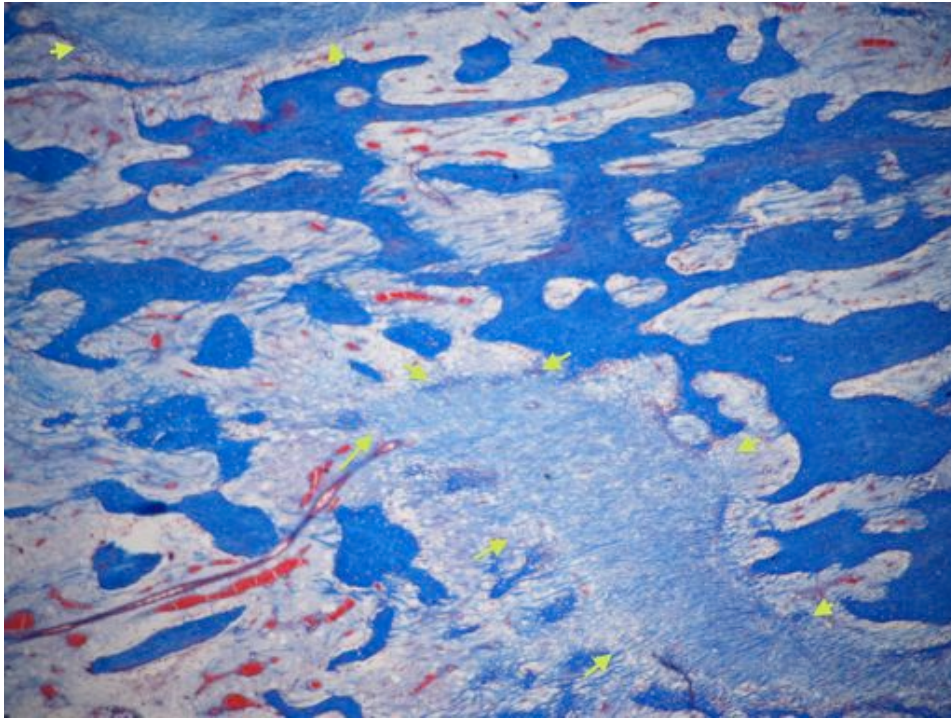


Figura 228. Histología de la Z3 del caso 12 en la que se observa un paso parcial de trabéculas, las flechas verdes señalan la presencia de tejido fibrótico sin paso de trabéculas (Tricrómico de Masson a 2x).

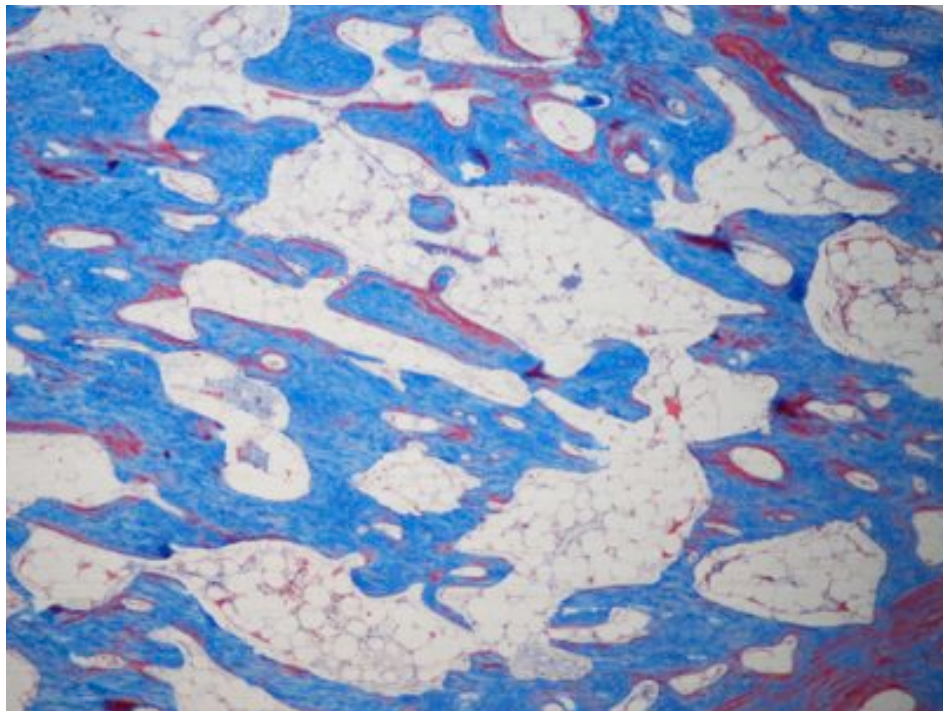


Figura 229. Histología de la Z3 del caso 4 en la que se observa paso completo de trabéculas (Tricrómico de Masson a 2x).

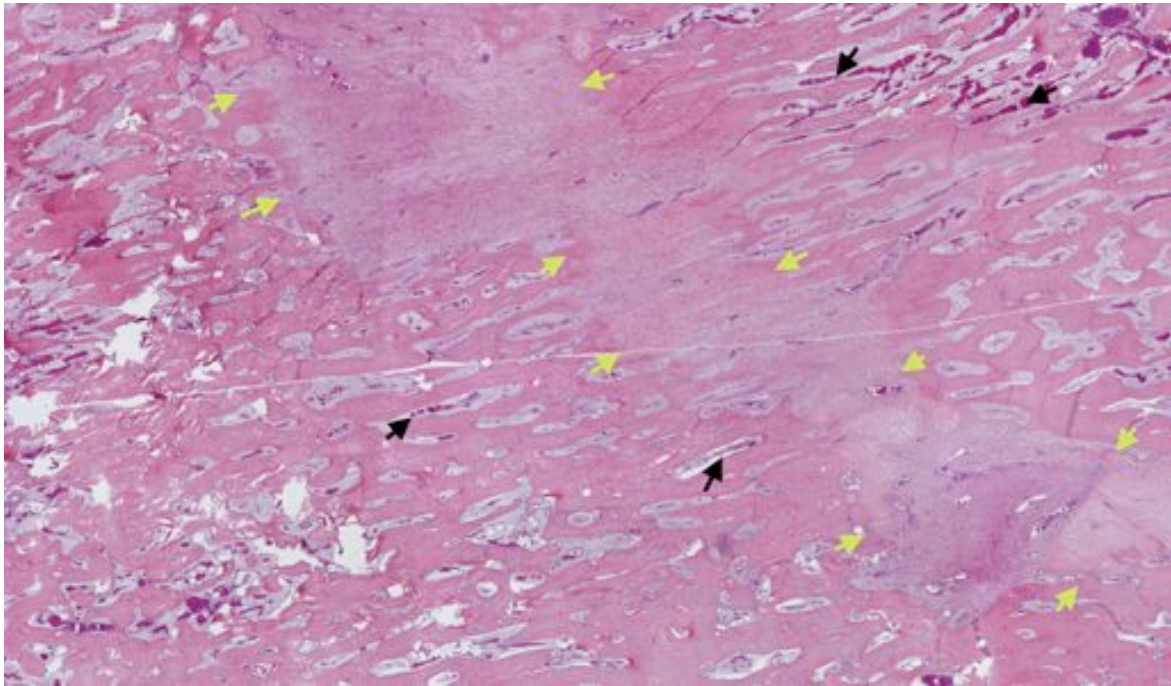


Figura 230. Histología de la Z3 del caso 11, en el que se observa una banda de tejido fibroso sin paso de trabéculas, las flechas verdes marcan los límites del hueso trabecular y las negras vasos sanguíneos (Hematoxilina Eosina a 2x).

El estudio de madurez global del callo basado en los días teóricos de evolución mostró que en el grupo A (Control) 1 caso se encontraba en fase de formación (día 7 a 35: 2), los demás casos en fase de hueso lamelar y remodelación (>35 días: 3). Todos los casos del grupo B (PRP) se encontraban en fase de fase de hueso lamelar y remodelación (>35 días). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Chi-cuadrado con $p > 0,05$) (Figura 231).



Figura 231. Distribución de la madurez mediante "Días de Madurez".

El estudio de madurez global del callo basado en los estadios de maduración mostró que en el grupo A (Control) 8 casos se encontraban en estadio de callo duro, los demás casos en estadio de remodelación. En el grupo B (PRP) 2 casos se encontraban en estadio de callo blando, 3 casos en estadio de callo duro y 5 casos en estadio de remodelación (Figura 232). Se observó una mayor frecuencia de callos en remodelación en el grupo B (PRP) con diferencias estadísticamente significativas en la distribución de la variable entre los grupos (U de Mann-Whitney con $p < 0,05$). Sin embargo cabe destacar que es en el grupo B (PRP) en el único grupo en que se registran casos en estadio de callo blando.

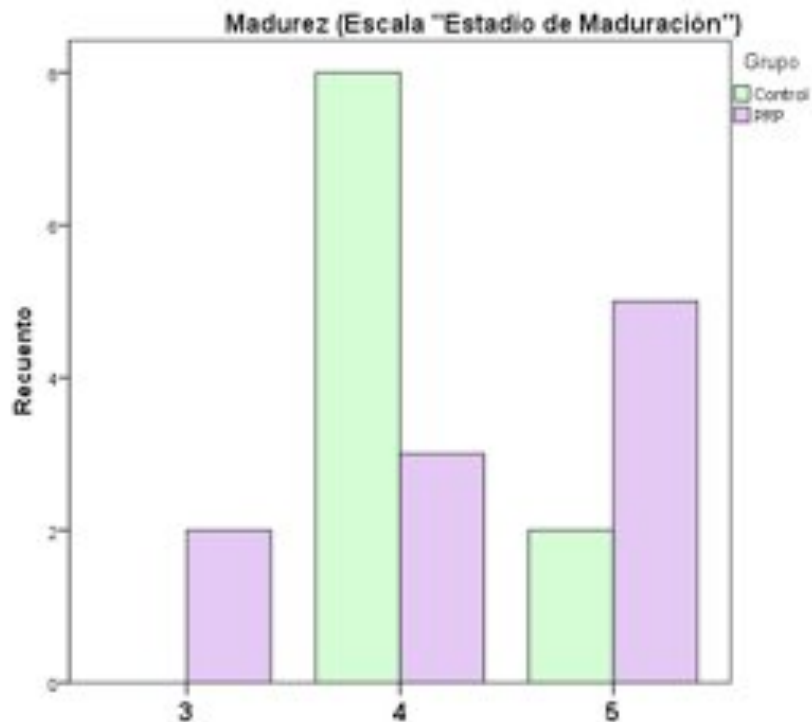


Figura 232. Distribución de los Estadios de Maduración (callo blando: 3, callo duro: 4, remodelación: 5).

7. ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO

En la Tabla 28 se exponen los datos del estudio histomorfométrico de superficie, en el que se exponen los porcentajes de superficie ósea, de tejido cartilaginoso y de tejido fibroso.

| ID | Grupo | Superficie ósea % | Superficie de cartilago % | Superficie de tejido fibroso % |
|----|-------|-------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 1 | B | 76,12 | 3,31 | 20,57 |
| 2 | B | 80,72 | 5 | 14,28 |
| 3 | B | 81,95 | 0 | 18,05 |
| 4 | B | 74,69 | 6,4 | 18,91 |
| 5 | B | 76,79 | 0 | 23,21 |
| 6 | A | 82,47 | 0 | 17,53 |
| 9 | B | 77,89 | 4,59 | 17,52 |
| 10 | A | 59,6 | 13,1 | 27,3 |
| 11 | A | 77,16 | 0 | 22,84 |
| 12 | A | 65,19 | 10,53 | 24,28 |
| 13 | A | 65,2 | 11,7 | 23,1 |
| 14 | A | 81,76 | 0 | 18,24 |
| 15 | A | 84,71 | 0 | 15,29 |
| 16 | A | 72,95 | 10,23 | 16,82 |
| 17 | A | 73,44 | 0 | 26,56 |
| 19 | B | 68,43 | 9,7 | 21,87 |
| 20 | B | 75,37 | 7,45 | 17,18 |
| 21 | B | 75,55 | 8,81 | 15,64 |
| 22 | B | 61,48 | 11,8 | 26,72 |
| 23 | A | 70,38 | 12,5 | 17,12 |

Tabla 28. Datos del estudio histomorfométrico.

El estudio histomorfométrico mostró que en el grupo A (Control) la superficie del callo ocupada por hueso (trabecular y cortical) era del 75% de media, con un intervalo de confianza al 95% entre el 69 y 80,5%. En el grupo B la superficie del callo ocupada por hueso era del 72% de media, con un intervalo de confianza al 95% entre 67 y 78%. El estudio estadístico no reveló diferencias estadísticamente significativas (T de Fisher con $p>0,05$).

El estudio histomorfométrico mostró que en el grupo A (Control) la superficie del cartilago era del 4,2% de media, con un intervalo de confianza al 95% entre el 0,9 y 7,6%. En el grupo B la superficie del callo ocupada por cartilago era del 7,21% de media, con un intervalo de confianza al 95% entre 3,05 y 11%. El estudio estadístico no reveló diferencias estadísticamente significativas (T de Fisher con $p>0,05$).

El estudio histomorfométrico mostró que en el grupo A (Control) la superficie del callo ocupada por tejido fibroso era del 20,4% de media, con un intervalo de confianza al

95% entre el 17,6 y 23,25%. En el grupo B la superficie del callo ocupada por tejido fibroso era del 19,8% de media, con un intervalo de confianza al 95% entre 16,7 y 23%. El estudio estadístico no reveló diferencias estadísticamente significativas (T de Fisher con $p>0,05$).

Los datos del porcentaje de cada tipo de tejido por caso y grupo se reflejan en la Figura 233.

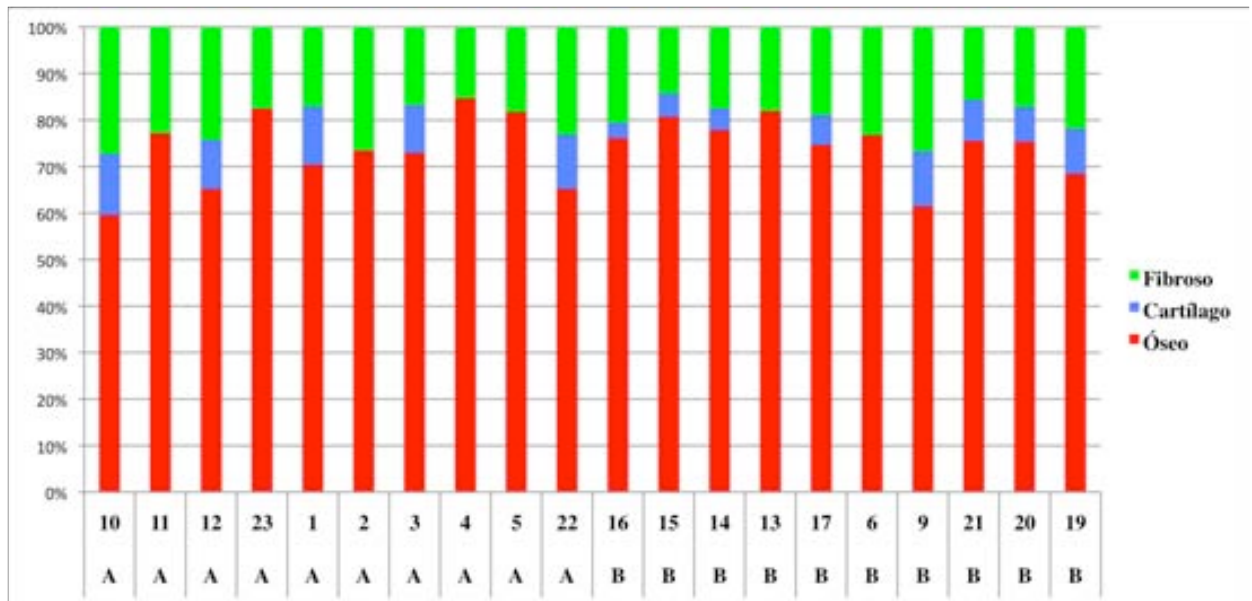


Figura 233. Gráfico de frecuencias acumuladas donde se observa la porcentaje de tejido óseo, cartilaginoso y fibroso en el callo de elongación, por cada caso y grupo.

DISCUSIÓN

1. Modelo experimental de osteogénesis a distracción

Gran parte de los trabajos experimentales de osteogénesis a distracción llevados a cabo en la última década han empleado animales de experimentación como rata, conejo y cerdo pequeño (51,180-182,184-189,191,192,320). Estos animales presentan huesos diafisarios de pequeño tamaño, que soportan poco peso y que presentan una capacidad regenerativa superior a la del hueso diafisario humano.

Los huesos largos del cordero se asemejan al de humano en varios aspectos como el tamaño, composición y carga mecánica que soportan. Animales como el perro o el cerdo pequeño presentan características biológicas más cercanas al humano, sin embargo el cordero posee una destacable docilidad y permite estar estabulado con otros especímenes (333). Estos argumentos y la experiencia con corderos tanto del equipo experimental como la del personal del Estabulario (27) hicieron del cordero el animal de experimentación idóneo para este trabajo.

La edad de los corderos podría considerarse temprana, al presentar a la edad de 3-4 meses un alto potencial de regeneración ósea (333). Sin embargo la experiencia previa del equipo experimental avalaba la utilización de corderos jóvenes, ya que se habían encontrado casos de no unión en experimentos de elongación previos y dicho potencial de regeneración no había supuesto un inconveniente (27).

La elección del segmento óseo a elongar vino determinada también por la experiencia del grupo experimental en elongaciones de fémures de cordero (27) y de la consideración de que la posición de un fijador externo a nivel femoral podía ser menos molesta para los animales que a nivel tibial. La presencia de un compartimento muscular importante, así como la mayor distancia al suelo de la corralina nos sugería una ventaja estratégica de la posición femoral respecto a la tibial especialmente para evitar infecciones.

Un aspecto positivo de este tipo de animal de experimentación era la posibilidad de emplear un sistema de fijación-distracción similar a los empleados en la práctica clínica habitual y en otros procedimientos experimentales (24), de hecho el sistema empleado se usa en la clínica, concretamente en osteogénesis a distracción en edad pediátrica. Dicho dispositivo presenta la posibilidad de estar en régimen de neutralización o de dinamización axial. Se había comprobado la eficacia de la dinamización axial en estudios previos (27), por lo que se dejó en un régimen de neutralización para no aportar más

beneficio mecánico al modelo ya que habíamos asumido una situación de elevada capacidad regenerativa debido a la corta edad de los corderos.

Los pasos de la técnica quirúrgica se basaron en los empleados en procedimientos experimentales de elongación ósea en corderos por el grupo del Profesor Cañadell en la Universidad de Navarra y están basados en la técnica habitualmente empleada en práctica clínica (18,24,97). Tras la correcta implantación del fijador-distractor se realizaba una osteotomía lo más transversa posible y paralela a los clavos. La osteotomía se realizaba de modo percutáneo y a escoplo. La tendencia en la última década en trabajos experimentales de osteogénesis a distracción ha sido la osteotomía abierta con sierra en pequeño animal, con el objeto de realizar una osteotomía lo más transversa y uniforme posible (180-182,184-189,191), sin embargo trabajos que empleaban animales mayores como perros o corderos empleaban la osteotomía percutánea (12,335).

Se decidió la realización de una osteotomía percutánea por tres motivos. El primero era la menor morbilidad para el animal derivada de una herida quirúrgica de más tamaño con posible lesión de la piel y partes blandas. El segundo motivo era la preservación de las estructuras adyacentes al hueso. Puesto que se iba a estudiar la influencia en la formación de hueso del PRP, éste debía ser administrado en el entorno menos alterado posible, ya que desconocíamos si circunstancias como una necrosis térmica podía interferir con el efecto del PRP. El tercer motivo es que actualmente la osteotomía percutánea se considera el patrón de referencia de la práctica clínica en alargamiento de extremidades.

La osteotomía se realizó a nivel diafisario, situación menos favorable que la metafisaria tal y como demostró Aronson en un estudio experimental con perros (46). La osteotomía diafisaria aportaba como ventaja técnica la fácil localización del punto de osteotomía y la menor superficie de hueso a romper en comparación con la metafisaria.

Se tomaron 10 días de fase de latencia tomando como referencia el trabajo de Gil-Albarova, realizado en corderos de la misma edad que este trabajo experimental (21). En el citado trabajo y otros previos se demostraron beneficios en el regenerado de los casos en los que se había llevado a cabo una elongación diferida (62).

La velocidad empleada fue de 1mm/día, similar a la descrita en publicaciones tanto clínicas como experimentales (21,24). El ritmo fue de 1mm en una única distracción, ritmo bajo según los principios de la osteogénesis a distracción de Ilizarov, y por tanto menos favorable para la regeneración ósea que ritmos altos con varias distracciones al día (14).

Como se observa en la Tabla 29 se intentó que el modelo de osteogénesis a distracción presentase cierto equilibrio de circunstancias favorables y desfavorables para la regeneración.

| Circunstancias favorables | Circunstancias desfavorables |
|---------------------------|------------------------------|
| Período de latencia | Osteotomía diafisaria |
| Osteotomía percutánea | Régimen de neutralización |
| Cordero joven | Bajo ritmo de distracción |

Tabla 29. Circunstancias favorables y desfavorables del modelo empleado.

Se excluyeron 3 casos del estudio. El criterio de exclusión era la desviación en varo de más de 15°, situación que traducía una consolidación precoz de la osteotomía. La consolidación precoz en el lado medial impedía el procedimiento de distracción simétrico por lo que el regenerado óseo no era de las mismas características que en los demás.

La consolidación precoz de la osteotomía es una complicación descrita durante el procedimiento de osteogénesis a distracción (16,76,77). Puede deberse a una osteotomía incompleta, habiendo dejado algún puente óseo, debido a un período de latencia elevado o a una pobre velocidad de elongación (16,76,77). Otro factor al que puede ser debido es la corta edad del paciente, debido al mayor potencial regenerador (97).

Algunos autores han observado una mayor tasa de complicaciones durante la curva de aprendizaje, como ha sido nuestro caso (77,78). De la primera serie de corderos intervenidos 2 de los 6 corderos fueron excluidos tras observar una deformidad en varo de más de 15°. Dado que el resto de corderos presentaban la misma edad y características del procedimiento parece lógico atribuir la consolidación precoz a un defecto de técnica quirúrgica durante la curva de aprendizaje.

El estudio radiológico en la fase de latencia pretendía comprobar la correcta colocación del fijador y describir el tipo de osteotomía. El tipo de osteotomía puede influir en las características del regenerado óseo (13,46,59,61). Se evidenció que no existían diferencias en el tipo de osteotomía realizada en los dos grupos.

Para evaluar el efecto del PRP en la osteogénesis a distracción hemos realizado una serie de estudios radiológicos, histológicos e histomorfométricos. Así como hace dos décadas los estudios experimentales de osteogénesis a distracción empleaban la radiología simple, los estudios biomecánicos y la histología simple, en la última década se han realizado estudios experimentales que han incorporado nuevos sistemas de evaluación.

Estos sistemas de evaluación incluyen, además de la radiología simple e histología, la TC o micro-TC, la densitometría ósea, la inmunohistoquímica y la histomorfometría.

En la Tabla 30 se encuentran los estudios experimentales más relevantes sobre la osteogénesis a distracción de huesos largos en modelos animales donde se resume las características de los estudios y los métodos empleados para evaluar el regenerado óseo.

| Estudio | Modelo experimental | Objeto del estudio | Métodos de evaluación |
|-----------------|---|---|---|
| Raschke (180) | Cerdo pequeño. Diáfisis tibial. | Hormona de crecimiento recombinante humana por vía sistémica. | Biomecánica. |
| Yamane (181) | Conejo. Diáfisis tibial. | Derivado de vitamina D (ED-71) sistémica. | Densitometría. TC. Histomorfometría. |
| Rauch (182) | Conejo. Diáfisis tibial. | TGF- β 1 intrafocal. | Densitometría. Electroforesis. Histomorfometría. Biomecánica. |
| Subasi (183) | Conejo. Diáfisis tibial. | Metotrexato endovenoso. | Gammagrafía. Histología. Radiología. |
| Bail (184) | Cerdo pequeño. Diáfisis tibial. | Hormona de crecimiento recombinante porcina por vía sistémica. | Histomorfometría. Histología con tetraciclina. |
| Hamdy (185) | Conejo. Diáfisis tibial. | OP-1 intrafocal | Inmunohistoquímica. Histología. Biomecánica |
| Aronson (51) | Rata. Diáfisis tibial. | Regenerado óseo dependiendo de la edad del animal experimental. | Histomorfometría. Densitometría. Biomecánica. Inmunohistoquímica. |
| Tsuchiya (186) | Conejo. Diáfisis tibial. | Radiación sobre el foco de osteotomía. | Radiología simple. Histología simple. Microangiografía. |
| Takahashi (187) | Conejo. Diáfisis tibial. | Bifosfonatos sistémicos | Radiología simple. Histomorfometría. Biomecánica. |
| Saihan (188) | Conejo. Diáfisis tibial. | BMP-7 (OP-1) recombinante humana intrafocal. | Radiología simple. Ecografía. Densitometría. |
| Abbaspour (189) | Conejo. Diáfisis tibial. | FGF-2 intrafocal. | TC. Densitometría. Biomecánica. |
| Abbaspour (191) | Conejo. Diáfisis tibial. | Alendronato intrafocal | Radiología simple. Densitometría. TC. Biomecánica. |
| Alam (192) | Ratones modificados genéticamente. Diáfisis tibial. | Terapia génica de sobreexpresión o infraexpresión de | PCR. TC. Radiología simple. Inmunohistoquímica. Histología |
| Welch (44) | Cabra. Diáfisis tibial. | Determinación de los patrones histomorfométricos | Histomorfometría |
| Kusec (335) | Perro. Diáfisis tibial. | Distintos tipos de fijador externo. | Radiología simple. Histología simple. Histomorfometría. |
| Kawasumi (320) | Rata. Diáfisis tibial. | Células expandidas de médula ósea y PRP | Radiología simple. TC. |

Tabla 30. Metodología de evaluación de los resultados de los últimos estudios en osteogénesis a distracción.

Como puede observarse en la Tabla 30 la mayoría de los estudios consideran el análisis de la pieza ósea con algún tipo de prueba de imagen radiológica, como la radiología simple, la TC o micro-TC. Además consideran la realización de pruebas histológicas complementadas o no por histomorfometría o inmunohistoquímica. Algunos estudios añaden una evaluación biomecánica de las piezas. Nuestros métodos de evaluación con radiología simple, TC, histología e inmunohistoquímica son métodos comparables a los empleados por la mayoría de los estudios experimentales en modelos animales de osteogénesis a distracción de la última década.

2. Procedimientos del Plasma Rico en Plaquetas

La obtención del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) se llevó a cabo por un sistema de sedimentación gravitacional, siguiendo el protocolo descrito por Anitua y Sánchez (255,259). Uno de los motivos de haber empleado este protocolo es la sencillez del mismo, con una única centrifugación, a diferencia de otros sistemas que empleaban múltiples centrifugaciones (257), y con un sistema de pipeteado reproducible. El otro motivo por el que se ha empleado es que creemos que en la actualidad el protocolo de Anitua y Sánchez es el más empleado en nuestro medio y sobre el que más publicaciones se han realizado en nuestro entorno (194,244,246,248,249,251,253,255,259,289,311,312,336,338).

Se empleó un sistema de tubos citratados similar al descrito por los anteriores autores. El protocolo de centrifugación fue el mismo que el empleado en ser humano con 1800 rpm durante 8 minutos. Sin embargo no se empleó la centrifugadora (PRGF™ System II, BTI, Vitoria-Gasteiz, España), ni las pipetas, ni los viales de activador descritos por los anteriores autores (255,259). En nuestro estudio empleamos la centrifugadora Heraeus Sephatec Megafuge 2.0R, centrifugadora empleada en el Institut de Recerca del Hospital Universitario Vall d'Hebron a las revoluciones por minuto y tiempos ya citados.

Este término (PRGF™) fue acuñado por este grupo de autores para denominar al concentrado de plaquetas obtenido mediante su protocolo y centrifugadora (255,259) y se encuentra patentado por BTI Biotechnology Institute (Vitoria-Gasteiz, España). Puesto que a pesar de utilizar la misma sistemática no se han empleado ni los instrumentos ni los reactivos de BTI Biotechnology Institute hemos denominado simplemente PRP al concentrado plaquetar implantado a los corderos.

Dado que se empleaba una adaptación de un protocolo de obtención ya descrito pero sin haber empleado los mismos materiales, se decidió realizar el estudio de validación para comprobar la concentración de plaquetas administrada. Sin embargo, cabe destacar que otros estudios experimentales han empleado diversos protocolos experimentales sin evaluar la concentración de plaquetas administrada, asumiendo la eficacia del sistema empleado (289). Aunque hemos realizado una cuantificación de las plaquetas no hemos llevado a cabo una determinación de los factores de crecimiento presentes en el concentrado, ya que hemos asumido la presencia de factores de crecimiento en el interior de las plaquetas. Otros autores tampoco han comunicado las concentraciones de factores

de crecimiento para validar la concentración de factores de crecimiento en el PRP administrado en varios trabajos experimentales de regeneración ósea con modelos ovinos (289,304,308).

Con el protocolo PRGF™ Anitua obtuvo una concentración media de plaquetas de 634.000 plaquetas/ μ L (rango de 421.000 a 1.314.000 plaquetas/ μ L), en un estudio de cuantificación con voluntarios sanos, llegando a una concentración de 3,1 veces la concentración de plaquetas en sangre periférica (336).

Los resultados del estudio de validación del PRP administrado en la primera dosis del grupo B muestran unos valores superiores a los citados por Anitua como imprescindibles (>300.000 plaquetas/ μ L) (259), una concentración media de 4,6 veces la concentración basal de plaquetas en sangre periférica de cordero joven (334). En concreto hemos administrado 3 dosis de 3 ml de un concentrado de plaquetas con una media de 590.240 plaquetas/ μ L, concentración comparable a la citada por Anitua y Sánchez (336).

Los concentrados de plaquetas englobados en el término PRP presentan diversas concentraciones de plaquetas dependiendo del protocolo de obtención que emplean. Weibrich evaluó las distintas concentraciones de plaquetas que se podían obtener (353) y clasificó los concentrados en PRP de baja concentración, de intermedia y de alta concentración. Este autor concluyó su estudio afirmando que los concentrados intermedios eran los que presentaban mejores capacidades de estimulación de la regeneración ósea, ya que habían encontrado un efecto paradójico de menor estimulación en los concentrados de mayor número de plaquetas. Siguiendo la clasificación de Weibrich los concentrados plaquetares implantados en nuestro proyecto se encuentran comprendidos en el grupo de concentración intermedia.

El PRGF™ ha sido empleado en trabajos experimentales con oveja de raza latxa de 22,4 kg de media, también a 1800 rpm y 8 minutos de centrifugado (289). Previamente, el grupo de Anitua había publicado un estudio con oveja adulta en el que se infiltraba con PRP el tendón de Aquiles para su posterior análisis histológico, el protocolo que se había empleado era 630 g durante 8 minutos (338).

Las distintas denominaciones de los concentrados de plaquetas es actualmente asunto polémico, ya que diversos autores han ido denominado a los concentrados mediante distintos acrónimos (253,254). Si bien presentan diferencias en sus técnicas de obtención y en la presencia o ausencia de leucocitos otros autores han destacado que la

diferente terminología dificulta es esclarecimiento de los efectos reales de estos concentrados de plaquetas (337).

El PRP se administró en las tres fases del procedimiento. Los trabajos de Kitoh describen la administración durante la fase de distracción con la adición a 4 ml de PRP a un cultivo de células de médula ósea expandida (320-324). Puesto que no hemos encontrado referenciado en otros trabajos en qué fase de la osteogénesis a distracción debiera administrarse el PRP, decidimos administrarlo en las fases de latencia y distracción. Decidimos no administrarlo en la fase de consolidación ya que no sabíamos si la administración de un volumen líquido en un tejido denso podía ser perjudicial para la propia regeneración ósea.

La administración del PRP se llevó a cabo con el cordero anestesiado o sedado y bajo control con el intensificador de imágenes radiológicas. Se valoró la posibilidad de emplear un marcador para comprobar que realmente depositábamos el contenido de la jeringa en el foco de osteotomía y no se difundía por las partes blandas adyacentes. Sin embargo pudimos comprobar en la revisión de la literatura científica relacionada que dicho marcaje no se empleaba de rutina, y que prácticamente todos los trabajos empleaban el control por intensificador de imágenes para comprobar el lugar correcto de infusión. En la Figura 234 se observa el método empleado por Abbaspour para la infusión de FGF-2 en el callo de osteogénesis a distracción en conejo. Este autor empleó tinta china en algunos casos para comprobar la eficacia de la inyección intrafocal guiada por control con intensificador de imágenes (189).

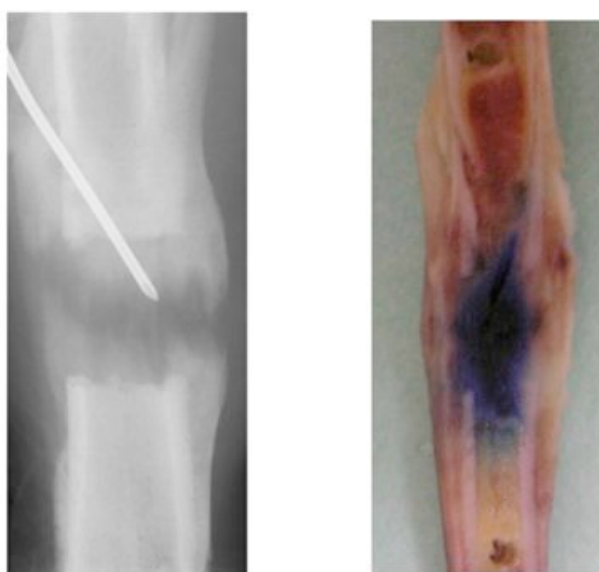


Figura 234. Técnica de Abbaspour para la infusión y marcaje con tinta china en osteogénesis a distracción (189).

La administración del PRP no ha comportado una tasa de complicaciones clínicas más elevada que la sucedida en el grupo control. Tanto el apoyo de la extremidad, como la presencia de complicaciones mecánicas e infección no presentaban diferencias estadísticamente significativas entre el grupo A (Control) y el B (PRP). Si bien la única infección profunda es en un caso del grupo del PRP, no creemos que ello sea relevante.

3. Efectos del PRP en la osteogénesis a distracción

La formación de hueso viene determinada fundamentalmente por dos vías de osificación: la intramembranosa y la endocondral. Ambas están presentes en la esqueletogénesis del embrión (108,109), en la reparación de fracturas (121,122) y en la osteogénesis a distracción (12,14,46-49,62).

Para algunos autores como Aronson e Ilizarov (12,14,46) la osteogénesis a distracción viene determinada sobre todo por osificación intramembranosa. Otros autores consideran que el cartílago también está presente en este proceso de formación ósea (47-49,62). Esta controversia ha sido punto de partida de algunos trabajos que han estudiado algunas variables que podrían modificar el tipo de osificación, como el trabajo de Kusec, que evaluaba la influencia en el tipo de osificación de la estabilidad mecánica proporcionada por diferentes tipos de fijador (335). Para este autor ambos tipos de osificación coexisten simultáneamente (“osificación tipo mixto”) con independencia del fijador externo empleado.

En nuestro estudio se ha valorado el tipo de osificación predominante, estimando inicialmente la presencia de cartílago en cada zona del callo, posteriormente valorando la osificación predominante global en el callo y finalmente valorando la superficie relativa de cartílago mediante la histomorfometría.

Los hallazgos histológicos sugieren que existe más cartílago en las zona Z2 de los casos del grupo B (PRP) y una presencia de más osificación de tipo mixto en los casos del grupo tratado con PRP. Sin embargo la valoración global del callo no revela diferencias estadísticamente significativas en el patrón de osificación.

En el estudio histomorfométrico se ha estudiado la superficie relativa de cartílago en el regenerado óseo. Aunque existen más casos del grupo B (PRP) que presentan algún porcentaje de cartílago, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A (Control) y B (PRP), lo cual concuerda con el resultado previamente mencionado.

El PRP ha sido estudiado como estimulador de la proliferación de varias estirpes celulares. Se ha estudiado in vitro los cultivos de condrocitos en medios con PRP (339). También se han llevado a cabo estudios experimentales animales en los que se ha obtenido crecimiento y proliferación de condrocitos articulares en presencia de PRP (340).

Y se ha observado in vitro la diferenciación de células mesenquimales a células tipo condrocito en presencia de PRP (341).

Otros autores han destacado el efecto estimulador del PRP en la proliferación in vitro de cultivos de osteoblastos y han sugerido su posible utilidad en la práctica clínica con injertos y sustitutos de injertos (342). También se ha descrito por estudios in vitro un efecto diferenciador de los osteoblastos (343).

La existencia de trabajos in vitro que demuestran la estimulación de los dos linajes derivados de células mesenquimales pluripotenciales dejan abierta la incógnita de cuál de estos linajes podría estimular in vivo el PRP en un modelo en el que coexisten ambos. En nuestro trabajo experimental no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tipo de osificación, sin embargo se evidencia en el estudio cualitativo de la histología de la Z2 un a mayor presencia de cartílago en esa zona, lo que podría responder a la incógnita planteada. Actualmente no hay trabajos experimentales en huesos largos que respondan a la pregunta de qué linaje celular se ve más estimulado por el PRP.

La osteogénesis es un proceso fundamentado en el equilibrio de una serie de variables (344). Estas variables son la presencia de células osteogénicas, la presencia de factores de crecimiento, de una estructura tridimensional osteoconductiva y un entorno biomecánico adecuado. Si bien deben ser considerados otros dos factores como son la vascularización y la biología del huésped. A este esquema se le ha denominado el “concepto de diamante” y refleja el carácter multifactorial de la osteogénesis (Figura 235) (122).

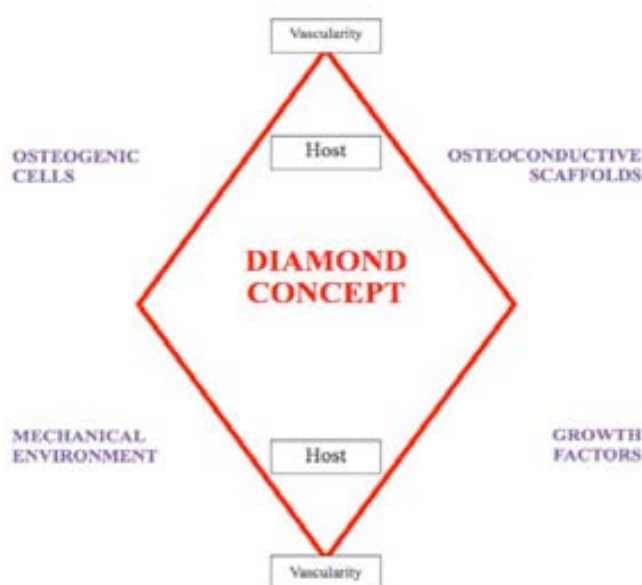


Figura 235. “Concepto de diamante” de la osteogénesis descrito por Giannoudis (344).

Las distintas estrategias terapéuticas orientadas a la estimulación de la osteogénesis deben considerar los aspectos incluidos en el anterior esquema. Este mismo concepto también es aplicable a la osteogénesis a distracción.

Algunos estudios para estimular la osteogénesis a distracción han estado relacionados con la evaluación de las variables biomecánicas influyentes, como el tipo de osteotomía, ritmo de distracción, tipo de fijador y régimen mecánico (21,24,27,25, 335).

También se ha intentado modificar el factor celular, añadiendo células mesenquimales pluripotenciales o células diferenciadas a preosteoblastos en callos de elongación (320-324,346).

Los estudios en los que se han intentado modificar la variable “factores de crecimiento” en osteogénesis a distracción incluyen infusión de diversas moléculas en el callo como hormona de Crecimiento (180,184), derivado de la vitamina D (ED-71) (181), TGF- β 1 (182), Proteína Osteogénica 1 (OP-1) (185), bifosfonatos (187,191), BMP-7 recombinante humana (188), Factor de Crecimiento Fibroblástico (189) o BMP-2 endógena (192).

Se han realizado trabajos experimentales en osteogénesis a distracción añadiendo distintas estructuras osteoconductoras (317,318), o empleando dichas estructuras como carrier o transportador de otras sustancias (188).

Nuestro trabajo pretende influir en la variable “factores de crecimiento” del “concepto de diamante” de la osteogénesis de Giannoudis (344), ya que a través del PRP se administraría una elevada concentración de factores de crecimiento. Las otras tres variables del esquema se mantendrían constantes por el diseño del estudio (biomecánica, células osteogénicas y estructura osteoconductoras) y al haber seleccionado un modelo experimental con similitud de los especímenes se habrían minimizado las diferencias entre huéspedes. Uno de los objetivos del estudio histológico de nuestro trabajo experimental es la descripción del efecto de los “factores de crecimiento” administrados sobre las demás variables del “concepto de diamante” de la osteogénesis de Giannoudis. Las variables modificables por los “factores de crecimiento” añadidos a través del PRP son la vascularización y la celularidad generadora de hueso.

El estudio histológico no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo A (Control) y el B (PRP) en la cuantificación de luces vasculares en ninguna de las tres zonas del callo de elongación. Tampoco ha mostrado diferencias

estadísticamente significativas entre el grupo A (Control) y el grupo B (PRP) en la cuantificación de osteoblastos en ninguna de las zonas del callo de elongación. De lo que se desprende que la administración del PRP en la osteogénesis a distracción de nuestro trabajo experimental no ha contribuido significativamente sobre las variables del “concepto de diamante” descrito por Giannoudis (344).

En un estudio que analizaba el efecto del PRP en defectos óseos de huesos planos se valoró el número de osteoblastos y osteoclastos a 1, 2, 3 y 6 meses tras la adición del PRP (277,281). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de osteoblastos y osteoclastos, pero sólo durante el primer mes del tratamiento con el PRP, en los siguientes meses no había diferencias. Los autores concluían que el efecto del PRP sería de muy corta duración, ya que a partir del 2º mes del aporte de PRP no había diferencias entre administrarlo o no hacerlo. El modelo experimental que emplearon fue la osteogénesis a distracción en mandíbula de perro, el protocolo de obtención del PRP fue el Harvest® y la concentración de plaquetas que obtuvieron estaba entre 800.000 y 1.000.000 plaquetas/ μ L. A diferencia de nuestro estudio valoraron el número de osteoblastos y osteoclastos de todo el regenerado óseo sin especificar qué zona del mismo era. Otro estudio clínico sí que encontró diferencias en el número de osteoblastos a favor del mayor número de osteoblastos en los casos tratados con PRP y células de médula ósea (302), la cantidad de plaquetas administradas era cercana a 1.000.000 plaquetas/ μ L. El análisis mediante biopsia del regenerado se llevaba al mes y medio de su implantación.

El proceso de la formación de hueso está íntimamente relacionado con la angiogénesis (347). Los vasos proporcionan las células mesenquimales pluripotenciales, incluidas las osteoprogenitoras y proporcionan una estructura sobre la que se organizará la formación del hueso Haversiano. Por último, proporciona el aporte de nutrientes, calcio, fosfato y hormonas necesarias para la mineralización.

Existe una compleja relación entre los osteoblastos y la formación de los vasos (347), también presente durante la osteogénesis a distracción (348). Los osteoblastos señalizan la situación de isquemia mediante el HIF (hipoxia inducible factor) y esta señal desencadena la formación de VEGF, que promueve la angiogénesis y la secreción por el endotelio de moléculas osteoinductoras (Figura 236).

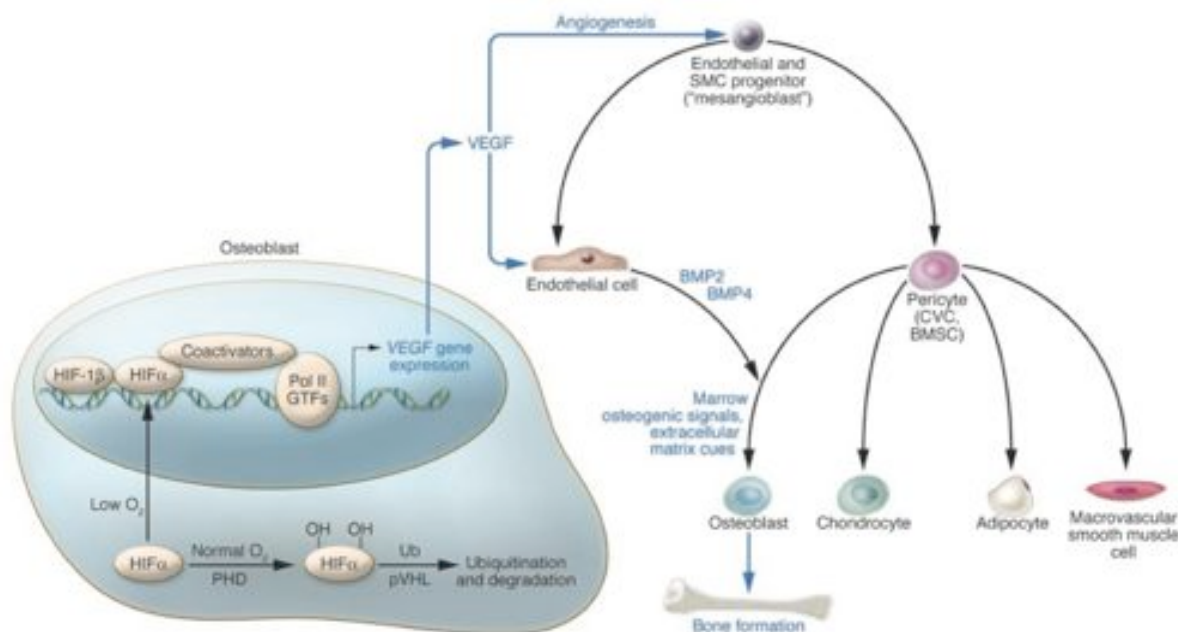


Figura 236. Esquema que muestra la relación entre el osteoblasto y la angiogénesis (347).

La administración aislada de VEGF en distintos modelos animales de osteogénesis ha mostrado un efecto estimulador en la formación de hueso y en la diferenciación de osteoblastos (349).

El VEGF en la osteogénesis a distracción parece estar especialmente presente en las primeras semanas tras la osteotomía y posteriormente disminuye quedando constante mientras dura la fase de distracción (350).

Se ha sugerido que la estimulación del PRP en la angiogénesis de diversos tejidos vendría determinada por la presencia de VEGF en el PRP (248,336). El grupo investigador de Sánchez y Anitua cuantificó la concentración de VEGF en el PRGF™ obtenido de 21 voluntarios sanos, obteniendo una concentración de VEGF de 383.0 pg/mL de media que estaba fuertemente correlacionada con la concentración de plaquetas en el PRGF™ obtenido en cada sujeto. En este estudio clínico se administró el PRGF™ durante la reparación del tendón de Aquiles.

Para evaluar la formación de nuevo tejido óseo se emplearon estudios radiológicos e histológicos. Los estudios radiológicos incluyeron estudios mediante radiología simple durante la fase de distracción y consolidación, junto con un estudio mediante tomografía computerizada al finalizar el procedimiento experimental.

El estudio mediante radiología simple en la fase de distracción observó la persistencia de la línea radiolúcida. Esta línea radiolúcida se puede observar en radiología

simple y traduce la presencia la existencia histológica de lo que se le denomina zona central de crecimiento (44,51,52). Ésta es una zona central de tejido fibroso mal vascularizado que mientras dura la distracción se imbrica en el tejido mineralizado adyacente. A medida que progresa la vascularización y la mineralización adyacente va estrechándose hasta desaparecer (13,44). La persistencia de la línea radiolúcida en la fase de distracción presentaba idéntica distribución en los grupos A (Control) y B (PRP) con 7 casos cada uno con línea radiolúcida persistente.

En la fase de consolidación la persistencia de la línea radiolúcida se había reducido a 2 casos del grupo A (Control) y 1 caso del grupo B (Control), sin que éstas fuesen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Desde los estudios de Ilizarov la radiología simple ha sido la prueba de diagnóstico por la imagen esencial para valorar la evolución de la regeneración ósea de la osteogénesis a distracción (351,352).

El estudio radiológico de modelos experimentales similares de osteogénesis a distracción presenta especial sensibilidad en la detección de la formación de hueso nuevo una vez terminada la fase de distracción (345). El estudio citado de Gil-Albarova está realizado con corderos de 2 meses de edad de raza churra, a los que se realizó una osteotomía diafisaria y posteriormente se distrajo hasta conseguir una distracción total de 2cm. La variable a estudio fue el tiempo de la fase de latencia (de 0 o de 10 días). La velocidad de distracción fue de 1mm/día y N de cada grupo fue de 12 corderos. Se realizaron estudios radiológicos simples en cada fase, y se observó que las diferencias entre los grupos fueron a partir del cese de la distracción, observándose callos hipoplásicos y persistencia de la línea radiolúcida en el grupo desfavorable (grupo con fase de latencia de 0 días).

En otro estudio de osteogénesis a distracción en corderos M. Aguirre destacó diferencias radiológicas en la fase de consolidación, observando más casos con ausencia de línea radiolúcida en aquellos casos favorecidos biomecánicamente (régimen de dinamización y biocompresión axial) (27).

Estos estudios y otros realizados en osteogénesis a distracción en corderos apoya la validez del estudio radiológico simple como método para observar la formación de hueso, especialmente tras la fase de distracción (25).

No obstante, se llevó a cabo un estudio más específico con TC de los fémures para valorar la formación de nuevo hueso. El estudio de la morfometría del callo de elongación tomaba una serie de variables como los diámetros coronales superior, central e inferior, así como sagital. Se realizó un estudio de las superficies de sección del callo a nivel superior, central e inferior. Otros autores han tomado referencias similares a la hora de cuantificar las dimensiones del regenerado óseo (189). Otros autores se han valido de la microTC para la evaluación del callo empleando variables más parecidas a las histomorfométricas, como la superficie trabecular o la distancia intertrabecular (192). Trabajos experimentales en osteogénesis a distracción de huesos planos han utilizado la TC para evaluar la regeneración ósea, aunque sin dimensionar el regenerado (315).

Aronson destacaba las posibilidades de cuantificación de las dimensiones del callo mediante la TC y la íntima relación de los hallazgos de la TC con las fases histológicas de la osteogénesis a distracción descritas por su grupo (46,352).

Nuestro estudio ha observado un engrosamiento de la diáfisis proximal y metáfisis distal en los casos del grupo B (PRP), más notable en el estudio de áreas que en el de diámetros coronales. No hemos encontrado más datos que nos ayuden a interpretar dicho resultado. Aronson describió mediante gammagrafía en la osteogénesis a distracción que la vascularización aumentaba en las 3 primeras semanas tras la osteotomía y posteriormente disminuye, normalizándose pasados meses (71). Desconocemos si una estimulación de la vascularización en fases precoces hubiera podido ser el mecanismo por el que se ha evidenciado un engrosamiento proximal y distal de los fémures tratados con PRP. Se podría hipotetizar un aumento de la vascularización de dicho segmento óseo, probablemente de origen perióstico, ya que la vascularización endóstica estudiada en el interior del regenerado óseo no ha evidenciado diferencias entre el grupo A (Control) y el B (PRP).

El estudio de las dimensiones del callo de elongación no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo A (Control) y el B (PRP). El diámetro coronal y sagital máximo está directamente relacionado con el volumen del callo de elongación, tal y como demostró M. Aguirre los callos con menor volumen de regenerado óseo presentaban una forma radiológica bicóncava con un diámetro máximo más pequeño que los callos con mayor regenerado (27).

Relacionado con el concepto de formación de tejido óseo está el concepto de maduración del regenerado óseo. Se había mencionado que la osteogénesis a distracción

presentaba cierto paralelismo con la esquelotogénesis y con la reparación de las fracturas (14,44,45,109,122). Ambos procesos presentan procesos de maduración con características radiológicas e histológicas identificables (355,356). En nuestro estudio evaluamos la maduración del regenerado óseo mediante varios sistemas. El paso de trabéculas por la zona central del callo representa una progresión del frente de mineralización y cierre de la zona central de crecimiento, lo que traduce una maduración del callo. Se evaluó el paso de trabéculas mediante radiología simple en la fase de maduración, mediante TC y mediante la histología simple. Tanto el estudio con radiología simple como la histología mostraron diferencias a favor de un mayor paso de trabéculas en el grupo B (PRP). El estudio con TC muestra una distribución de la variable ordinal “paso de trabéculas” sin diferencias entre los grupos e incluso con más casos sin paso de trabéculas en el grupo B (PRP). Esta inconsistencia entre los estudios nos hizo pensar en el carácter tridimensional del callo y que estos estudios se basaban en cortes en dos dimensiones, que no estaban realizados siempre en el mismo punto de corte. Por lo que cobró importancia la interpretación de que posiblemente no había diferencias reales teniendo en cuenta el callo en su conjunto y no sólo los cortes aislados.

El proceso de mineralización de una estructura es identificable TC, la densidad de dicha mineralización es cuantificable en Unidades Hounsfield. Por TC se realizó un estudio de densidad del tejido regenerado mediante UH para valorar la maduración del proceso de mineralización. Este tipo de análisis ha sido empleado por otros autores que han estudiado la maduración de un regenerado óseo en osteogénesis a distracción, tanto de hueso plano como de hueso largo (315,352). Sabíamos por los estudios de las variables biomecánicas de la elongación del fémur de cordero de la descripción de distintos tipos de callo en función de su forma y que esta forma traducía una mayor o menor regeneración (21,22,25,27,345). Por este motivo se realizó un estudio de la densidad por tercios y de modo global coronal y axial, en el cual no se encontraron diferencias entre el grupo A (Control) y el B (PRP) en la cuantificación de la densidad del regenerado óseo medido en UH.

Se estimó la maduración de las trabéculas óseas mediante dos sistemas. Se evaluó mediante una escala ordinal la madurez de las trabéculas presentes en cada zona (Z1,Z2 y Z3) observándose una distribución prácticamente similar en el grupo A (Control) y B (PRP). El segundo sistema empleado fue el cálculo del Volumen Relativo de Osteoide (%) por zona, no encontrándose diferencias entre los dos grupos.

La maduración de cada zona (Z1, Z2 y Z3) fue calculada mediante la asignación de una de las fases descritas por Aronson, desde la zona central de crecimiento hasta la zona de tubulización (46,52,71). No se encontraron diferencias en relación a la equivalencia con las fases biológicas de la osteogénesis a distracción entre los grupos A (Control) y B (PRP).

Finalmente empleamos unas escalas de maduración del callo para valorar el callo en su conjunto (354,355). Dichas escalas no tienen demasiada utilidad al evaluar callos del mismo tiempo de evolución, pero diferencian los callos que presentan estadios de remodelación. Una de las dos escalas detectó diferencias a favor de una mayor presencia de callos en estadio de remodelación en el grupo B (PRP), si bien también este grupo era el que tenía los callos con menor estadio evolutivo. Debido a estos resultados no podemos considerar que ningún grupo presente mayor estadio de maduración que el otro, ni en sus trabéculas, ni por zonas, ni globalmente.

Los conceptos de volumen de hueso regenerado y maduración del mismo tienen probablemente mayor importancia clínica que otros aspectos estudiados por este y otros trabajos experimentales. El volumen del regenerado está relacionado con las complicaciones del callo óseo. Probablemente de las complicaciones descritas en el capítulo correspondiente de la Introducción (1.5. Complicaciones de la osteogénesis a distracción) las únicas sobre las que cabría la posibilidad de un tratamiento de estimulación de la formación de hueso son aquellas relacionadas con la pobre formación de hueso, como son los retrasos de consolidación y las fracturas del regenerado. Ya que las demás complicaciones atienden más a la técnica quirúrgica que a la biología de la regeneración tisular. Cabe destacar que en el callo asientan gran parte de los problemas de estos procedimientos, para el grupo del Profesor Cañadell el 45% de las complicaciones se producían en el callo de elongación (75).

El sistema de fijación-distracción se suele mantener hasta obtener una consolidación del regenerado, lo cual puede alargarse en el tiempo. Podría entenderse que la mayor maduración del regenerado óseo pudiese acortar los períodos de consolidación y de llevar el fijador. Este último concepto es reflejado por el índice de consolidación, que se calcula dividiendo el número de días desde la osteotomía hasta la retirada del fijador entre el número de centímetros elongados. Una mayor maduración podría traducirse en la clínica en índices de consolidación menores. En nuestro estudio ha durado 40 días para todos los corderos, por lo que no tiene utilidad para nuestro estudio el manejo de este índice.

Por estos dos motivos hemos focalizado los estudios radiológicos e histológicos en la descripción y cuantificación del volumen del regenerado y su maduración. Probablemente agentes biológicos que no incidan en estas dos circunstancias no tendrán repercusión en la práctica clínica de la osteogénesis a distracción.

La literatura científica que evalúa el efecto del PRP en la regeneración ósea es confusa. Se caracteriza por una gran variabilidad en los modelos experimentales y clínicos, así como en el uso de distintos protocolos de obtención del PRP y en la denominación de estos concentrados de plaquetas. Esta última circunstancia ha motivado varias cartas y artículos de opinión sin llegar a consensos en su terminología (253,254,337). Estas controversias dificultan la evaluación crítica de los resultados. Varios de los artículos de revisión sobre el PRP citan trabajos experimentales o clínicos que han mostrado resultados favorables del PRP en regeneración ósea (244,256,297,354). Sin embargo también podemos encontrar trabajos sin efecto significativo (271,273,274,276,278,279,280,293), e incluso con efecto negativo en la regeneración ósea (313), que si bien no presentan mucha repercusión en la literatura sí cuestionan el efecto estimulador del PRP en la regeneración ósea. En la Tabla 31 se observan la relación de estudios experimentales de regeneración ósea y PRP y su correspondiente efecto en la regeneración.

Nuestro estudio experimental se encuadra dentro de los estudios que no han encontrado un efecto relevante de la administración repetida del PRP en la regeneración ósea. Hasta la fecha es el único estudio experimental que evalúa el efecto del PRP en un modelo de osteogénesis a distracción de huesos largos con mamífero grande.

Los estudios de Kawasumi y Kitoh habían valorado el efecto de distintas concentraciones de plaquetas en osteogénesis a distracción en rata (320). En este estudio experimental no se administraba PRP aislado, sino que se administraba con células de médula ósea cultivadas y expandidas durante 6 días hasta su administración. Los autores citados evaluaban la influencia de la concentración de plaquetas del PRP en la expansión celular del cultivo de células de médula ósea, y en su diferenciación osteogénica in vitro. Y posteriormente lo administraban al modelo animal, valorando el volumen del regenerado óseo con radiografía simple y TC. Observaron que las dosis más altas de plaquetas habían obtenido mayores expansiones celulares in vitro y mayores áreas del regenerado óseo in vivo. Sin embargo, la diferenciación osteogénica era superior en el grupo control. Resultados que entran en discordancia con los de Weibrich, que afirmaba que concentraciones muy altas de plaquetas eran contraproducentes en la osteogénesis

(353). No obstante el trabajo de Kawasumi y el de Weibrich difieren en que el trabajo japonés incluye la tecnología de cultivo y expansión de células de médula ósea, que puede que tenga un efecto sinérgico con el PRP. Nuestro estudio difiere del de Kawasumi y Kitoh en que el nuestro emplea un modelo animal de mamífero grande y en que evalúa el efecto aislado del PRP sobre la osteogénesis a distracción.

| Estudio | Tipo | Hueso | Resultado |
|-------------------|---------|-----------|---------------------------|
| Kim (269) | Perro | Mandíbula | Favorable |
| Aghaloo (270) | Conejo | Calota | Favorable con autoinjerto |
| Fürst (271) | Cerdos | Maxilar | No favorable |
| Yazawa (272) | Conejos | Calota | Favorable |
| Wiltfang (273) | Cerdo | Frontal | No favorable |
| Roldán (274) | Rata | Mandíbula | No favorable |
| Butterfield (276) | Conejo | Maxilar | No favorable |
| Gerard (277) | Perro | Mandíbula | No favorable (Temporal) |
| Miranda (278) | Conejo | Maxilar | No favorable |
| Plachoskova (279) | Rata | Calota | No favorable |
| Schlegeláka (280) | Minipig | Maxilar | No favorable |
| Gerard (281) | Perro | Mandíbula | No favorable (Temporal) |
| Rai (282) | Perro | Maxilar | Favorable |
| Messora (283) | Rata | Calota | Favorable |
| Nagata (287) | Conejo | Calota | No favorable (Temporal) |
| Gallo (289) | Oveja | Esternón | Favorable |
| Wylan (300) | Rata | Fémur | Favorable (Temporal) |
| Lucarelli (301) | Ovejas | Fémur | Favorable |
| Dallari (302) | Conejo | Tibia | Favorable (Temporal) |
| Gandhi (303) | Rata | Fémur | Favorable |
| Sarkar (304) | Oveja | Fémur | No favorable |
| Rai (305) | Rata | Fémur | Favorable |
| Hakimi (306) | Cerdo | Fémur | Favorable |
| Li (159) | Cerdos | Vértebra | No favorable |
| Scholz (308) | Ovejas | Vértebra | No favorable |
| Kawasumi (320) | Rata | Tibia | Favorable |

Tabla 31. Estudios experimentales de regeneración ósea con animales y el efecto registrado en la formación de hueso tras la adición de PRP.

4. Limitaciones del estudio

No puede obviarse el hecho de que muchos estudios hacen una valoración puntual de la regeneración ósea, es el caso de nuestro trabajo experimental. Llevar a cabo varias valoraciones en el tiempo implica una prolongación de la fase experimental y un notable incremento de los especímenes a estudiar. Destaca que varios estudios han reseñado la presencia de diferencias en los grupos a los que se les añadía PRP, pero sólo en las fases precoces. Es el caso del citado estudio de Gerard en el que sólo encontraba diferencias en la regeneración y proliferación de osteoblastos durante el primer mes (277, 281) o el del estudio de Nagata en el que se encontraban diferencias entre los grupos únicamente en el primer mes del estudio (287). Este carácter de temporalidad del efecto puede ser una de las limitaciones en el conocimiento del mecanismo de acción del PRP en la regeneración ósea, ya que el análisis en detalle es el de la fase de consolidación.

Podríamos considerar otra limitación de nuestro estudio la ausencia de estudio biomecánico de las piezas. Como se ha comentado, la intención última de la experimentación en la osteogénesis a distracción es la obtención de un regenerado óseo con unas propiedades biomecánicas que permitan que no se fracture tras la retirada del fijador. Estas propiedades se pueden valorar mediante pruebas biomecánicas. Sin embargo haber planteado estas pruebas hubiese supuesto aumentar los animales de experimentación, ya que estas pruebas consisten en aplicar fuerzas hasta la fractura del regenerado óseo, lo que luego impide su correcto análisis histológico.

El estudio histomorfométrico de otros estudios suele incluir más variables que informan de la madurez del regenerado óseo (44). Algunas de las variables que suele emplear la histomorfometría para evaluar la madurez están incluidas en nuestro estudio histológico, como el Volumen Relativo de Osteoide o la cuantificación de células (356). Por lo que parecía suficiente la cuantificación relativa de los principales componentes del regenerado para responder a los objetivos planteados en el estudios.

La cuantificación de la expresión de determinadas proteínas o factores de crecimiento hubiese tenido un valor en la interpretación del mecanismo de acción del PRP. Se han descrito los patrones de expresión de estas proteínas y factores de crecimiento a lo largo del proceso de osteogénesis a distracción (357,358). El hecho de que el análisis histológico de nuestro estudio se realizase en la misma fase (día 40 del procedimiento experimental) podía restar validez a los resultados del estudio de expresión proteica, ya que se desconocería la evolución de la expresión en las distintas fases.

La interferencia en uno solo de los aspectos involucrados en la regeneración ósea del esquema multifactorial de Giannoudis probablemente genera un estímulo parcial en la formación del hueso, en intensidad o en duración (122,344).

La integración de las terapias combinadas de distintos factores de crecimiento o concentrados de plaquetas y células mesenquimales ha aportado resultados favorables en osteogénesis a distracción, defectos óseos segmentarios e integración de aloinjertos (301,302,321). Sin embargo de nuestro estudio experimental no puede deducirse que la terapia únicamente con PRP afecte ni positiva ni negativamente a la osteogénesis a distracción.

Las futuras líneas de investigación en el campo de la regeneración ósea probablemente estén relacionadas con terapias de aporte celular o terapias combinadas, más que las terapias aisladas de factores de crecimiento (152).

CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos, las conclusiones de este estudio experimental son las siguientes:

1. En nuestro modelo experimental de osteogénesis a distracción la administración de PRP no ha modificado el tipo de osificación característico del callo de elongación manteniéndose un patrón mixto, intramembranoso y endocondral.
2. La administración de PRP en el foco de osteotomía en las fases de latencia y de distracción no ha incrementado ni la celularidad ni la neovascularización del callo de elongación, no estimulando la osteogénesis a distracción en nuestro modelo.
3. La administración aislada y reiterada de PRP en un foco de elongación ósea no ha acrecentado el callo ni acelerado su maduración en nuestro modelo, no demostrando una estimulación de la regeneración ósea en un régimen a distracción.
4. Los resultados obtenidos en nuestro estudio experimental no evidencian ningún efecto positivo del PRP sobre la regeneración del callo de elongación y por ello no respaldan el uso terapéutico en clínica humana del PRP como método para estimular la osteogénesis a distracción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wiedemann M. Callus distraction: A new method? A historical review of limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res* 1996, Jun(327):291-304.
2. Codivilla A. The classic: On the means of lengthening, in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. 1905. *Clin Orthop Relat Res* 2008, Dec;466(12):2903-9.
3. Magnuson PB. Lengthening shortened bones of the leg by operation. Ivory screws with removable heads as a means of holding the two bone fragments. *Surg Gynecol Obstet* 1913;17:63-71.
4. Fassett FJ. An inquiry as to the practicability of equalizing unequal legs by operation. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1918;2(9):277.
5. Paterson D. Leg-Lengthening procedures. A historical review. *Clin Orthop Relat Res* 1990, Jan(250):27-33.
6. Abbott LC. The operative lengthening of the tibia and fibula. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1927;9(1):128
7. White JW. A simplified method for tibial lengthening. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1930;12(1):
8. Compere EI. Indications for and against the leg-lengthening operation: Use of the tibial bone graft as a factor in preventing delayed union, non-union, or late fracture. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1936;18(3):692.
9. Glucksmann A. The role of mechanical stresses in bone formation in vitro. *Journal of Anatomy* 1942;76(Pt 3):231.
10. Anderson WV. Leg lengthening. *J Bone Joint Surg Br* 1952;34:150.
11. Westin GW. Femoral lengthening using a periosteal sleeve. Report on twenty-six cases. *J Bone Joint Surg Am* 1967, Jul;49(5):836-54.
12. Ilizarov GA. 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 Relat Res* 1989, Jan(238):249-81.
13. Ilizarov GA. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res* 1990, Jan(250):8-26.
14. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop Relat Res* 1989, Feb(239):263-85.
15. Wagner H. Operative lengthening of the femur. *Clin Orthop Relat Res* 1978;136:125.
16. Bastiani GD, Aldegheri R, Renzi-Brivio L, Trivella G. Limb lengthening by callus distraction (callotaxis). *Journal of Pediatric Orthopaedics* 1987;7(2):129.
17. Cañadell J, Forriol F, Cara JA. Removal of metaphyseal bone tumours with preservation of the epiphysis. Physeal distraction before excision. *J Bone Joint Surg Br* 1994, Jan;76(1):127-32.
18. Cañadell J, others. Elongación ósea: Aspectos clínicos y experimentales. *Revista Española De Cirugía Ortopédica Y Traumatología* 2003;47(04):283.
19. De Pablos J, Barrios C, Cañadell J. Leg lengthening by distraction through the callus of an arthrodesis. *J Bone Joint Surg Br* 1991, May;73(3):458-60.
20. Forriol F, Iglesias A, Arias M, Aquerreta D, Cañadell J. Relationship between radiologic morphology of the bone lengthening formation and its complications. *J Pediatr Orthop B* 1999, Oct;8(4):292-8.
21. Gil-Albarova J, de Pablos J, Franzeb M, Cañadell J. Delayed distraction in bone lengthening. Improved healing in lambs. *Acta Orthop Scand* 1992, Dec;63(6):604-6.

22. Gil-Albarova J, Melgosa M, Gil-Albarova O, Cañadell J. Soft tissue behavior during limb lengthening: An experimental study in lambs. *J Pediatr Orthop B* 1997, Oct;6(4):266-73.
23. Leyes M, Noonan KJ, Forriol F, Cañadell J. Statistical analysis of axial deformity during distraction osteogenesis of the tibia. *J Pediatr Orthop* 1998;18(2):190-7.
24. Noonan KJ, Leyes M, Forriol F, Cañadell J. Distraction osteogenesis of the lower extremity with use of monolateral external fixation. A study of two hundred and sixty-one femora and tibiae. *J Bone Joint Surg Am* 1998, Jun;80(6):793-806.
25. Arrien Araluze, Antón. Estudio comparativo de la osteotomía a cielo abierto y percutánea en la elongación de extremidades. Tesis Doctoral de la Universidad de Navarra dirigida por el Prof. Cañadell. 1986.
26. Cara del Rosal, Jose Antonio. Efecto de la vascularización sobre el callo de elongación óseo. Tesis Doctoral de la Universidad de Navarra dirigida por el Prof. Cañadell. 1992.
27. Aguirre Cañadell, Mario. Efectos de la dinamización axial sobre la consolidación ósea del callo de elongación. Tesis Doctoral de la Universidad de Navarra dirigida por el Prof. Cañadell. 1990.
28. Marangoz S, Feldman DS, Sala DA, Hyman JE, Vitale MG. Femoral deformity correction in children and young adults using taylor spatial frame. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2008;466(12):3018-24.
29. Rozbruch SR, Segal K, Ilizarov S, Fragomen AT, Ilizarov G. Does the taylor spatial frame accurately correct tibial deformities? *Clin Orthop Relat Res* 2010, May;468(5):1352-61.
30. Krieg AH, Speth BM, Foster BK. Leg lengthening with a motorized nail in adolescents : An alternative to external fixators? *Clin Orthop Relat Res* 2008, Jan;466(1):189-97.
31. Franke J, Hein G, Simon M, Hauch S. Comparison of distraction epiphyseolysis and partial metaphyseal corticotomy in leg lengthening. *Int Orthop* 1990;14(4):405-13.
32. Moseley. Leg length discrepancy. In: *New Reference*. ; 2001d. p. 1005-50.
33. Zarzycki D, Tesiorowski M, Zarzycka M, Kacki W, Jasiewicz B. Long-Term results of lower limb lengthening by physeal distraction. *J Pediatr Orthop* 2002;22(3):367-70.
34. Monticelli G, Spinelli R, Bonucci E. Distraction epiphysiolysis as a method of limb lengthening: II. Morphologic investigations. *Clin Orthop Relat Res* 1981;154:262.
35. Monticelli G, Spinelli R. Distraction epiphysiolysis as a method of limb lengthening: III. Clinical applications. *Journal of Pediatric Orthopaedics* 1981;1(3):352.
36. De Bastiani G, Aldegheri R, Renzi Brivio L, Trivella G. Chondrodiatasis-Controlled symmetrical distraction of the epiphyseal plate. Limb lengthening in children. *J Bone Joint Surg Br* 1986, Aug;68(4):550-6.
37. De Bastiani G, Aldegheri R, Renzi Brivio L, Trivella G. Limb lengthening by distraction of the epiphyseal plate. A comparison of two techniques in the rabbit. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 1986;68(4):545.
38. de Pablos J, Villas C, Canadell J. Bone lengthening by physial distraction. An experimental study. *Int Orthop* 1986;10(3):163-70.
39. Canadell J, de Pablos J. Correction of angular deformities by physeal distraction. *Clin Orthop Relat Res* 1992, Oct(283):98-105.
40. de Pablos J, Canadell J. Experimental physeal distraction in immature sheep. *Clin Orthop Relat Res* 1990, Jan(250):73-80.
41. Bost Fc, Larsen Lj. Experiences with lengthening of the femur over n intramedullary rod. *J Bone Joint Surg Am* 1956, Jun;38-A(3):567-84.

42. Baumann F, Harms J. [The extension nail. A new method for lengthening of the femur and tibia (author's transl)]. *Arch Orthop Unfallchir* 1977, Dec 9;90(2):139-46.
43. García-Cimbrelo E, Curto de la Mano A, García-Rey E, Cordero J, Marti-Ciruelos R. The intramedullary elongation nail for femoral lengthening. *J Bone Joint Surg Br* 2002, Sep;84(7):971-7.
44. Welch RD, Birch JG, Makarov MR, Samchukov ML. Histomorphometry of distraction osteogenesis in a caprine tibial lengthening model. *J Bone Miner Res* 1998, Jan;13(1):1-9.
45. Stallings JT, Lewis DD, Welch RD, Samchukov M, Marcellin-Little DJ. An introduction to distraction osteogenesis and the principles of the ilizarov method. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 1998;11:59-67.
46. Aronson J, Shen X. Experimental healing of distraction osteogenesis comparing metaphyseal with diaphyseal sites. *Clin Orthop Relat Res* 1994, Apr(301):25-30.
47. Yasui N, Kawabata H, Kojimoto H, Ohno H, Matsuda S, Araki N, et al. Lengthening of the lower limbs in patients with achondroplasia and hypochondroplasia. *Clin Orthop Relat Res* 1997;344:298.
48. Fink B, Pollnau C, Vogel M, Skripitz R, Enderle A. Histomorphometry of distraction osteogenesis during experimental tibial lengthening. *J Orthop Trauma* 2003, Feb;17(2):113-8.
49. Kojimoto H, Yasui N, Goto T, Matsuda S, Shimomura Y. Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 1988;70(4):543.
50. Delloye C, Delefortrie G, Coutelier L, Vincent A. Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening: An experimental study. *Clin Orthop Relat Res* 1990;250:34.
51. Aronson J. Modulation of distraction osteogenesis in the aged rat by fibroblast growth factor. *Clin Orthop Relat Res* 2004, Aug(425):264-83.
52. Aronson J, Harp JH. Factors influencing the choice of external fixation for distraction osteogenesis. *Instr Course Lect* 1990;39:175-83.
53. Paley D. The correction of complex foot deformities using ilizarov's distraction osteotomies. *Clin Orthop Relat Res* 1993, Aug(293):97-111.
54. Kawamura B, HoSoNo S, Takahashi T, YANO T, Kobayashi Y, Shibata N, Shinoda Y. Limb lengthening by means of subcutaneous osteotomy: Experimental and clinical studies. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1968;50(5):851.
55. Klapp F. Precursors of the ilizarov technique. *Injury* 1993;24 Suppl 2:S25-8.
56. Moseley CF. Leg lengthening: The historical perspective. *Orthop Clin North Am* 1991, Oct;22(4):555-61.
57. Paley D, Tetsworth K. Percutaneous osteotomies. Osteotome and gigli saw techniques. *Orthop Clin North Am* 1991, Oct;22(4):613-24.
58. Schwartzman V, Schwartzman R. Corticotomy. *Clin Orthop Relat Res* 1992;280:37.
59. Frierson M, Ibrahim K, Boles M, Boté H, Ganey T. Distraction osteogenesis. A comparison of corticotomy techniques. *Clin Orthop Relat Res* 1994, Apr(301):19-24.
60. Folkerts C, Henry S, Kovelman HF, Lentz P, Paley D, Boland E. Rehabilitation of the ilizarov patient. *Rehab Management* ;5(6):126.
61. Fischgrund J, Paley D, Suter C. Variables affecting time to bone healing during limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res* 1994, Apr(301):31-7.
62. White SH, Kenwright J. The importance of delay in distraction of osteotomies. *Orthop Clin North Am* 1991, Oct;22(4):569-79.

63. Aldegheri R, Renzi-Brivio L, Agostini S. The callotasis method of limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res* 1989;241:137.
64. Elkins AD, Morandi M, Zembo M. Distraction osteogenesis in the dog using the ilizarov external ring fixator. *Journal (USA)* 1993.
65. Lewis Dd, Bronson Dg, Samchukov Ml, Welch Rd, Stallings Jt. Biomechanics of circular external skeletal fixation. *Veterinary Surgery* 1998;27(5):454-64.
66. Rahn BA. Bone healing: Histologic and physiologic concepts. *Bone in Clinical Orthopaedics. A Study in Comparative Osteology* Ed Sumner-Smith G., WB Saunders Company 1982:335-86.
67. Yasui N, Kojimoto H, Shimizu H, Shimomura Y. The effect of distraction upon bone, muscle, and periosteum. *Orthop Clin North Am* 1991, Oct;22(4):563-7.
68. Ippolito E, Peretti G, Bellocchi M, Farsetti P, Tudisco C, Caterini R, De Martino C. Histology and ultrastructure of arteries, veins, and peripheral nerves during limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res* 1994, Nov(308):54-62.
69. Mizumoto Y, Mizuta H, Nakamura E, Takagi K. Tibial nerve function during tibial lengthening: Measurement of nerve conduction and blood flow in rabbits. *Acta Orthop* 1995;66(3):275-7.
70. Ganey TM, Klotch DW, Sasse J, Ogden JA, Garcia T. Basement membrane of blood vessels during distraction osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1994, Apr(301):132-8.
71. Aronson J, Harp JH. Mechanical forces as predictors of healing during tibial lengthening by distraction osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1994;301:73.
72. Makarov MR, Kochutina LN, Samchukov ML, Birch JG, Welch RD. Effect of rhythm and level of distraction on muscle structure: An animal study. *Clin Orthop Relat Res* 2001, Mar(384):250-64.
73. Lee DY, Choi IH, Chung CY, Chung PH, Chi JG, Suh YL. Effect of tibial lengthening on the gastrocnemius muscle: A histopathologic and morphometric study in rabbits. *Acta Orthop* 1993;64(6):688-92.
74. Paley D. Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the ilizarov technique. *Clin Orthop Relat Res* 1990;250:81.
75. Aquerreta JD, Forriol F, Canadell J. Complications of bone lengthening. *Int Orthop* 1994;18(5):299-303.
76. Eldridge JC, Bell DF. Problems with substantial limb lengthening. *Orthop Clin North Am* 1991;22(4):625-31.
77. García-Cimbreló E, Olsen B, Ruiz-Yagüe M, Fernandez-Baíllo N, Munuera-Martínez L. Ilizarov technique. Results and difficulties. *Clin Orthop Relat Res* 1992, Oct(283):116-23.
78. Dahl MT, Gulli B, Berg T. Complications of limb lengthening. A learning curve. *Clin Orthop Relat Res* 1994, Apr(301):10-8.
79. Pettine KA, Chao E, Kelly PJ. Analysis of the external fixator pin-bone interface. *Clin Orthop Relat Res* 1993;293:18.
80. Green SA. Complications of pin and wire external fixation. *Instr Course Lect* 1990;39:219.
81. Uthoff HK. Mechanical factors influencing the holding power of screws in compact bone. *J Bone Joint Surg Br* 1973, Aug;55(3):633-9.
82. The response of mature cortical bone to controlled time-varying loading; Mechanical properties of bone: Presented at the joint ASME-ASCE applied mechanics, fluids engineering, and bioengineering conference, boulder, colorado, june 22-24, 1981. 1981i.
83. Schatzker J, Horne JG, Sumner-Smith G. The effect of movement on the holding power of screws in bone. *Clin Orthop Relat Res* 1975, Sep(111):257-62.

84. Blachut PA, Meek RN, O'Brien PJ. External fixation and delayed intramedullary nailing of open fractures of the tibial shaft. A sequential protocol. *J Bone Joint Surg Am* 1990, Jun;72(5):729-35.
85. Leyes. Analisis y prevención de las desviaciones axiales en las elongaciones de las extremidades inferiores. Tesis doctoral de la universidad de navarra. New Reference 1996.
86. Glorion C, Pouliquen JC, Langlais J, Ceolin JL, Kassis B. Femoral lengthening using the callotasis method: Study of the complications in a series of 70 cases in children and adolescents. *J Pediatr Orthop* 1996;16(2):161-7.
87. Lehman WB, Grant AD, Atar D. Preventing and overcoming equinus contractures during lengthening of the tibia. *Orthop Clin North Am* 1991, Oct;22(4):633-41.
88. Dal Monte A, Donzelli O. Tibial lengthening according to ilizarov in congenital hypoplasia of the leg. *J Pediatr Orthop* 1987;7(2):135-8.
89. Vilarrubias JM, Ginebreda I, Jimeno E. Lengthening of the lower limbs and correction of lumbar hyperlordosis in achondroplasia. *Clin Orthop Relat Res* 1990, Jan(250):143-9.
90. Vilarrubias. Elongación global de la talla en los acondroplásicos. Tesis doctoral de la universidad autónoma de barcelona. Tesis Doctoral 1998.
91. Simpson AH, Williams PE, Kyberd P, Goldspink G, Kenwright J. The response of muscle to leg lengthening. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 1995;77(4):630.
92. Maffulli N, Fixsen JA. Muscular strength after callotasis limb lengthening. *J Pediatr Orthop* 1995;15(2):212-6.
93. Galardi G, Comi G, Lozza L, Marchettini P, Novarina M, Facchini R, Paronzini A. Peripheral nerve damage during limb lengthening. *Neurophysiology in five cases of bilateral tibial lengthening. J Bone Joint Surg Br* 1990, Jan;72(1):121-4.
94. Velazquez RJ, Bell DF, Armstrong PF, Babyn P, Tibshirani R. Complications of use of the ilizarov technique in the correction of limb deformities in children. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1993;75(8):1148.
95. Stanitski DF. The effect of limb lengthening on articular cartilage. An experimental study. *Clin Orthop Relat Res* 1994, Apr(301):68-72.
96. Jones DC, Moseley CF. Subluxation of the knee as a complication of femoral lengthening by the wagner technique. *J Bone Joint Surg Br* 1985, Jan;67(1):33-5.
97. Cañadell J, Aquerreta D, Forriol F. Prospective study of bone lengthening. *Journal of Pediatric Orthopaedics B* 1993;2(1):1.
98. Olney BW, Jayaraman G. Joint reaction forces during femoral lengthening. *Clin Orthop Relat Res* 1994;301:64.
99. Aldegheri R. Distraction osteogenesis for lengthening of the tibia in patients who have limb-length discrepancy or short stature. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1999;81(5):624.
100. Eyres KS, Saleh M, Kanis JA. Effect of pulsed electromagnetic fields on bone formation and bone loss during limb lengthening. *Bone* 1996, Jun;18(6):505-9.
101. Dahl MT, Fischer DA. Lower extremity lengthening by wagner's method and by callus distraction. *Orthop Clin North Am* 1991, Oct;22(4):643-9.
102. Harp JH, Aronson J, Hollis M. Noninvasive determination of bone stiffness for distraction osteogenesis by quantitative computed tomography scans. *Clin Orthop Relat Res* 1994, Apr(301):42-8.
103. Hughes TH, Maffulli N, Green V, Fixsen JA. Imaging in bone lengthening: A review. *Clin Orthop Relat Res* 1994;308:50.

104. Aldegheri R, Trivella G, Lavini F. Epiphyseal distraction. Hemichondrodiatasis. Clin Orthop Relat Res 1989, Apr(241):128-36.
105. Yun AG, Severino R, Reinker K. Attempted limb lengthenings beyond twenty percent of the initial bone length: Results and complications. J Pediatr Orthop 2000;20(2):151-9.
106. Sarmiento A, Sobol PA, Sew Hoy AL, Ross SD, Racette WL, Tarr RR. Prefabricated functional braces for the treatment of fractures of the tibial diaphysis. J Bone Joint Surg Am 1984, Dec;66(9):1328-39.
107. Yasui N, Kojimoto H, Sasaki K, Kitada A, Shimizu H, Shimomura Y. Factors affecting callus distraction in limb lengthening. Clin Orthop Relat Res 1993, Aug(293):55-60.
108. Karaplis. Principles of bone biology. In: Chapter 3. Embryonic Development of Bone and the Molecular Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation. ; 2002j.
109. Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: Condensations and the initiation of skeletal development. Bioessays 2000, Feb;22(2):138-47.
110. Burke AC. HOX genes and the global patterning of the somitic mesoderm. Curr Top Dev Biol 2000;47:155-81.
111. McGrew MJ, Dale JK, Fraboulet S, Pourquié O. The lunatic fringe gene is a target of the molecular clock linked to somite segmentation in avian embryos. Curr Biol 1998, Aug 27;8(17):979-82.
112. Yoon JK, Wold B. The bhlh regulator pmesogenin1 is required for maturation and segmentation of paraxial mesoderm. Genes Dev 2000, Dec 15;14(24):3204-14.
113. Veraksa A, Del Campo M, McGinnis W. Developmental patterning genes and their conserved functions: From model organisms to humans. Mol Genet Metab 2000, Feb;69(2):85-100.
114. Fan CM, Tessier-Lavigne M. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: Evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. Cell 1994, Dec 30;79(7):1175-86.
115. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, et al. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-a receptor-deficient mice. Development 1998, Mar;125(5):813-24.
116. Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, et al. Fgf10 is essential for limb and lung formation. Nat Genet 1999, Jan;21(1):138-41.
117. Zakany J, Duboule D. HOX genes in digit development and evolution. Cell Tissue Res 1999;296(1):19-25.
118. Chimal-Monroy J, Díaz de León L. Expression of n-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by tgf-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilaginous condensations. Int J Dev Biol 1999, Jan;43(1):59-67.
119. Loeser RF. Chondrocyte integrin expression and function. Biorheology 2000;37(1):109-16.
120. Ducy P, Karsenty G. Genetic control of cell differentiation in the skeleton. Current Opinion in Cell Biology 1998;10(5):614-9.
121. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. Injury 2005, Nov;36 Suppl 3:S5-7.
122. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: The diamond concept. Injury 2007, Sep;38 Suppl 4:S3-6.
123. Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. J Bone Joint Surg Am 1991, Jul;73(6):832-47.
124. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. Journal of Bone and Mineral Research 1995;10(8):1272-81.

125. Lind M, Schumacker B, Søballe K, Keller J, Melsen F, Bünger C. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand* 1993, Oct;64(5):553-6.
126. Trippel SB. Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998, Oct(355 Suppl):S301-13.
127. Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 1998, Oct;283:2-37.
128. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J Cell Physiol* 1989;140(3):530-7.
129. Simon AM, Manigrasso MB, O'Connor JP. Cyclo-Oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002, Jun;17(6):963-76.
130. Gaston MS, Simpson AH. Inhibition of fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89(12):1553.
131. Meyer RA, Meyer MH, Tenholder M, Wondracek S, Wasserman R, Garges P. Gene expression in older rats with delayed union of femoral fractures. *J Bone Joint Surg Am* 2003, Jul;85-A(7):1243-54.
132. Macey LR, Kana SM, Jingushi S, Terek RM, Borretos J, Bolander ME. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. *J Bone Joint Surg Am* 1989, Jun;71(5):722-33.
133. Heppenstall RB, Brighton CT. Fracture healing in the presence of anemia. *Clin Orthop Relat Res* 1977(123):253-8.
134. Hayda RA, Brighton CT, Esterhai Jr JL. Pathophysiology of delayed healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998;355:S31.
135. Dickson K, Katzman S, Delgado E, Contreras D. Delayed unions and nonunions of open tibial fractures. Correlation with arteriography results. *Clin Orthop Relat Res* 1994, May(302):189-93.
136. Urabe K, Hotokebuchi T, Oles KJ, Bronk JT, Jingushi S, Iwamoto Y, Bolander ME. Inhibition of endochondral ossification during fracture repair in experimental hypothyroid rats. *J Orthop Res* 1999, Nov;17(6):920-5.
137. Murnaghan M, Li G, Marsh DR. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced fracture nonunion: An inhibition of angiogenesis? *J Bone Joint Surg Am* 2006, Nov;88 Suppl 3:140-7.
138. Waters RV, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Avnur Z, Hill E, Bostrom M. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthop Scand* 2000, Jun;71(3):316-21.
139. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999, Dec 3;286(5446):1946-9.
140. Isefuku S, Joyner CJ, Simpson AH. Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis. *J Orthop Trauma* 2003, Mar;17(3):212-6.
141. Huddleston PM, Steckelberg JM, Hanssen AD, Rouse MS, Bolander ME, Patel R. Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 2000, Feb;82(2):161-73.
142. Street JT, McGrath M, O'Regan K, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. Thromboprophylaxis using a low molecular weight heparin delays fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 2000, Dec(381):278-89.
143. Porter SE, Hanley Jr EN. The musculoskeletal effects of smoking. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2001;9(1):9.
144. Chakkalakal DA. Alcohol-Induced bone loss and deficient bone repair. *Alcohol Clin Exp Res* 2005, Dec;29(12):2077-90.

145. Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ. Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res* 1997, Jul;15(4):577-84.
146. Kregor PJ, Senft D, Parvin D, Campbell C, Toomey S, Parker C, et al. Cortical bone perfusion in plated fractured sheep tibiae. *J Orthop Res* 1995, Sep;13(5):715-24.
147. Grundnes O, Utvag SE, Reikeras O. Effects of graded reaming on fracture healing: Blood flow and healing studied in rat femurs. *Acta Orthop* 1994;65(1):32-6.
148. Kenwright J, Goodship AE. Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. *Clin Orthop Relat Res* 1989, Apr(241):36-47.
149. De Long WG, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, Watson T. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am* 2007, Mar;89(3):649-58.
150. Delloye C, Cornu O, Druez V, Barbier O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br* 2007, May;89(5):574-9.
151. Urist MR, Peltier LF. Bone: Formation by autoinduction. *Clin Orthop Relat Res* 2002;395:4.
152. Lee EH, Hui JHP. The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 2006;88(7):841.
153. Ebraheim NA, Elgafy H, Xu R. Bone-Graft harvesting from iliac and fibular donor sites: Techniques and complications. *J Am Acad Orthop Surg* 2001;9(3):210-8.
154. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res* 1996;329:300.
155. Dodd CA, Fergusson CM, Freedman L, Houghton GR, Thomas D. Allograft versus autograft bone in scoliosis surgery. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 1988;70(3):431.
156. Ortiz-Cruz E, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Mankin HJ. The results of transplantation of intercalary allografts after resection of tumors. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Am* 1997, Jan;79(1):97-106.
157. Hofmann GO, Kirschner MH, Wangemann T, Falk C, Mempel W, Hammer C. Infections and immunological hazards of allogeneic bone transplantation. *Arch Orthop Trauma Surg* 1995;114(3):159-66.
158. Jinnou T, Miric A, Feighan J, Kirk SK, Davy DT, Stevenson S. The effects of processing and low dose irradiation on cortical bone grafts. *Clin Orthop Relat Res* 2000, Jun(375):275-85.
159. Li H, Zou X, Xue Q, Egund N, Lind M, Büniger C. Anterior lumbar interbody fusion with carbon fiber cage loaded with bioceramics and platelet-rich plasma. An experimental study on pigs. *Eur Spine J* 2004, Jul;13(4):354-8.
160. Khan SN, Fraser JF, Sandhu HS, Cammisa FP, Girardi FP, Lane JM. Use of osteopromotive growth factors, demineralized bone matrix, and ceramics to enhance spinal fusion. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13(2):129-37.
161. McKee MD. Management of segmental bony defects: The role of osteoconductive orthobiologics. *J Am Acad Orthop Surg* 2006;14(10 Spec No.):S163-7.
162. Elsinger EC, Leal L. Coralline hydroxyapatite bone graft substitutes. *The Journal of Foot and Ankle Surgery* 1996;35(5):396-9.
163. Dawson E, Bae HW, Burkus JK, Stambough JL, Glassman SD. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 on an absorbable collagen sponge with an osteoconductive bulking agent in posterolateral arthrodesis with instrumentation. A prospective randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 2009, Jul;91(7):1604-13.
164. Cammisa FP, Lowery G, Garfin SR, Geisler FH, Klara PM, McGuire RA, et al. Two-Year fusion rate equivalency between grafton DBM gel and autograft in posterolateral spine fusion: A

prospective controlled trial employing a side-by-side comparison in the same patient. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004, Mar 15;29(6):660-6.

165. Jones AL, Bucholz RW, Bosse MJ, Mirza SK, Lyon TR, Webb LX, et al. Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am* 2006, Jul;88(7):1431-41.

166. McKay B, Sandhu HS. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spinal fusion applications. *Spine (Phila Pa 1976)* 2002;27(16S):S66.

167. Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, Esterhai JL, Goulet J, Jones A, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am* 2006, Jun;88(6):1258-65.

168. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions: A prospective, randomized clinical trial comparing rhop-1 with fresh bone autograft. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 2001;83(Supplement 1, Part 2):S151.

169. Patterson TE, Kumagai K, Griffith L, Muschler GF. Cellular strategies for enhancement of fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 2008, Feb;90 Suppl 1:111-9.

170. Lindholm TS, Urist MR. A quantitative analysis of new bone formation by induction in compositive grafts of bone marrow and bone matrix. *Clin Orthop Relat Res* 1980(150):288-300.

171. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: Practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res* 2002, Feb(395):66-80.

172. Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *J Bone Joint Surg Am* 1989, Jun;71(5):684-91.

173. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1998, Jul;80(7):985-96.

174. Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, Kambic H, et al. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res* 2003, Feb(407):102-18.

175. Garg NK, Gaur S. Percutaneous autogenous bone-marrow grafting in congenital tibial pseudarthrosis. *J Bone Joint Surg Br* 1995, Sep;77(5):830-1.

176. Wientroub S, Goodwin D, Khermash O, Salama R. The clinical use of autologous marrow to improve osteogenic potential of bone grafts in pediatric orthopedics. *J Pediatr Orthop* 1989;9(2):186-90.

177. Goel A, Sangwan SS, Siwach RC, Ali AM. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury* 2005, Jan;36(1):203-6.

178. Hernigou P, Beaujean F. [Pseudarthrosis treated by percutaneous autologous bone marrow graft]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 1997;83(6):495-504.

179. Magit DP, Maak T, Trioano N, Raphael B, Hamouria Q, Polzhofer G, et al. Healos/recombinant human growth and differentiation factor-5 induces posterolateral lumbar fusion in a new zealand white rabbit model. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006, Sep 1;31(19):2180-8.

180. Raschke MJ, Bail H, Windhagen HJ, Kolbeck SF, Weiler A, Raun K, et al. Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. *Bone* 1999, Feb;24(2):81-8.

181. Yamane K, Okano T, Kishimoto H, Hagino H. Effect of ED-71 on modeling of bone in distraction osteogenesis. *Bone* 1999, Mar;24(3):187-93.

182. Rauch F, Lauzier D, Travers R, Glorieux F, Hamdy R. Effects of locally applied transforming growth factor-beta1 on distraction osteogenesis in a rabbit limb-lengthening model. *Bone* 2000, Jun;26(6):619-24.
183. Subasi M, Kapukaya A, Kesemenli C, Balci TA, Buyukbayram H, Ozates M. Effect of chemotherapeutic agents on distraction osteogenesis. An experimental investigation in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001, Jul;121(7):417-21.
184. Bail HJ, Raschke MJ, Kolbeck S, Krummrey G, Windhagen HJ, Weiler A, et al. Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. *Bone* 2002, Jan;30(1):117-24.
185. Hamdy RC, Amako M, Beckman L, Kawaguchi M, Rauch F, Lauzier D, Steffen T. Effects of osteogenic protein-1 on distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 2003, Aug;33(2):248-55.
186. Tsuchiya H, Uehara K, Sakurakichi K, Watanabe K, Matsubara H, Tomita K. Distraction osteogenesis after irradiation in a rabbit model. *J Orthop Sci* 2005, Nov;10(6):627-33.
187. Takahashi M, Yukata K, Matsui Y, Abbaspour A, Takata S, Yasui N. Bisphosphonate modulates morphological and mechanical properties in distraction osteogenesis through inhibition of bone resorption. *Bone* 2006, Sep;39(3):573-81.
188. Sailhan F, Chotel F, Chousta A, Viguier E, Boivin G. Unexpected absence of effect of rhbmp-7 on distraction osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 2007, Apr;457:227-34.
189. Abbaspour A, Takata S, Sairyo K, Katoh S, Yukata K, Yasui N. Continuous local infusion of fibroblast growth factor-2 enhances consolidation of the bone segment lengthened by distraction osteogenesis in rabbit experiment. *Bone* 2008, Jan;42(1):98-106.
190. Zheng LW, Ma L, Cheung LK. Changes in blood perfusion and bone healing induced by nicotine during distraction osteogenesis. *Bone* 2008, Aug;43(2):355-61.
191. Abbaspour A, Takahashi M, Sairyo K, Takata S, Yukata K, Inui A, Yasui N. Optimal increase in bone mass by continuous local infusion of alendronate during distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 2009, May;44(5):917-23.
192. Alam N, St-Arnaud R, Lauzier D, Rosen V, Hamdy RC. Are endogenous bmps necessary for bone healing during distraction osteogenesis? *Clin Orthop Relat Res* 2009, Dec;467(12):3190-8.
193. Hübler R, Blando E, Gaião L, Kreisner PE, Post LK, Xavier CB, de Oliveira MG. Effects of low-level laser therapy on bone formed after distraction osteogenesis. *Lasers Med Sci* 2010, Mar;25(2):213-9.
194. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 2008;13:3532.
195. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgár J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: Insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood* 2000, Nov 15;96(10):3334-42.
196. Furie BC, Furie B. Tissue factor pathway vs. Collagen pathway for in vivo platelet activation. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36(2):135-8.
197. Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 1990;21(1):199.
198. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone: Biology and clinical applications. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 2002;84(6):1032.
199. Nielsen HM, Andreassen TT, Ledet T, Oxlund H. Local injection of tgf-beta increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 1994, Feb;65(1):37-41.
200. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1992;200(2):165-70.
201. Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Cárcamo J, Harland RM, Massagué J. A human mad protein acting as a bmp-regulated transcriptional activator. *Nature* 1996, Jun 13;381(6583):620-3.

202. Bourque WT, Gross M, Hall BK. Expression of four growth factors during fracture repair. *Int J Dev Biol* 1993;37(4):573.
203. Ong JL, Carnes DL, Sogal A. Effect of transforming growth factor-beta on osteoblast cells cultured on 3 different hydroxyapatite surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14(2):217-25.
204. Adamo CT, Mailhot JM, Smith AK, Borke JL. Connexin-43 expression in oral-derived human osteoblasts after transforming growth factor-beta and prostaglandin E2 exposure. *J Oral Implantol* 2001;27(1):25-31.
205. Antoniades HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Kiritsy CP, Lynch SE. Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mrnas in skin epithelial cells and PDGF mrna in connective tissue fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, Jan 15;88(2):565-9.
206. Antoniades HN. Human platelet-derived growth factor (PDGF): Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, Dec;78(12):7314-7.
207. Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE. The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone* 1995, May;16(5):521-7.
208. Hong L, Tabata Y, Miyamoto S, Yamada K, Aoyama I, Tamura M, et al. Promoted bone healing at a rabbit skull gap between autologous bone fragment and the surrounding intact bone with biodegradable microspheres containing transforming growth factor-beta1. *Tissue Eng* 2000, Aug;6(4):331-40.
209. Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. Bone morphogenetic proteins: An update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 1999, Mar;17(2):269-78.
210. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9(1):49-61.
211. Shafritz AB, Shore EM, Gannon FH, Zasloff MA, Taub R, Muenke M, Kaplan FS. Overexpression of an osteogenic morphogen in fibrodysplasia ossificans progressiva. *N Engl J Med* 1996, Aug 22;335(8):555-61.
212. Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 1995, Nov 15;9(22):2808-20.
213. Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 1995, Nov 15;9(22):2795-807.
214. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 1988, Dec 16;242(4885):1528-34.
215. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop Relat Res* 1994, Apr(301):302-12.
216. Sciadini MF, Johnson KD. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res* 2000, Mar;18(2):289-302.
217. Bostrom MPG, Camacho NP. Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998;355:S274.
218. Trippel SB, Coutts RD, Einhorn TA, Mundy GR, Rosenfeld RG. Instructional course lectures, the american academy of orthopaedic surgeons-growth factors as therapeutic agents*dagger. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1996;78(8):1272.
219. Bak B, Jørgensen PH, Andreassen TT. Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand* 1990, Feb;61(1):54-7.

220. Carpenter JE, Hipp JA, Gerhart TN, Rudman CG, Hayes WC, Trippel SB. Failure of growth hormone to alter the biomechanics of fracture-healing in a rabbit model. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1992;74(3):359.
221. Iglhaut J, Aukhil I, Simpson DM, Johnston MC, Koch G. Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. *J Periodontol Res* 1988, Mar;23(2):107-17.
222. Thaller SR, Lee TJ, Armstrong M, Tesluk H, Stern JS. Effect of insulin-like growth factor type 1 on critical-size defects in diabetic rats. *J Craniofac Surg* 1995, May;6(3):218-23.
223. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor- α combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol* 1991, Nov;62(11):710-6.
224. Graves DT, Cochran DL. Mesenchymal cell growth factors. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1990;1(1):17.
225. Heldin CH, Westermark B. Platelet-Derived growth factors: A family of isoforms that bind to two distinct receptors. *Br Med Bull* 1989, Apr;45(2):453-64.
226. Zhang L, Leeman E, Carnes DC, Graves DT. Human osteoblasts synthesize and respond to platelet-derived growth factor. *Am J Physiol* 1991, Aug;261(2 Pt 1):C348-54.
227. Hock JM, Canalis E. Platelet-Derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology* 1994, Mar;134(3):1423-8.
228. Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol* 2000;71(10):1591-600.
229. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 1994;15(2):203-8.
230. Wang JS. Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. *Acta Orthop* 1996;67(S269):1-33.
231. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L. Fibroblast growth factor: Structural and biological properties. *J Cell Physiol* 1987;133(S5):15-26.
232. Jingushi S, Heydemann A, Kana SK, Macey LR, Bolander ME. Acidic fibroblast growth factor (afgf) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. *J Orthop Res* 1990, May;8(3):364-71.
233. Rodan SB, Wesolowski G, Thomas K, Rodan GA. Growth stimulation of rat calvaria osteoblastic cells by acidic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1987, Dec;121(6):1917-23.
234. Xu X, Weinstein M, Li C, Deng CX. Fibroblast growth factor receptors (fgfrs) and their roles in limb development. *Cell Tissue Res* 1999;296(1):33-43.
235. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 1996;84(6):911-21.
236. Tweden KS, Spadone DP, Terranova VP. Neovascularization of surface demineralized dentin. *J Periodontol* 1989, Aug;60(8):460-6.
237. Eppley BL, Connolly DT, Winkelmann T, Sadove AM, Heuvelman D, Feder J. Free bone graft reconstruction of irradiated facial tissue: Experimental effects of basic fibroblast growth factor stimulation. *Plast Reconstr Surg* 1991, Jul;88(1):1-11.
238. Kato T, Kawaguchi H, Hanada K, Aoyama I, Hiyama Y, Nakamura T, et al. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop Res* 1998, Nov;16(6):654-9.

239. Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, Tamura M, Yuge T, Fukuda H, Nigi H. Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J Bone Miner Res* 1998, Jun;13(6):942-9.
240. Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD, Fox WC, Spiro RC, Poser JW. Novel formulation of fibroblast growth factor-2 in a hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates. *J Orthop Res* 1999, Jul;17(4):607-14.
241. Lee DY, Cho TJ, Kim JA, Lee HR, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH. Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone* 2008, May;42(5):932-41.
242. Lee DY, Cho TJ, Lee HR, Park MS, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH. Distraction osteogenesis induces endothelial progenitor cell mobilization without inflammatory response in man. *Bone* 2010, Mar;46(3):673-9.
243. Casap N, Venezia NB, Wilensky A, Samuni Y. VEGF facilitates periosteal distraction-induced osteogenesis in rabbits: A micro-computerized tomography study. *Tissue Eng Part A* 2008, Feb;14(2):247-53.
244. Anitua E, Sánchez M, Orive G. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2010, Jun 15;62(7-8):741-52.
245. Deschaseaux F, Sensébé L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends in Molecular Medicine* 2009;15(9):417-29.
246. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andia I. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences* 2008;29(1):37-41.
247. Leitner GC, Gruber R, Neumüller J, Wagner A, Kloimstein P, Höcker P, et al.. Platelet content and growth factor release in platelet rich plasma: A comparison of four different systems. *Vox Sang* 2006(91):135-9.
248. Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *Journal of Orthopaedic Research* 2005;23(2):281-6.
249. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 2006, May;24(5):227-34.
250. Wroblewski AP, Mejia HA, Wright VJ. Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. *Operative Techniques in Orthopaedics* 2010;20(2):98-105.
251. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 2007;28(31):4551-60.
252. Schmidmaier G, Herrmann S, Green J, Weber T, Scharfenberger A, Haas NP, Wildemann B. Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. *Bone* 2006, Nov;39(5):1156-63.
253. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. *J Biomed Mater Res A* 2009;90(4):1262-3.
254. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 2009, Mar;27(3):158-67.
255. Sánchez M, Azofra J, Anitua E, Andía I, Padilla S, Santisteban J, Mujika I. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: A case report. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2003;35(10):1648.
256. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: A review of the literature. *J Bone Joint Surg Br* 2009, Aug;91(8):987-96.

257. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RA. Platelet rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;1998;85:638-46.(85):638-46.
258. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet- rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Cranio Maxil- Lofacial Surg* 2002;30:97-102.
259. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. . Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration . *Thromb Haemost* 2004;91:4-15.
260. Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, et al . Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 2007;25:230-40.
261. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004, Nov;114(6):1502-8.
262. Van Den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoelinga PJ, Jansen JA. Platelet-Rich plasma: Quantification of growth factor levels and the effect on growth and differen- tiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng* 2006(12):3067-73.
263. Martínez González JM, Cano Sánchez J, Gonzalo Lafuente JC, Campo Trapero J, Esparza Gómez GC, Seoane Lestón M. ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de plasma rico en plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? *Medicina Oral* 2002;7(5):375-90.
264. Burgstaler EA. Blood component collection by apheresis. *Journal of Clinical Apheresis* 2006;21(2):142-51.
265. Smrke D, Gubina B, Domanović D, Rozman P. Allogeneic platelet gel with autologous cancellous bone graft for the treatment of a large bone defect. *Eur Surg Res* 2007;39(3):170-4.
266. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: Biology and new technology. *J Craniofac Surg* 2005, Nov;16(6):1043-54.
267. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2001;107(1):229.
268. Marx, Robert E EG. Platelet-Rich plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62(1046):1047-8.
269. Kim SG, Kim WK, Park JC, Kim HJ. A comparative study of osseointegration of avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2002;60(9):1018-25.
270. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2002, Oct;60(10):1176-81.
271. Fürst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2003, Aug;14(4):500-8.
272. Yazawa M, Ogata H, Kimura A, Nakajima T, Mori T, Watanabe N. Basic studies on the bone formation ability by platelet rich plasma in rabbits. *J Craniofac Surg* 2004, May;15(3):439-46.
273. Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, Schlegel KA. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res* 2004, Apr;15(2):187-93.
274. Roldán JC, Jepsen S, Miller J, Freitag S, Rueger DC, Açil Y, Terheyden H. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. Bone morphogenetic protein-7. *Bone* 2004, Jan;34(1):80-90.

275. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-Rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998, Jun;85(6):638-46.
276. Butterfield KJ, Bennett J, Gronowicz G, Adams D. Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg* 2005, Mar;63(3):370-6.
277. Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2006, Mar;64(3):443-51.
278. Miranda SR, Nary Filho H, Padovan LE, Ribeiro DA, Nicolielo D, Matsumoto MA. Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts. *Clin Oral Implants Res* 2006, Dec;17(6):694-9.
279. Plachokova AS, van den Dolder J, Stoelinga PJ, Jansen JA. The bone regenerative effect of platelet-rich plasma in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Implants Res* 2006, Jun;17(3):305-11.
280. SchlegeláKA ZR. Thorwarthám. Et al. Sinus Floor Elevation Using Autogenous Bone or Bone Substitute Combined with Platelet-Rich Plasma. *Óoral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007 2007.
281. Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M. Effects of platelet-rich plasma at the cellular level on healing of autologous bone-grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2007, Apr;65(4):721-7.
282. Rai B, Ho KH, Lei Y, Si-Hoe KM, Jeremy Teo CM, Yacob KB, et al. Polycaprolactone-20% tricalcium phosphate scaffolds in combination with platelet-rich plasma for the treatment of critical-sized defects of the mandible: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2007, Nov;65(11):2195-205.
283. Messoro MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res* 2008, Dec;43(6):723-9.
284. Messoro MR, Nagata MJ, Mariano RC, Dornelles RC, Bomfim SR, Fucini SE, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res* 2008, Apr;43(2):217-23.
285. Creeper F, Lichanska AM, Marshall RI, Seymour GJ, Ivanovski S. The effect of platelet-rich plasma on osteoblast and periodontal ligament cell migration, proliferation and differentiation. *J Periodontal Res* 2009, Apr;44(2):258-65.
286. Ogino Y, Ayukawa Y, Kukita T, Atsuta I, Koyano K. Platelet-Rich plasma suppresses osteoclastogenesis by promoting the secretion of osteoprotegerin. *J Periodontal Res* 2009, Apr;44(2):217-24.
287. Nagata MJ, Melo LG, Messoro MR, Bomfim SR, Fucini SE, Garcia VG, et al. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *J Clin Periodontol* 2009, Sep;36(9):775-83.
288. Pradeep AR, Pai S, Garg G, Devi P, Shetty SK. A randomized clinical trial of autologous platelet-rich plasma in the treatment of mandibular degree II furcation defects. *J Clin Periodontol* 2009, Jul;36(7):581-8.
289. Gallo I, Saenz A, Artinano E, Esquide J. Autologous platelet-rich plasma: Effect on sternal healing in the sheep model. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2010, Jun 30.
290. Rodriguez A, Anastassov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2003, Feb;61(2):157-63.

291. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2004;62(5):555-8.
292. Sammartino G, Tia M, Marenzi G, di Lauro AE, D'Agostino E, Claudio PP. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 2005, Jun;63(6):766-70.
293. Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RS, Ruben JL, van der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res* 2005, Jun;16(3):349-56.
294. Mannai C. Early implant loading in severely resorbed maxilla using xenograft, autograft, and platelet-rich plasma in 97 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 2006, Sep;64(9):1420-6.
295. Carter GD, Goss AN. Bisphosphonates and avascular necrosis of the jaws. *Aust Dent J* 2003;48(4):268.
296. Curi MM, Cossolin GS, Koga DH, Araújo SR, Feher O, dos Santos MO, Zardetto C. Treatment of avascular osteonecrosis of the mandible in cancer patients with a history of bisphosphonate therapy by combining bone resection and autologous platelet-rich plasma: Report of 3 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2007, Feb;65(2):349-55.
297. Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials* 2009, Oct;30(28):4956-66.
298. Gómez-Barrena E, Orozco-Delclós L, Munuera-Martínez L. Agentes locales en la consolidación ósea: Perspectivas para el futuro. *Revista De Ortopedia Y Traumatología* 2006;50:22-9.
299. Munuera-Martínez L, Galán-Labaca V, Andia I, Sánchez M, Martínez de los Mozos JL. Agentes locales en la consolidación ósea: Realidades actuales. *Revista De Ortopedia Y Traumatología* 2006;50:13-21.
300. Wylan Cornelius Peterson, MD; Andrea Hoffmann, PhD; Richard Simman, MD, CWS. Role of platelet-rich plasma in acceleration of bone fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 2005;116(3):199-201.
301. Lucarelli E, Fini M, Beccheroni A, Giavaresi G, Di Bella C, Aldini NN, et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop Relat Res* 2005, Jun(435):62-8.
302. Dallari D, Fini M, Stagni C, Torricelli P, Nicoli Aldini N, Giavaresi G, et al. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res* 2006, May;24(5):877-88.
303. Gandhi A, Doumas C, Dumas C, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone* 2006, Apr;38(4):540-6.
304. Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials* 2006, Mar;27(9):1817-23.
305. Rai B, Oest ME, Dupont KM, Ho KH, Teoh SH, Guldborg RE. Combination of platelet-rich plasma with polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffolds for segmental bone defect repair. *J Biomed Mater Res A* 2007, Jun 15;81(4):888-99.
306. Hakimi M, Jungbluth P, Sager M, Betsch M, Herten M, Becker J, et al. Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs. *Injury* 2010, Jul;41(7):811-7.
307. Marlovits S, Mousavi M, Gäbler C, Erdös J, Vécsei V. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: A short technical note. *Eur Spine J* 2004, Oct;13 Suppl 1:S102-6.

308. Scholz M, Schleicher P, Eindorf T, Friedersdorff F, Gelinsky M, König U, et al. Cages augmented with mineralized collagen and platelet-rich plasma as an osteoconductive/inductive combination for interbody fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010, Apr 1;35(7):740-6.
309. Dallari D, Savarino L, Stagni C, Cenni E, Cenacchi A, Fornasari PM, et al. Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells. *J Bone Joint Surg Am* 2007, Nov;89(11):2413-20.
310. Calori GM, Tagliabue L, Gala L, d'Imporzano M, Peretti G, Albisetti W. Application of rhbmp-7 and platelet-rich plasma in the treatment of long bone non-unions: A prospective randomised clinical study on 120 patients. *Injury* 2008, Dec;39(12):1391-402.
311. Sanchez M, Anitua E, Cugat R, Azofra J, Guadilla J, Seijas R, Andia I. Nonunions treated with autologous preparation rich in growth factors. *J Orthop Trauma* 2009;23(1):52.
312. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Prado R, Muruzabal F, Andia I. Ligamentization of tendon grafts treated with an endogenous preparation rich in growth factors: Gross morphology and histology. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 2010;26(4):470.
313. Carreon LY, Glassman SD, Anekstein Y, Puno RM. Platelet gel (AGF) fails to increase fusion rates in instrumented posterolateral fusions. *Spine (Phila Pa 1976)* 2005, May 1;30(9):E243-6; discussion E247.
314. Characterization of an autologous platelet gel containing multiple growth factors; Transactions of the 45th annual meeting of the orthopaedic research society. 1999aa.
315. Swennen GR, Schutyser F, Mueller MC, Kramer FJ, Eulzer C, Schliephake H. Effect of platelet-rich-plasma on cranial distraction osteogenesis in sheep: Preliminary clinical and radiographic results. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005, May;34(3):294-304.
316. Kinoshita K, Hibi H, Yamada Y, Ueda M. Promoted new bone formation in maxillary distraction osteogenesis using a tissue-engineered osteogenic material. *J Craniofac Surg* 2008, Jan;19(1):80-7.
317. Hwang YJ, Choi JY. Addition of mesenchymal stem cells to the scaffold of platelet-rich plasma is beneficial for the reduction of the consolidation period in mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 2010, May;68(5):1112-24.
318. Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: Preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg* 2002, Jun;60(6):630-5.
319. Robiony M, Zorzan E, Polini F, Sembronio S, Toro C, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma: Combined use in restoration of severe atrophic mandible. Long-Term results. *Clin Oral Implants Res* 2008, Nov;19(11):1202-10.
320. Kawasumi M, Kitoh H, Siwicka KA, Ishiguro N. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. *J Bone Joint Surg Br* 2008, Jul;90(7):966-72.
321. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, Ishiguro N. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases. *Bone* 2004;35(4):892-8.
322. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Katoh M, Ishiguro N. Distraction osteogenesis of the lower extremity in patients with achondroplasia/hypochondroplasia treated with transplantation of culture-expanded bone marrow cells and platelet-rich plasma. *J Pediatr Orthop* 2007, Sep;27(6):629-34.
323. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Katoh M, Ishiguro N. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. *Bone* 2007;40(2):522-8.

324. Kitho H, Kawasumi M, Kaneko H, Ishiguro N. Differential effects of culture-expanded bone marrow cells on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings. *J Pediatr Orthop* 2009, Sep;29(6):643-9.
325. Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: A cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21(5):696-710.
326. Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen JA, Creugers NH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: A systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2008, Jun;19(6):539-45.
327. Martínez-Zapata MJ, Martí-Carvajal A, Solà I, Bolibar I, Expósito J, Rodríguez L, García J. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: A systematic review. *Transfusion* 2009;49(1):44-56.
328. Griffin XL, Smith CM, Costa ML. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: A systematic review. *Injury* 2009, Feb;40(2):158-62.
329. Kotsovilis S, Markou N, Pepelassi E, Nikolidakis D. The adjunctive use of platelet-rich plasma in the therapy of periodontal intraosseous defects: A systematic review. *J Periodontal Res* 2010, Jun;45(3):428-43.
330. de Vos RJ, van Veldhoven PL, Moen MH, Weir A, Tol JL, Maffulli N. Autologous growth factor injections in chronic tendinopathy: A systematic review. *Br Med Bull* 2010, Mar 2.
331. Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-Rich plasma in sinus augmentation procedures: A systematic literature review: Part II. *Implant Dent* 2010, Apr;19(2):145-57.
332. Villela DL, Santos VL. Evidence on the use of platelet-rich plasma for diabetic ulcer: A systematic review. *Growth Factors* 2010, Apr;28(2):111-6.
333. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 2009, Apr;30(12):2149-63.
334. Ramírez-Restrepo CA, Barry TN, Marriner A, López-Villalobos N, McWilliam EL, Lassey KR, Clark H. Effects of grazing willow fodder blocks upon methane production and blood composition in young sheep. *Animal Feed Science and Technology* 2009.
335. Kusec V, Jelic M, Borovecki F, Kos J, Vukicevic S, Korzinek K. Distraction osteogenesis by ilizarov and unilateral external fixators in a canine model. *Int Orthop* 2003;27(1):47-52.
336. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med* 2007, Feb;35(2):245-51.
337. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Corso MD, Inchingolo F, Sammartino G. Shedding light in the controversial terminology for platelet-rich products: Platelet-Rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), platelet-leukocyte gel (PLG), preparation rich in growth factors (PRGF), classification and commercialism. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* .
338. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Orive G, et al. Autologous fibrin matrices: A potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mater Res A* 2006, May;77(2):285-93.
339. Akeda K, An HS, Okuma M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar EJ, et al. Platelet-Rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006, Dec;14(12):1272-80.
340. Brehm W, Aklin B, Yamashita T, Rieser F, Trüb T, Jakob RP, Mainil-Varlet P. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine

- model: Implantation method and short-term results. *Osteoarthritis Cartilage* 2006, Dec;14(12):1214-26.
341. Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, Jacobs CR. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods* 2009, Sep;15(3):431-5.
342. Ferreira CF, Carriel Gomes MC, Filho JS, Granjeiro JM, Oliveira Simões CM, Magini Rde S. Platelet-Rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin Oral Implants Res* 2005, Aug;16(4):456-60.
343. Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T. Platelet-Rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2005, Mar;63(3):362-9.
344. Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. The diamond concept--open questions. *Injury* 2008, Sep;39 Suppl 2:S5-8.
345. Gil-Albarova, J. Efecto de la distracción diferida sobre la osteogénesis en la elongación ósea. Tesis Doctoral de la Universidad de Navarra dirigida por el Prof. Cañadell. 1991.
346. Shao Z, Liu B, Peng Q, Liu W, Liu Y, Liu R, et al. Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in the rabbit mandible. *Plast Reconstr Surg* 2007, Feb;119(2):500-7.
347. Towler DA. Vascular biology and bone formation: Hints from HIF. *J Clin Invest* 2007, Jun;117(6):1477-80.
348. Carvalho RS, Einhorn TA, Lehmann W, Edgar C, Al-Yamani A, Apazidis A, et al. The role of angiogenesis in a murine tibial model of distraction osteogenesis. *Bone* 2004, May;34(5):849-61.
349. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF. *Injury* 2008, Sep;39 Suppl 2:S45-57.
350. Weiss S, Zimmermann G, Baumgart R, Kasten P, Bidlingmaier M, Henle P. Systemic regulation of angiogenesis and matrix degradation in bone regeneration--distraction osteogenesis compared to rigid fracture healing. *Bone* 2005, Dec;37(6):781-90.
351. Aquerreta, J.D.. El seguimiento radiológico en las elongaciones óseas. Tesis Doctoral de la Universidad de Navarra dirigida por el Prof. Cañadell. 1993.
352. Aronson J, Shin HD. Imaging techniques for bone regenerate analysis during distraction osteogenesis. *J Pediatr Orthop* 2003;23(4):550-60.
353. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004, Apr;34(4):665-71.
354. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-Rich plasma: A review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006, Nov;118(6):147e-59e.
354. Salisbury J. How to count and measure features on slides. *Diagnostic Histopathology* 2009;15(4):213-9.
355. Athanasou NA. Pathology of bone injury. *Diagnostic Histopathology* 2009;15(9):437-43.
356. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *J Bone Miner Res* 1987, Dec;2(6):595-610.
357. Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, et al. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone* 2003;33(6):889-98.
358. Rauch F, Lauzier D, Croteau S, Travers R, Glorieux FH, Hamdy R. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 during distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 2000, Jun;26(6):611-7.