

V.3.- RESULTADOS DEL ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE RETRODISPERSION (BS-SEM)

Debido a que se trataba de un estudio principalmente cualitativo, y no cuantitativo, los resultados son presentados en forma de descripción de los tejidos observados en los diferentes tiempos de valoración (Figura V.13).

Por otra parte, la obtención de imágenes panorámicas de las muestras ofrecía una gran dificultad debido tanto a la configuración del microscopio como al gran tamaño de las muestras. Por esta razón, era necesario unir varias imágenes con el fin de obtener una imagen panorámica de la muestra.

3.1.- DESCRIPCION MORFOLOGICA DEL CALLO DE DISTRACCION DE 1 SEMANA DE EVOLUCION

Transcurrida una semana de la cirugía, las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de retrodispersión no mostraban signos evidentes de actividad ósea en los huesos osteotomizados y elongados. Una visión panorámica de las muestras permitía observar la separación espacial entre los fragmentos óseos originales, ya que en este momento del estudio ya se había comenzado la distracción ósea (Figura V.14).

A nivel de la osteotomía, no era posible la visualización del callo de distracción ya que todavía no había comenzado el proceso de calcificación de los tejidos neoformados. Sin embargo, podían observarse depósitos de Sulfato de Bario que se agrupaban adquiriendo una conformación alargada y perpendicular a la dirección de la elongación. La mayor concentración de dichos depósitos de Bario se localizaba en la zona central del espacio interfragmentario, correspondiente a la proyección de la cavidad medular de los segmentos óseos originales. Dicho contraste presentaba, debido a su alta densidad, una coloración blanca muy similar al hueso, pero se diferenciaba de éste por su aspecto granular, más evidente al utilizar grandes aumentos con el microscopio electrónico (Figura V.15). En algunos casos aparecían restos de hueso que por su morfología, correspondían a esquirlas óseas procedentes de la realización de la osteotomía.

La superficie ósea de la osteotomía presentaba un aspecto liso, con restos de fragmentos óseos procedentes del corte, pero sin evidencia clara de actividad remodeladora en la mayor parte de las muestras. A pesar del escaso tiempo transcurrido desde la intervención quirúrgica, en algunas muestras podía observarse una incipiente reacción perióstica adyacente a la osteotomía, especialmente en la región caudal del hueso. Esta reacción del periostio estaba formada principalmente por tejido condroide en la zona más alejada de la superficie ósea, y tejido óseo fibrorreticular en contacto con la cortical.

Por otra parte, los resultados de la observación de la interfase entre las agujas y el hueso variaban dependiendo del punto en que se había realizado el corte de la muestra. Si éste se localizaba a nivel de la cavidad medular, la aguja podía observarse en el interior de esta cavidad, mientras que si el corte se había hecho a nivel de la cortical, la aguja se encontraba incluida en el cortex óseo. De forma similar a como ocurría en el resto de la muestra, tras una semana de evolución apenas existía reacción tisular a los implantes. Las muestras de corte medular observadas mediante el microscopio electrónico de retrodispersión mostraban la presencia de gran cantidad de esquirlas óseas alrededor de la aguja, procedentes de la colocación de la porción roscada de la aguja-tornillo, sin actividad osteoclástica aparente. Las muestras corticales presentaban signos de estrés alrededor de las agujas, tales como la presencia de microfisuras de orientación radial en el hueso lamelar circundante o la falta de contacto en algunos puntos de la interfase aguja-hueso. Sin embargo todavía no eran visibles signos de actividad osteogénica a este nivel.

3.2.-DESCRIPCION MORFOLOGICA DEL CALLO DE DISTRACCION DE 2 SEMANAS DE EVOLUCION

Las imágenes de dos semanas de evolución mostraban la activación de fenómenos osteogénicos por distracción, osteoclásticos y reactividad tisular al proceso de elongación ósea.

En el momento de finalizar la distracción ósea era posible apreciar la formación de un callo de distracción incipiente, de origen medular principalmente y que se caracterizaba por presentar zonas bien diferenciadas (Figura V.16):

- **Zona central:** Correspondía a la porción no calcificada del callo (Zona central de crecimiento: ZCC), de localización central en el espacio interfragmentario donde podían observarse depósitos de contraste baritado.
- **Zona periférica:** Se trataba del callo de distracción propiamente dicho y se extendía proximal y distalmente conectando la zona central con los fragmentos óseos originales (Zona de Mineralización Proximal y Distal: ZMP y ZMD). En esta fase tan inicial de elongación ósea, la zona periférica sólo era visible originándose desde la cavidad medular y dirigiéndose hacia el centro del espacio interfragmentario. En su extremo central, podía observarse una banda de aproximadamente 500µm, formada por tejido condroide (Frente de mineralización) (Figuras V.17 y V.18). A medida que nos alejábamos de la zona central hacia los segmentos óseo originales, este tejido era sustituido por una combinación de tejido condroide y hueso fibrorreticular dispuesto en columnas orientadas en el mismo sentido que la distracción (Zona de formación de microcolumnas). Intercalada entre estas columnas óseas se encontraba una red vascular dispuesta también paralela al eje de distracción, tal y como pone de manifiesto la presencia de vasos longitudinales con Bario en su interior (Figura V.19).

Destacaba la ausencia de callo de distracción cortical, apareciendo los bordes de la osteotomía lisos y sin signos evidentes de osteogénesis por distracción. Sin embargo, podían observarse puntos aislados de actividad osteoclástica a lo largo de la superficie cortical osteotomizada, evidenciables por la presencia de pequeños “mordiscos” en el hueso lamelar y que se denominan lagunas de Howship (Figura V.20).

Asimismo, en las muestras también era posible observar una reacción perióstica a nivel de la osteotomía, más evidente que en el período anterior y de localización tanto

craneal como caudal, siendo éste último de mayor tamaño. Dicho tejido se proyectaba desde los bordes corticales hacia el espacio interfragmentario, y de forma similar al callo de distracción, estaba constituido por tejido condroide y hueso fibrorreticular dispuesto en filas paralelas al eje de distracción (Figura V.20).

Con referencia a la cavidad medular, en este momento de la evolución podía apreciarse claramente una gran reactividad tisular tanto a nivel de la osteotomía, y que se continuaba con el callo de elongación, como alrededor de los tornillos transfixiantes (Figura V.21). En ambas localizaciones se evidenciaba una extensa formación reticular constituida por hueso fibrorreticular y zonas aisladas de tejido condroide. La red ósea medular adyacente a la osteotomía se continuaba con el hueso fibrorreticular longitudinal del callo de distracción, ocurriendo esta transición todavía en el interior de la cavidad medular.

En cuanto a la interfase aguja-hueso, ya se ha comentado anteriormente que existía una gran actividad ósea de la cavidad medular alrededor de los tornillos. Esta red intramedular se encontraba formada principalmente por hueso fibrorreticular, con algún foco de tejido condroide, que aunque rodeaba por completo el implante, no contactaba con él en toda su superficie. Los restos de hueso cortical procedentes de la colocación de los tornillos se encontraban integrados entre el tejido neoformado a nivel de la cavidad medular (Figura V.21). A nivel cortical, podía observarse todavía la existencia de fisuras en el hueso aunque en este momento se hacía más evidente la degeneración del perímetro óseo contiguo al tornillo.

3.3.-DESCRIPCION MORFOLOGICA DEL CALLO DE DISTRACCION DE 3 SEMANAS DE EVOLUCION

El estudio del callo de distracción de 3 semanas de evolución mediante microscopía electrónica de retrodispersión muestra la presencia de unos callos de origen medular y perióstico de mayor tamaño que en el período anterior, que se extienden y cubren parcialmente la superficie cortical de la osteotomía.

Con referencia al callo de distracción, la longitud de las porciones proximal y distal dependía del nivel al que se realizara el corte de la muestra puesto que, tal y como

se podía observar en los controles radiográficos, la calcificación del tejido neoformado no tenía lugar al mismo ritmo en todos los puntos del callo. Al igual que en el apartado anterior, podían diferenciarse claramente dos partes en dicho callo:

- **Zona central:** Presentaba un espesor variable dependiendo del corte y de la muestra, siendo aproximadamente de 4-6 mm. No presentaba tejido calcificado aunque en algunos cortes de las muestras correspondientes a la EPI de los animales N^o 7 y 8, destacaba la presencia de isletas de tejido calcificado en el centro de dicha porción radiolúcida (Figura V.22). Estas porciones calcificadas presentaban un tamaño de aproximadamente 1.5 mm y estaban constituidas por tejido condroide y hueso fibrorreticular (Figura V.23). En el resto de cortes no fue posible observar dichas estructuras.
- **Zona periférica:** El frente de mineralización estaba constituido por tejido condroide, el cual delimitaba una banda de aproximadamente 1mm de grosor que recorría la porción más central del callo de elongación (Figuras V.24 y V.25). A continuación se visualizaba la zona de formación de microcolumnas, formada por columnas de tejido calcificado orientadas en el mismo sentido que la elongación. Dichas columnas estaban constituidas por hueso fibrorreticular, destacando la presencia de lagunas aisladas de tejido condroide en su interior y signos incipientes de hueso lamelar (Figura V.26). Esta área de organización lineal, presentaba una longitud variable dependiendo de la muestra, de entre 2 y 3 mm, e incluía estructuras lineales vasculares que contenían Sulfato de Bario (Figura V.24). En este momento podía observarse una zona en contacto con los fragmentos óseos originales en la que ya no se observaba tan claramente la organización del tejido en forma de columnas (Zona de Remodelación Proximal y Distal). Estaba formado por hueso fibrorreticular principalmente, aunque podían visualizarse también pequeños núcleos de hueso lamelar y tejido condroide. La remodelación que estaba teniendo lugar se manifestaba por la presencia de lagunas de Howship (Figura V.27). Aunque de origen medular, el callo de elongación se expandía lateralmente cubriendo parte del

extremo medial de la osteotomía cortical. La observación mediante mayores aumentos, permitía afirmar que existía una unión física entre callo y cortical, pero no actividad remodeladora entre ambos.

El callo perióstico que podía observarse en las muestras de 3 semanas de evolución a nivel de la osteotomía, se caracterizaba por su mayor volumen respecto al período anterior no sólo en longitud sino también en anchura. De forma similar a la fase anterior, destacaba el hecho de que el callo perióstico caudal se encontraba más desarrollado que el craneal y presentaba una longitud similar a la del callo de distracción, pudiendo diferenciarse las mismas partes que en éste. De este modo se observaba una zona central no calcificada en la que pudo visualizarse una isleta calcificada central de tejido condroide y hueso fibrorreticular en dos de las muestras (Nº 7 y 8) (Figura V.28). El callo perióstico propiamente dicho presentaba una distribución de los tejidos similar a la del callo de elongación. En el extremo central podía observarse la presencia de tejido condroide, mientras que en el extremo opuesto podía encontrarse tejido condroide y hueso fibrorreticular. A diferencia del callo medular, en el periostio la proporción de tejido condroide era mayor y el hueso fibrorreticular se encontraba en un estadio más inmaduro. La anchura de este callo también aparecía incrementada. De forma similar a lo que ocurría con el callo medular, el callo perióstico invadía parcialmente la superficie cortical osteotomizada, permitiendo constatar la unión entre ambas estructuras.

Asimismo, podía observarse el inicio de una reacción perióstica en la superficie diafisaria del hueso, principalmente sobre la cortical caudal. Esta comenzaba a nivel de la osteotomía y se desplazaba proximal y distalmente a lo largo de los fragmentos óseos proximal y distal, respectivamente. Estaba formada esencialmente por hueso fibrorreticular dispuesto siguiendo una morfología reticular, con paredes relativamente gruesas.

La cavidad medular se caracterizaba por presentar una reactividad aumentada de forma reticular, similar a la muestra del período anterior. En este caso, el tejido que podía visualizarse era mayoritariamente hueso fibrorreticular, aunque era posible encontrar hueso lamelar intercalado en algunas localizaciones. La ausencia de condroide se evidenciaba de forma más marcada en la zona de unión del tejido medular con el

callo de elongación, el cual contenía este tipo de tejido y permitía observar el contraste entre ambos (Figura V.27). En el interior de la red de hueso fibrorreticular de la cavidad medular era posible observar la presencia de depósitos de contraste baritado, caracterizado por su conformación granular.

Respecto a la interfase aguja-hueso, podía observarse una gran reactividad ósea a nivel medular, como evidenciaba la presencia de hueso fibrorreticular y lamelar de distribución reticular alrededor del implante. Este tejido reactivo comenzaba a contactar con el tornillo en algunos puntos. Todavía era posible la visualización de restos óseos originales, los cuales aparecían totalmente integrados en la formación reticular medular. A nivel del hueso cortical, se observaban signos indicativos del inicio de actividad ósea alrededor del tornillo. Todavía era visible el espacio entre el hueso y el implante, pero ya podía apreciarse la formación de tejido óseo nuevo en la superficie cortical de dicho anillo (Figura V.29).

3.4.-DESCRIPCION MORFOLOGICA DEL CALLO DE DISTRACCION DE 4 SEMANAS DE EVOLUCION

A continuación se describen los resultados de las observaciones realizadas en las muestras de 4 semanas de evolución mediante microscopía electrónica de retrodispersión.

El callo de distracción continuaba siendo principalmente de origen medular, expandiéndose lateralmente hasta cubrir parcial o totalmente la superficie cortical. Su longitud también había aumentado gracias a la calcificación progresiva de los tejidos neoformados, aunque tenía lugar de forma asimétrica. Tal y como podía observarse en el estudio radiológico realizado, la mayoría de las muestras correspondientes a este estado evolutivo presentaban un callo que variaba en longitud de forma creciente o decreciente de una cara ósea a otra. Este fenómeno daba lugar a la formación de una banda central no calcificada de orientación oblicua, o incluso en forma de “Z”, no completamente perpendicular al eje de distracción (Figura V.30). Como en los casos anteriores, era posible distinguir varias partes:

- **Zona central:** Esta área de tejido no calcificado, presentaba una conformación oblicua o zigzagueante, no siendo perfectamente perpendicular a la dirección de la elongación. Debido a la calcificación progresiva del callo, su grosor había disminuído hasta encontrarse entre los 2 y 3 mm de espesor de las muestras observadas (Figura V.30).
- **Zona periférica:** A las 4 semanas de evolución, el callo de distracción presentaba una longitud variable de un extremo a otro, siendo ésta de entre 5 y 8 mm en la región más prominente, dependiendo de la elongación obtenida en cada muestra. Como en las muestras anteriores, pudo comprobarse que existían diferencias entre los tejidos existentes en contacto con la zona central no calcificada y los de localización más periférica. El frente de mineralización se encontraba constituido principalmente por tejido condroide y pequeñas cantidades de hueso fibrorreticular, ocupando únicamente una franja de aproximadamente 800micras ó 1 mm de espesor. Asimismo podían observarse núcleos aislados de tejido cartilaginoso calcificado en contacto con la zona central no calcificada (Figura V.31), con excepción de las muestras correspondientes al animal N° 2. La porción periférica del callo estaba constituida principalmente por hueso fibrorreticular que adquiría una conformación longitudinal siguiendo la dirección de la elongación (Zona de formación de microcolumnas) (Figura V.32). En el interior de las microcolumnas de hueso fibrorreticular, pudieron observarse focos de tejido condroide, más abundantes en las proximidades de la zona central (Figura V.33), y de hueso lamelar conforme nos acercábamos al hueso original (Figura V.34). En una de las muestras (animal N° 2) pudo observarse varias unidades osteonales que se encontraban en una fase bastante incipiente así como el hecho de que la conformación linear de este tejido óseo tendía a desaparecer en las proximidades de los fragmentos óseos originales (Zona de Remodelación Proximal y Distal) (Figura V.35). Como en casos anteriores, podía observarse la presencia de depósitos lineales de Sulfato de Bario entre las microcolumnas de hueso, haciendo evidente la presencia de vascularización del hueso neoformado.

La porción de callo que entraba en contacto con la osteotomía a nivel cortical, presentaba una buena integración ósea, pudiendo observarse los primeros conos interfragmentarios de remodelación atravesando dicha unión (Figura V.34). Asimismo, estos fenómenos de remodelación ósea no se limitaban a la región cortical en contacto con el callo, sino que destacaba la presencia de un gran número de lagunas de Howship y la remodelación en la superficie cortical osteotomizada libre de tejido neoformado.

En cuanto al callo perióstico, las muestras pertenecientes a esta etapa de evolución no presentaban una reacción perióstica muy abundante. A pesar de ello fue posible observar una distribución de los tejidos similar a la del callo de elongación pero ligeramente más inmaduro. El extremo central del callo de la osteotomía se caracterizaba por la existencia de tejido condroide mientras que el resto del callo consistía fundamentalmente en hueso fibrorreticular con abundantes focos de tejido condroide. No se observaba una distribución linear clara de este tejido óseo.

Con referencia a la cavidad medular, en esta etapa se observaba que la reactividad de dicha estructura se limitaba a la región de contacto con el callo de elongación y con los tornillos, permaneciendo el resto de la cavidad sin tejido calcificado en su interior. En estas zonas, podía observarse la presencia de hueso fibrorreticular y pequeños vestigios de hueso lamelar. La línea de unión entre el callo de distracción y la estructura trabecular de la cavidad medular era evidente ya que en el primero podían observarse agrupaciones de tejido condroide, que no aparecían en el segundo (Figura V.36).

El tejido de reacción que podía visualizarse alrededor de los tornillos consistía en hueso fibrorreticular e indicios de hueso lamelar. Dicho tejido se distribuía de forma reticular, presentando una red de mayor grosor y que entraba en contacto con la superficie del implante mediante prominencias óseas que se orientaban hacia él. A nivel de la cortical, podían observarse fenómenos de remodelación ósea alrededor de los tornillos tales como la presencia de lagunas de Howship en la superficie de contacto o la reabsorción de restos de tejido óseo degenerado. En esta fase todavía eran evidentes las zonas carentes de contacto entre el hueso y el implante.

3.5.-DESCRIPCION MORFOLOGICA DEL CALLO DE DISTRACCION DE 6 SEMANAS DE EVOLUCION

El estudio de las muestras de 6 semanas de evolución mediante microscopía electrónica de retrodispersión mostró que en este momento comenzaban a formarse los primeros puentes de unión calcificados entre el callo de elongación proximal y el distal (Figura V.37).

De forma similar a lo que ocurría en las muestras de la etapa anterior, en las imágenes obtenidas de 6 semanas de evolución podía observarse una morfología asimétrica del callo de distracción. Se caracterizaba por la presencia de una línea central no calcificada, de recorrido oblicuo o zigzagueante, que carecía de perpendicularidad respecto a la dirección de la elongación. Destacaba también la formación de callo de elongación cortical a partir del ensanchamiento de los callos medular y perióstico (Figura V.37). A continuación se describen las particularidades de cada una de las zonas que se diferenciaban en dicho callo:

- **Zona central:** En este momento de la evolución, esta estructura no calcificada se caracterizaba por presentar una morfología zigzagueante y un grosor de entre 800 micras y 1mm. En las muestras observadas podían visualizarse puentes de cartílago calcificado que unían el callo de elongación proximal con el distal (Figuras V.38 y V.39).
- **Zona periférica:** El frente de mineralización estaba formado por tejido cartilaginoso calcificado y condroide, y ocupaba únicamente un espesor de entre 500 y 800 micras (Figura V.40). A continuación podía observarse el tejido que constituía la mayor parte del callo de elongación. Esta parte se encontraba formada mayoritariamente por hueso fibrorreticular con trazos de tejido condroide, sobretudo hacia el centro del callo, y hueso lamelar en el sentido opuesto (Figura V.41). Podían observarse también indicios de hueso osteonal aislados en el tejido. La distribución en microcolumnas no se observaba tan claramente como en muestras anteriores (Figura V.37).

La superficie osteotomizada de las corticales originales mostraba signos avanzados de remodelación ósea e integración del callo, como ponía de manifiesto la presencia de unidades osteoclásticas, denominadas “Conos Interfragmentarios de Remodelación” (Figura V.42). También podía observarse remodelación ósea a nivel del córtex óseo, ya que se observaban estructuras huecas longitudinales de un tamaño significativamente mayor al que presentaban los conductos de Havers de forma habitual.

La reacción perióstica a nivel de la osteotomía era similar al callo de elongación de origen medular, tanto en su morfología como en la distribución tisular, con la salvedad de que en el primero existía cierta inmadurez de los tejidos respecto al segundo. La porción más central del callo perióstico estaba constituida por cartílago calcificado y condroide, ocupando una mayor superficie que la correspondiente parte del callo de elongación. El resto de callo contenía hueso fibrorreticular y condroide en grandes proporciones. Por el contrario, la reacción perióstica a nivel de la diáfisis del hueso presentaba principalmente hueso fibrorreticular con pequeñas cantidades de tejido condroide.

De forma similar a lo que ocurría en las muestras del estado anterior, la reacción en el interior de la cavidad medular se limitaba en gran medida a la región adyacente al callo de distracción y a los tornillos transfixiantes. Asimismo, podían visualizarse grandes acumulaciones de Sulfato de Bario que indicaban la presencia de vasos de tamaño relativamente grande. La reacción a nivel de la cavidad medular consistía fundamentalmente en hueso fibrorreticular y lamelar. La distribución reticular y abundante de fases anteriores había sido sustituida por la presencia errática de estructuras ramificadas de los tejidos anteriormente mencionados. Estas ramificaciones óseas entraban en contacto con los implantes pero no los rodeaban todavía en su totalidad. Todavía podían observarse restos de las esquirlas óseas causadas durante la cirugía, y que aparecían completamente integradas en el tejido óseo neoformado (Figura V.43). A nivel del córtex óseo, podía observarse un mayor grado de remodelación y neoformación ósea alrededor de los implantes.

3.6.-DESCRIPCION MORFOLOGICA DEL CALLO DE DISTRACCION DE 8 SEMANAS DE EVOLUCION

A continuación se describen los resultados obtenidos de la observación mediante microscopía electrónica de retrodispersión, de las muestras correspondientes a 8 semanas de evolución.

No se observaban grandes diferencias respecto a las muestras pertenecientes a la fase previa salvo el estrechamiento de la porción más central del callo de elongación, o la continuidad en la remodelación y maduración de los tejidos que formaban dicha estructura.

El callo de distracción se caracterizaba por ser principalmente de origen medular y perióstico, los cuales se expandían lateralmente uniéndose y cubriendo la superficie cortical de la osteotomía (Figura V.44). De forma similar a como se había descrito hasta ahora, era posible diferenciar varias partes en este callo:

- **Zona central:** Las muestras observadas mostraban una línea central no calcificada de entre 1 y 3 mm de espesor. No se observó tejido calcificado ni puentes de unión entre los callos proximal y distal (Figura V.44).
- **Zona periférica:** Como en las muestras visualizadas anteriormente, podían distinguirse dos regiones a partir del tejido que las constituían. La porción del callo en contacto con la zona central radiolúcida (Frente de mineralización) consistía en una banda estrecha, de entre 200 y 400 micras de amplitud, de tejido cartilaginoso calcificado y tejido condroide (Figura V.45). Ambos daban paso rápidamente al hueso fibrorreticular característico del resto de callo. Una de las muestras observadas no exhibía presencia de cartílago calcificado en dicha localización (Nº 7-EPD). En su lugar, se observaba una línea delgada de tejido condroide que se continuaba con hueso fibrorreticular. La fracción mayoritaria del callo se encontraba compuesta por hueso fibrorreticular y lamelar, aunque destacaba la presencia de pequeños detalles de hueso osteonal

(Figura V.46). Resultaba de gran interés el hecho de que la morfología en forma de microcolumnas del hueso neoformado, había sido sustituida por una estructura ramificada e irregular que no se orientaba siguiendo el eje de la elongación (Zona de Remodelación Proximal y Distal). Estas ramificaciones se caracterizaban por ser más gruesas y compactas que en fases anteriores y por distribirse por toda la superficie del callo. Entre ellas podían detectarse depósitos de contraste baritado, el cual tampoco se orientaba de forma lineal. Este callo de distracción se integraba de forma excelente en la cortical ósea, la cual mostraba a su vez signos de remodelación ósea (Figura V. 47).

Los fenómenos descritos en el callo de origen medular tenían lugar también en el callo perióstico localizado a nivel de la osteotomía. La zona contigua a la zona central no calcificada presentaba tejido cartilaginoso calcificado y gran cantidad de condroide, mientras que el resto de callo estaba constituido por hueso fibrorreticular y tejido condroide. La orientación lineal de esta última estructura, había sido sustituida por una conformación irregular y asimétrica formada por ramificaciones de hueso fibrorreticular y condroide. A medida que nos acercábamos a la superficie cortical externa, estos tejidos se orientaban perpendicularmente a dicha superficie, continuándose con la reacción perióstica diafisaria.

La reacción de la cavidad medular al proceso que se estaba estudiando, era únicamente visible en las proximidades del callo de elongación y de los tornillos. Como en las muestras anteriores, estaba constituida por hueso fibrorreticular y lamelar dispuesto de forma irregular. Interpuestos en esta estructura, eran visibles agregados de Sulfato de Bario localizados en el interior de la vascularización medular. Las ramas medulares de hueso fibrorreticular eran muy similares en morfología y composición a las de la porción periférica del callo de elongación, presentando una continuidad entre ambas de difícil diferenciación. Existían signos evidentes de remodelación de la superficie cortical osteotomizada, con la presencia de lagunas de Howship.

Con referencia a los implantes, el grado de reactividad del tejido medular y cortical era muy similar al período evolutivo anterior, no mostrando diferencias significativas o relevantes.

3.7.-DESCRIPCION MORFOLOGICA DEL CALLO DE DISTRACCION DE 10 SEMANAS DE EVOLUCION

El callo de distracción de 10 semanas de evolución se caracterizaba por poseer puentes de unión calcificados entre sus porciones proximal y distal, así como mostrar una mayor solidez y densidad del mismo (Figura V.48).

El callo de elongación mostraba un origen prioritariamente medular que, junto con el perióstico, cubría el extremo cortical de la osteotomía dando lugar a un único callo de distracción. Ambas porciones del callo presentaban una morfología asimétrica, dando lugar a una banda central radiolúcida oblicua o curvilínea, de 400 micras de espesor. A continuación procedemos a describir los hallazgos observados en las diferentes partes en las que dividimos dicho callo:

- **Zona central:** Destacaba la presencia de puentes calcificados que unían el callo procedente del fragmento óseo proximal con el originario distal. Dichos puentes estaban formados por tejido cartilaginoso calcificado y condroide y se continuaban con el tejido condroide del callo propiamente dicho (Figuras V.49 y V.50). También podían observarse uniones más sólidas entre ambas porciones, en las que el cartílago calcificado o el condroide se unían directamente al hueso fibrorreticular del callo de elongación. El resto de la zona radiolúcida presentaba tejido no calcificado. Una de las muestras no presentaba columnas de unión entre ambos callos (animal N° 5-EPD).
- **Zona periférica:** En las zonas del callo en que no existían estas uniones sólidas anteriormente descritas, podían diferenciarse dos áreas dependiendo de los tejidos de los que estaba constituido. En cuanto al frente de mineralización, se observaba una banda de unas 300 a 500 micras de grosor formada por tejido cartilaginoso calcificado y condroide (Figuras V.49 y V.50). Esta estructura se continuaba con el resto de callo, formado en su mayoría por hueso fibrorreticular, lamelar y osteonal (Figura V.51). Estos tres tejidos se organizaban de forma más sólida que en estadíos anteriores, dejando áreas libres para la

vascularización, tal y como pone de manifiesto la presencia de depósitos de Sulfato de Bario en su interior. De forma similar a lo registrado en la etapa anterior, no era posible observar la organización longitudinal de este tejido, propia de otros estadios de la elongación ósea.

Hay que destacar la excelente integración del callo de elongación con la cortical del hueso, no siendo sencillo en ocasiones diferenciar ambas estructuras mediante el uso de pequeños aumentos. A mayores aumentos se visualizaba la unión entre ambos tejidos y cómo ésta se encontraba surcada por numerosos espacios vasculares, confirmando así el avanzado grado de integración (Figura V.52). Tal y como ocurría en fases anteriores, el hueso osteonal del córtex aparecía atravesado por numerosos espacios vasculares aumentados de tamaño, que le daban un aspecto poroso, y que podían identificarse por el Sulfato de Bario depositado en su interior. La remodelación de la superficie osteotomizada tenía lugar incluso en aquellas zonas que no estaban en contacto con el callo de elongación.

Con referencia al callo de origen perióstico, el acercamiento entre ambos extremos no era tan acusado como en el callo medular pero podían diferenciarse las mismas partes que en él. Estas estructuras presentaban la misma distribución pero en un estadio más inmaduro, sin mencionar la zona central no calcificada. De esta forma, la porción más central del callo contenía cartílago calcificado y condroide pero, a diferencia del callo de origen medular, formaba una banda de mayor grosor. El resto del callo estaba compuesto por hueso fibrorreticular, de grado más inmaduro, y tejido condroide (Figura V.53). Estos tejidos no presentaban una orientación paralela al eje de distracción, sino que se distribuían de forma irregular y cada vez más compacta. Las zonas más externas y más próximas a la diáfisis del hueso adquirían una conformación reticular, orientada perpendicularmente al eje diafisario, muy similar a la reacción periostal diafisaria.

Los tejidos formados en el interior de la cavidad medular se localizaban principalmente a nivel de la osteotomía y alrededor de los tornillos. Se trataba de hueso fibrorreticular y lamelar que se disponía en bloques irregulares, entre los cuales podían visualizarse grandes acumulaciones de contraste baritado en el interior de vasos medulares.

La reacción ósea a nivel de la cavidad medular que tenía lugar alrededor de los implantes consistía en hueso fibrorreticular y lamelar que entraba en contacto con el tornillo. Todavía podían visualizarse restos de hueso degenerado integrados en el hueso neoformado. Tanto a nivel medular como a nivel cortical, existía una gran actividad ósea para la integración del implante en cada una de las estructuras. Una muestra exhibía una muy buena integración del segundo tornillo en la cavidad medular, mientras que el tercero aparecía rodeado de un anillo que no contenía tejido calcificado.

3.8.-DESCRIPCION MORFOLOGICA DEL CALLO DE DISTRACCION DE 12 SEMANAS DE EVOLUCION

Las muestras correspondientes a las 12 semanas de evolución señalaban un estado más avanzado de maduración del callo de distracción, como ponen de manifiesto el grado de unión entre los callos proximal y el distal, la mayor proporción de hueso osteonal o la casi completa integración del callo en el córtex óseo.

En este momento, no era posible visualizar claramente en el callo de elongación una línea radiolúcida central debido a la formación de numerosos puentes de tejido calcificado entre los callos proximal y distal (Figura V.54). A pesar del diferente estado evolutivo de estas uniones, lo cual se comentará a continuación, era posible distinguir varias partes bien definidas en el callo de distracción:

- **Zona central:** En esta zona, se observaba un gran número de puentes calcificados que contactaban los extremos de los callos proximal y distal. Algunos de estos puentes se encontraban en una fase bastante incipiente, ya que no presentaban mucha anchura y estaban formados únicamente por tejido cartilaginoso poco calcificado (Figura V.55). Estas formaciones se continuaban con el cartílago calcificado o condroide de la zona periférica. La siguiente fase evolutiva correspondía a puentes de cartílago con un mayor grado de calcificación y anchura, a la que seguía la unión completa y verdadera mediante tejido condroide (Figura V.56). Estas uniones entre ambos callos aparecían con más frecuencia en la

región craneal del callo. Por otra parte, continuaba la existencia de zonas radiolúcidas en el centro del callo, formadas por tejido no calcificado.

- **Zona periférica:** En las porciones del callo en las que no se había producido la unión, podían diferenciarse las dos regiones que se han ido describiendo en cada una de las fases del estudio. La zona contigua a la zona central no calcificada, estaba compuesta por tejido cartilaginoso calcificado y condroide y delimitaba una línea de alrededor de 200 micras de espesor (Figura V.55). El resto del callo, estaba formado por hueso fibrorreticular, lamelar y osteonal (Figura V.57) que se organizaba de forma compacta e irregular, limitando espacios vasculares en los que podía visualizarse contraste baritado. Por otra parte, los puentes de unión existentes en otras zonas, y descritos anteriormente, contactaban directamente con el hueso fibrorreticular, el cual presentaba gran cantidad de depósitos de tejido condroide a este nivel (Figura V.58).

La superficie osteotomizada cortical mostraba una buena integración del callo de elongación, presentando espacios vasculares longitudinales que atravesaban esta línea de unión. El tejido osteonal que formaba el córtex óseo exhibía numerosos conductos vasculares aumentados de tamaño a lo largo de su estructura, signos evidentes de actividad ósea (Figura V.59).

El callo de elongación de origen perióstico manifestaba fenómenos similares a los que tenían lugar en el callo principal. El callo perióstico craneal mostraba un estado avanzado de unión entre sus partes proximal y distal, mientras que el de localización caudal mostraba todavía una banda no calcificada entre dichas porciones. Las uniones craneales se encontraban constituídas por tejido cartilaginoso calcificado y condroide que se continuaban con hueso fibrorreticular y condroide de la zona periférica del callo. En el callo caudal, podía observarse cartílago calcificado y condroide en contacto con la zona central radiolúcida. El resto del callo contenía hueso fibrorreticular con retazos de condroide y hueso lamelar que se distribuían de forma compacta e irregular. Los bordes más alejados del callo, estaban constituídos principalmente por condroide, y pequeñas cantidades de hueso fibrorreticular. Estos tejidos se disponían de forma reticular

escasamente compacta, similar a la reacción perióstica diafisaria, con la que se continuaban, alejándose del foco de osteotomía (Figura V.59).

En este estadio de evolución, la reactividad a nivel de la cavidad medular cercana a la osteotomía se había reducido considerablemente, manteniéndose alrededor de los implantes. En estas localizaciones podía observarse la presencia de un entramado de hueso fibrorreticular y lamelar alrededor de los tornillos con los que entraba en contacto frecuentemente. A nivel de la cortical también podía visualizarse actividad osteogénica alrededor de los implantes.

3.9.-DESCRIPCION MORFOLOGICA DEL CALLO DE DISTRACCION DE 14 SEMANAS DE EVOLUCION

La única muestra de 14 semanas de evolución obtenida en el estudio mostraba una calcificación prácticamente completa del callo de elongación, ausencia de reacción perióstica, tanto a nivel de la osteotomía como a nivel diafisario, y una excelente continuidad del callo y la cortical original.

El callo de elongación en esta fase evolutiva mostraba una calcificación completa de la zona central exceptuando en su extremo caudal. A pesar de ello, todavía podía intuirse la morfología de dicha línea central, que seguía una distribución en forma de “V” (Figura V.60). Tal y como realizábamos en las muestras observadas con anterioridad, era posible describir las partes que componían el callo de distracción:

- **Zona central:** Podían observarse puntos de unión muy evolucionados entre ambos callos y que contenían hueso fibrorreticular. Sin embargo, las uniones que podían visualizarse con mayor frecuencia estaban formadas por cartílago calcificado y condroide (Figura V.61). El extremo caudal de la zona central del callo no presentaba tejido calcificado en su interior, apareciendo como una banda radiolúcida tan característica de etapas anteriores (Figura V.60).

- **Zona periférica:** A las 14 semanas de evolución, podía observarse la presencia de hueso fibrorreticular, lamelar y osteonal en la totalidad del callo de distracción con excepción de la zona central recientemente calcificada (Figura V.62). Estos tejidos se organizaban como una estructura compacta y bien calcificada que presentaba espacios vasculares con Sulfato de Bario en su interior. No resultaba sencillo establecer el límite entre el callo de elongación y la cortical original debido al avanzado grado de maduración de los tejidos que constituían el primero de ellos. La continuidad con el córtex óseo era excelente, pudiendo observarse conos interfragmentarios de remodelación atravesando dicha unión (Figura V.63).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la muestra correspondiente a esta fase de desarrollo no presentaba reacción alguna del periostio, tanto a nivel de la distracción realizada como a lo largo de la diáfisis del hueso. A nivel del córtex óseo, destacaba el aumento en el tamaño de los espacios vasculares, dentro de los cuales era posible visualizar los depósitos del contraste administrado de forma intravenosa.

Con referencia a la cavidad medular, podía apreciarse cierta reactividad tisular a los tornillos implantados en la cirugía. Ramificaciones de hueso fibrorreticular y lamelar rodeaban y contactaban con estos implantes, sin llegar a completar su perímetro. Asimismo, podía apreciarse la reactividad ósea a nivel de la cortical que entraba en contacto con los implantes. Eran visibles pequeñas grietas así como unidades osteoclásticas y tejido neoformado en el manguito adyacente al implante metálico.

3.10.-DESCRIPCION MORFOLOGICA DEL CALLO DE DISTRACCION DE 18 SEMANAS DE EVOLUCION

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de retrodispersión de las muestras correspondientes a 18 semanas de evolución, mostraban la desaparición casi completa de la zona radiolúcida central del callo de elongación, excepto en el extremo caudal de la muestra. Destacaba la presencia de los primeros signos de diferenciación del callo en cortical y medular. Podía observarse también la calcificación

completa del callo perióstico craneal, pero no del caudal, así como la completa continuidad entre el callo y los segmentos óseos originales (Figura V.64). Debido a que el fijador externo fue retirado dos semanas antes, era posible visualizar la formación de una red ósea en el espacio cedido por los tornillos.

A pesar de que todavía era posible visualizar una delgada línea central no calcificada en la región caudal del callo, éste se encontraba estructural y funcionalmente consolidado. Esto se deduce del hecho que el animal utilizaba de forma habitual y eficiente la extremidad elongada, de la cual se habían retirado los implantes dos semanas antes. Las imágenes de la muestra revelaban la presencia de un único callo de elongación, que incluía los de origen medular y perióstico, en el que podían diferenciarse dos partes:

- **Zona central:** Atravesando perpendicularmente el callo de elongación, desde la zona central del extremo craneal al caudal, podía visualizarse una línea delgada radiolúcida. Esta estructura correspondía a una microfisura del bloque de metilmetacrilato en el que se encontraba embebida la muestra, y no a una falta de calcificación de la zona central del callo como era posible pensar (Figura V.64). Por otra parte, la zona central del callo de elongación ofrecía diferencias en cuanto a su composición tisular dependiendo de su localización en dicho callo. A nivel de la cortical craneal, no era posible distinguir esta parte respecto a la porción más periférica del callo, ya que al igual que ésta, estaba compuesta por hueso fibrorreticular, lamelar y osteonal (Figura V.65). La zona central correspondiente a la cavidad medular, presentaba una unión entre el callo proximal y el distal integrado por tejido cartilaginoso calcificado y condroide de aproximadamente 200 micras de espesor (Figura V.66). Esta estructura se continuaba con el tejido integrante de la zona periférica del callo. Por último, la zona central correspondiente a la cortical caudal no exhibía una unión calcificada entre las porciones proximal y distal del callo, apareciendo como una línea radiolúcida. Sin embargo, el tejido cartilaginoso calcificado presente constituía el primer paso para la obtención de una unión inminente entre estos dos callos (Figura V.67).

- **Zona periférica:** Utilizando pocos aumentos para la visualización de esta zona del callo, podía observarse cómo el hueso neoformado próximo a la cortical original se organizaba dando una estructura más compacta con espacios vasculares dispuestos longitudinalmente, mientras que a nivel de la cavidad medular, la morfología era menos densa y regular. Se descubría así el inicio del proceso de corticalización (Figura V.64). De forma similar a lo descrito en el apartado anterior, era posible establecer diferencias entre los tejidos que formaban el callo dependiendo de su localización. El callo situado a nivel de la cortical contenía hueso fibrorreticular, lamelar y osteonal claramente visibles mediante el microscopio electrónico de retrodispersión (Figura V.68), al igual que la zona periférica correspondiente a la cavidad medular, aunque en ésta la proporción de hueso lamelar y osteonal era menor (Figura V.69). El callo contiguo al córtex original, presentaba una estructura lamelar y osteonal tan similar al fragmento original que resultaba difícil su diferenciación (Figuras V.70 y V.71). El callo medular adyacente a la cavidad medular, mostraba una conformación muy similar a esta última estructura. En cuanto a la región no unida del callo de elongación, podía observarse la presencia de cartílago no calcificado y condroide en contacto con la zona central no calcificada (Figura V.67), y hueso fibrorreticular en el resto del callo. Este tejido contenía a su vez pequeñas cantidades de hueso lamelar y osteonal. La continuidad del callo con el segmento óseo original era completa, tanto a nivel cortical como medular. Podían visualizarse unidades osteonales y ramas vasculares cruzando esta línea de unión entre ambas estructuras, demostrando el avanzado estado de remodelación e integración óseas (Figura V.71).

En cuanto al callo perióstico, la línea central no calcificada únicamente era visible en el callo caudal. La zona periférica a este nivel estaba formada por un área de cartílago calcificado y condroide contigua a la zona central, y el resto del callo, el cual contenía hueso fibrorreticular y lamelar, con pequeñas acumulaciones de tejido condroide. No se observaban claramente formaciones osteonales. Por el contrario, el callo situado en el extremo craneal, ofrecía una calcificación completa de toda su estructura (Figura V.64). La zona más central estaba compuesta por hueso

fibrorreticular y una pequeña cantidad de tejido condroide, pudiendo visualizarse signos incipientes de formación de hueso lamelar. Mientras, la zona periférica mostraba hueso fibrorreticular, lamelar, osteonal y alguna agrupación aislada de condroide.

Con respecto a la cavidad medular, era posible observar la reactividad ósea a nivel de esta estructura principalmente en la zona en la que habían estado situados los tornillos, aunque podía apreciarse una leve reacción en las proximidades de la osteotomía (Figura V.72). Estas estructuras estaban formadas por hueso fibrorreticular y lamelar dispuesto de forma irregular. Asimismo, era posible observar la presencia de grandes acumulaciones de Sulfato de Bario en el interior de vasos intramedulares. Destacaba en esta fase de la evolución, la formación de hueso fibrorreticular inmaduro y condroide en el interior de las cavidades que habían sido ocupadas por los implantes. Dicho hueso se organizaba en forma de red muy fina (Figura V.73).

3.11.-DESCRIPCION MORFOLOGICA DEL HUESO CONTROL

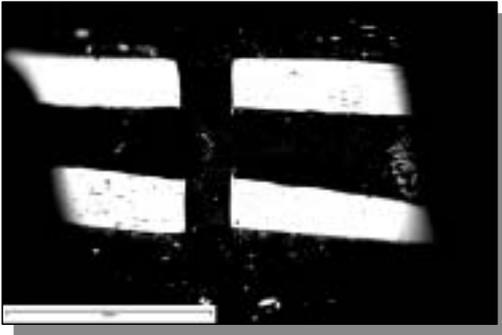
Esta muestra correspondía a un hueso al que no se le había realizado cirugía ni elongación alguna. Las imágenes obtenidas mediante el microscopio electrónico de retrodispersión, nos permitían observar la anatomía normal del hueso (Figura V.74). Destacaba la presencia de contraste baritado tanto en la cavidad medular como en los espacios vasculares de la cortical.

El córtex del hueso, estaba constituido por hueso lamelar y osteonal, en el que podían apreciarse osteonas primarias y secundarias. Las primeras correspondían a unidades osteonales formadas recientemente, mientras que las segundas eran restos de unidades osteonales originadas por la remodelación de estas estructuras. La cortical del hueso contenía a su vez canales vasculares longitudinales (Havers) y transversales (Bowmann) comunicados entre ellos (Figura V.75).

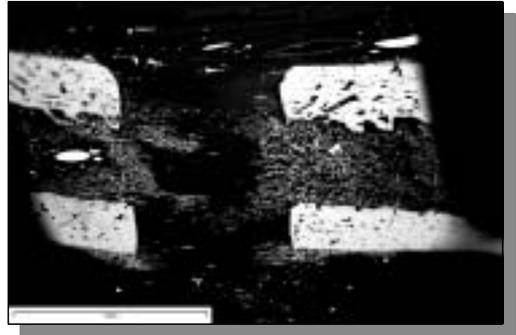
La cavidad medular apenas mostraba tejido calcificado en su interior. Únicamente podían observarse pequeñas prolongaciones calcificadas que, surgiendo del endostio, se proyectaban hacia el interior de la cavidad. Dichas ramificaciones estaban formadas por hueso fibrorreticular y lamelar.

3.12.- ANEXO V-FOTOS

a



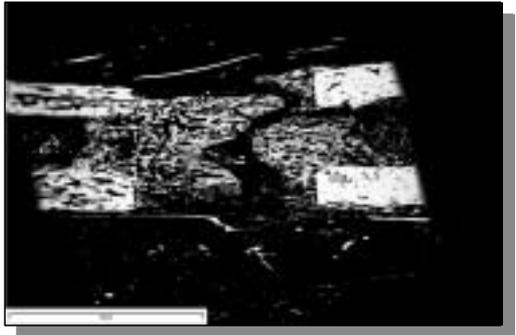
b



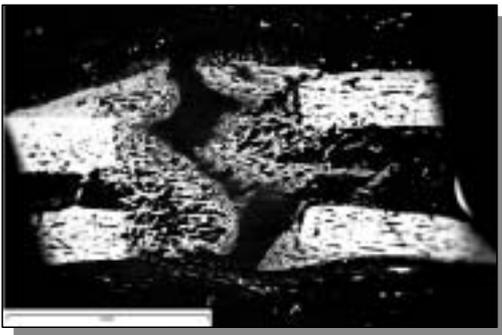
c



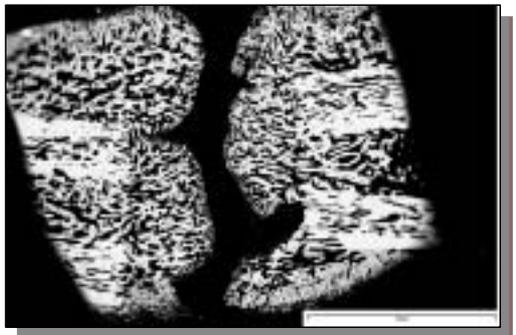
d



e



f



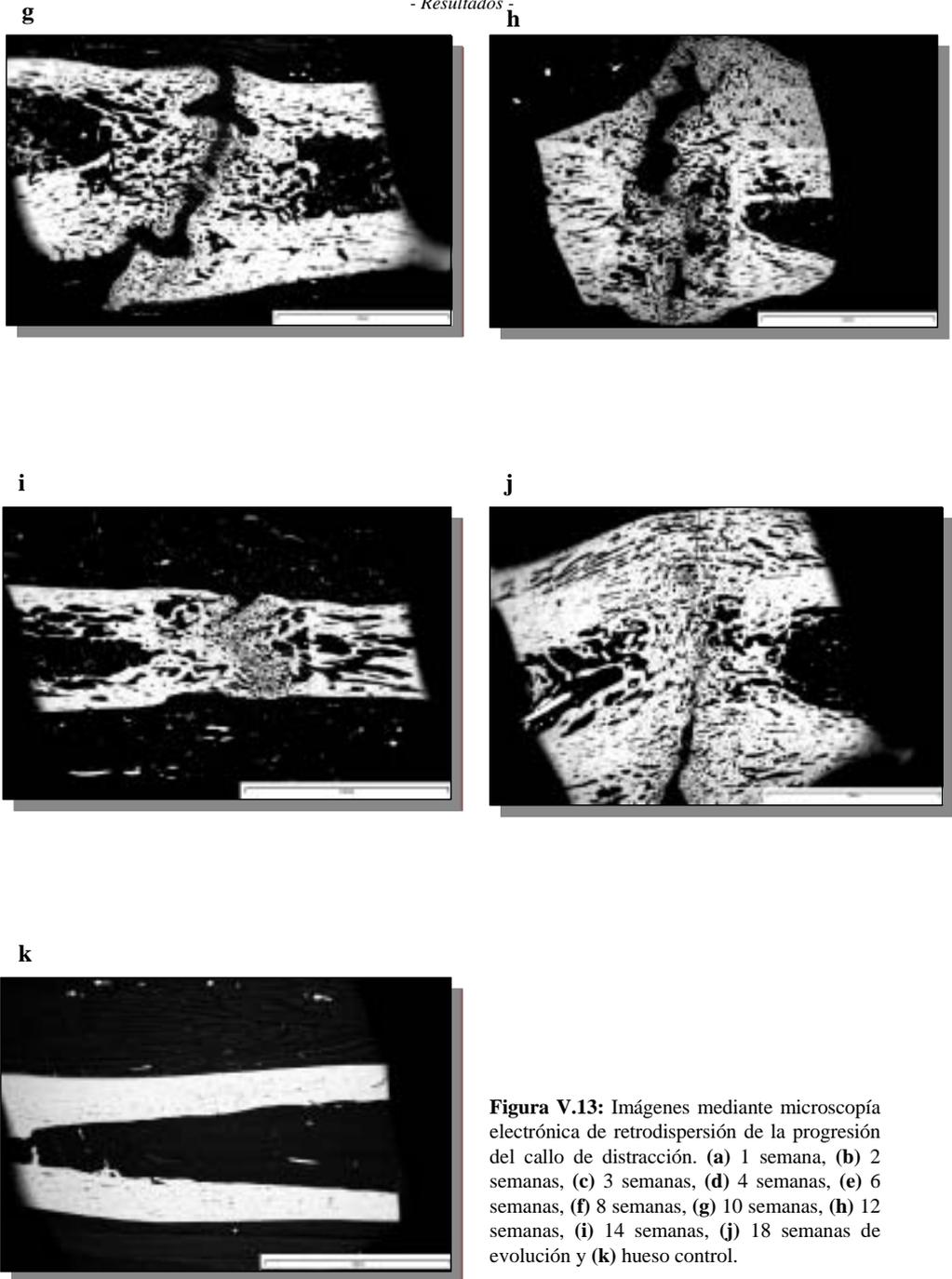


Figura V.13: Imágenes mediante microscopía electrónica de retrodispersión de la progresión del callo de distracción. **(a)** 1 semana, **(b)** 2 semanas, **(c)** 3 semanas, **(d)** 4 semanas, **(e)** 6 semanas, **(f)** 8 semanas, **(g)** 10 semanas, **(h)** 12 semanas, **(i)** 14 semanas, **(j)** 18 semanas de evolución y **(k)** hueso control.

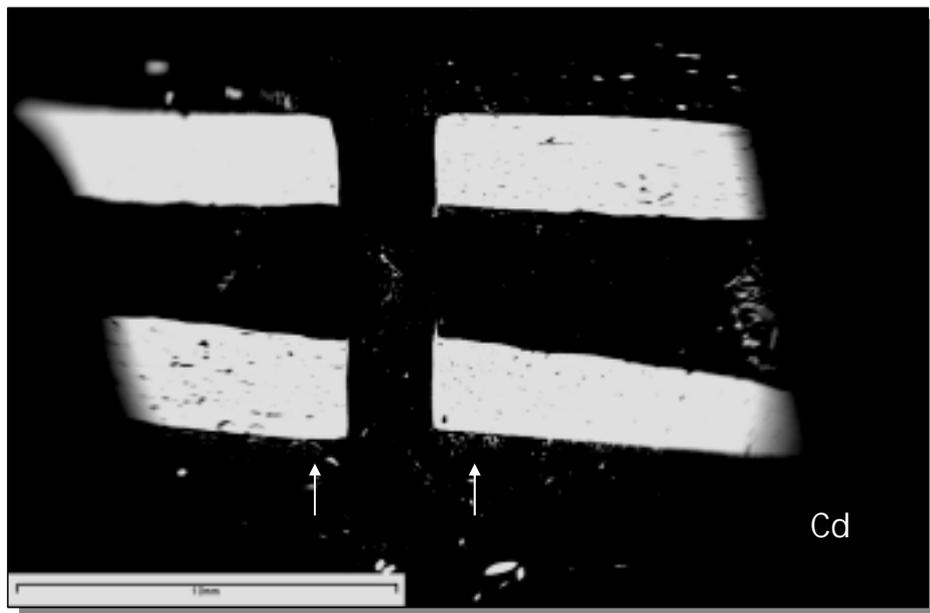
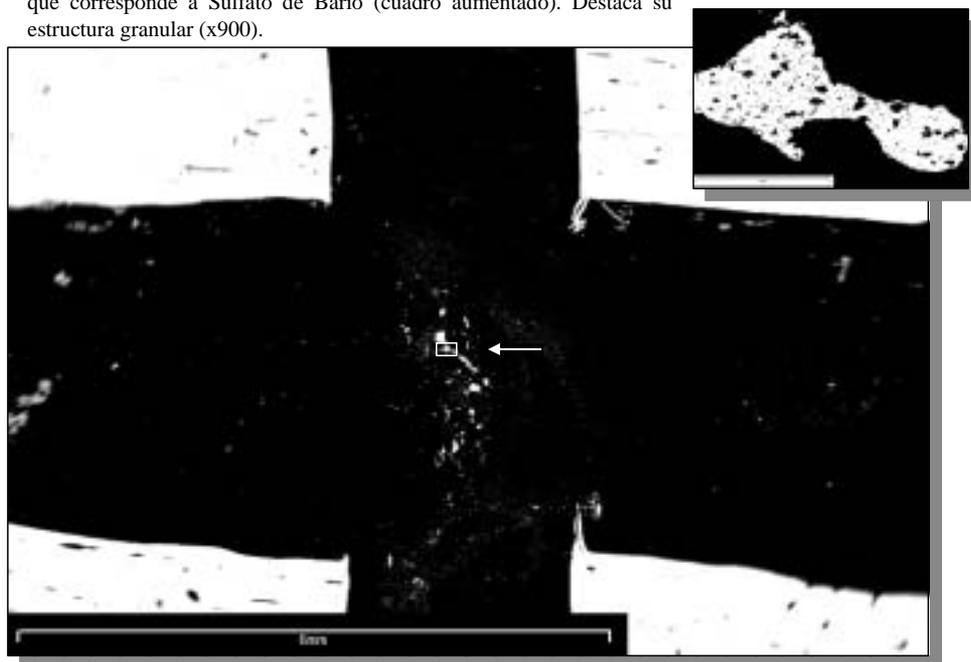


Figura V.14: Imagen panorámica (x5) de la osteotomía de 1 semana postquirúrgica (animal N° 10- EPI). Se observa la presencia incipiente de un callo perióstico caudal (flechas).

Figura V.15: Vista a mayor aumento (x10) de la figura anterior. En la zona central del espacio interfragmentario se observa material radiopaco que corresponde a Sulfato de Bario (cuadro aumentado). Destaca su estructura granular (x900).



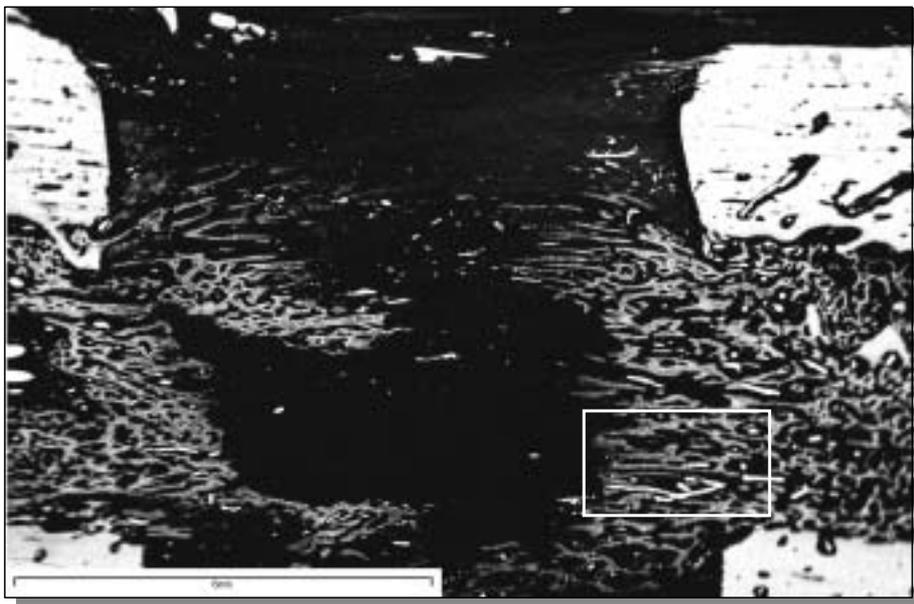
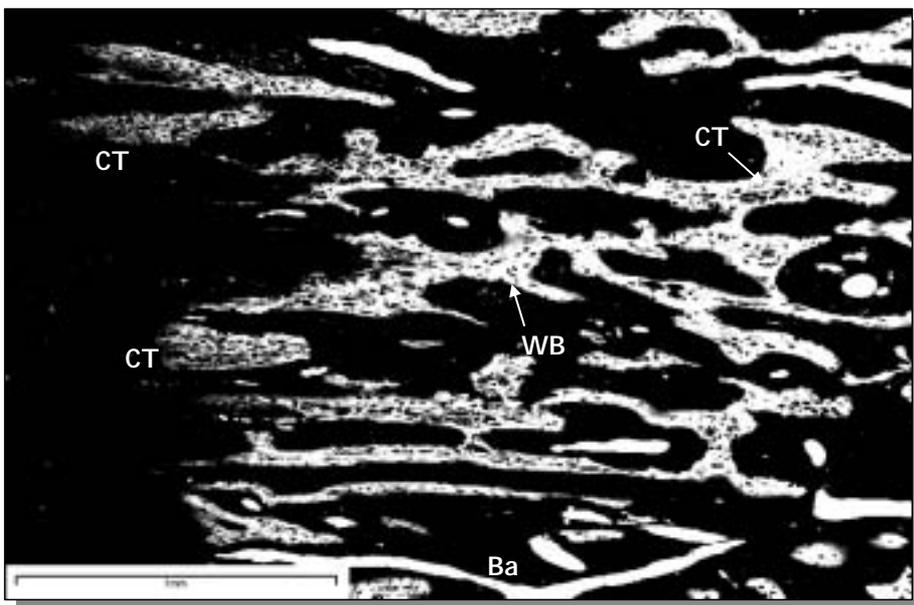


Figura V.16: Callo de distracción de 2 semanas de evolución (x10) (animal N° 11-EPI).

Figura V.17: Imagen aumentada de la zona señalada en la figura V.16 (x40). En el callo de distracción de origen medular se observa la presencia de tejido condroide (CT) y hueso fibrorreticular (WB).



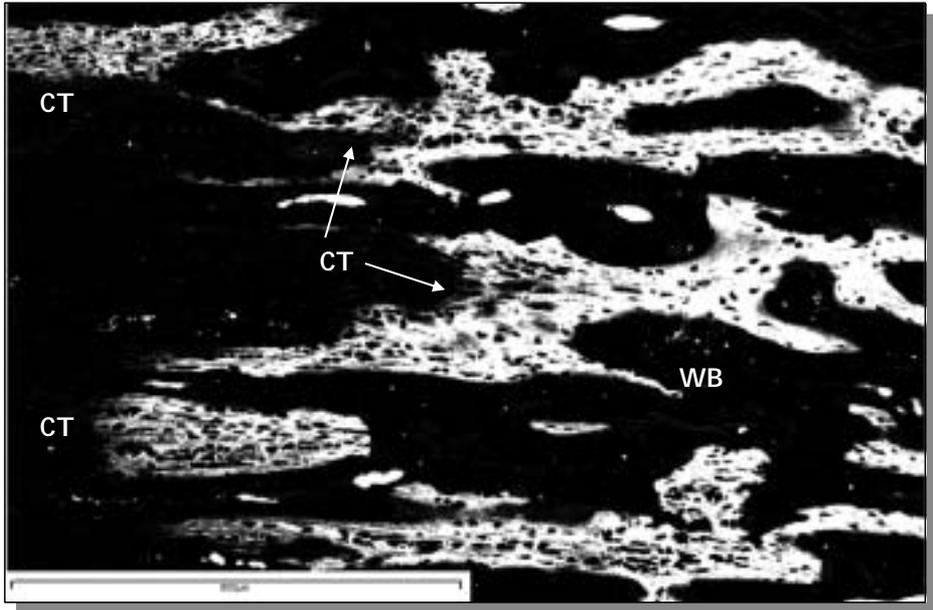
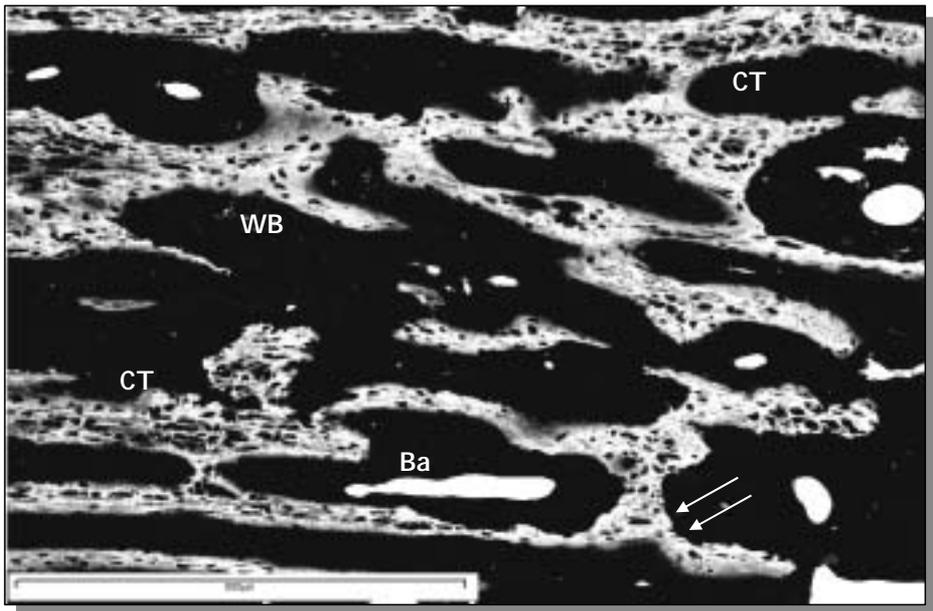


Figura V.18: Imagen aumentada (x80) de la figura anterior de 2 semanas de evolución. Se observa el frente de mineralización con presencia de tejido condroide (CT).

Figura V.19: Detalle (x80) de la figura V.17. (2 semanas, animal N° 11-EPI). Zona de formación de microcolumnas, con presencia de tejido condroide (CT) y hueso fibrorreticular (WB). Signos incipientes de remodelación con presencia de lagunas de Howship (flechas).



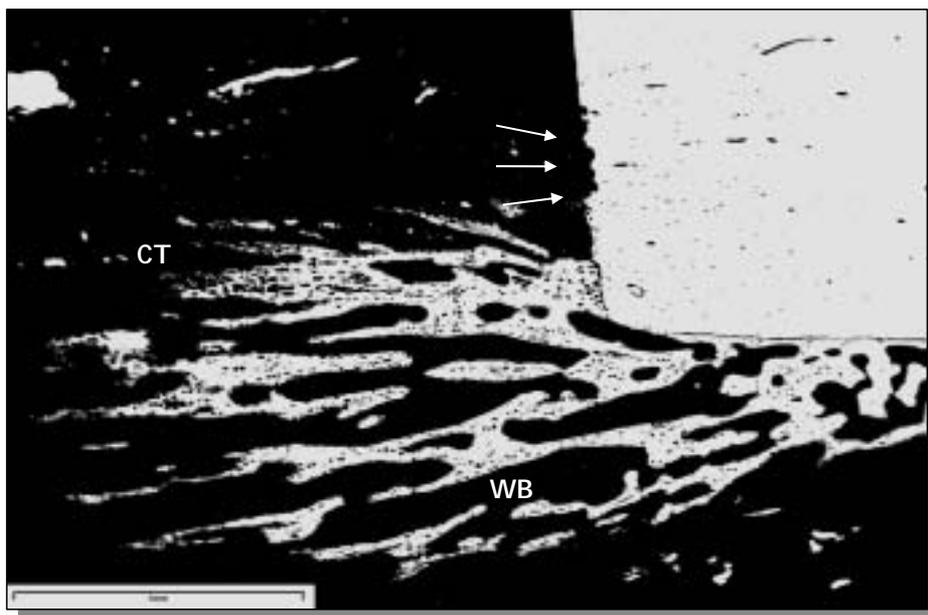
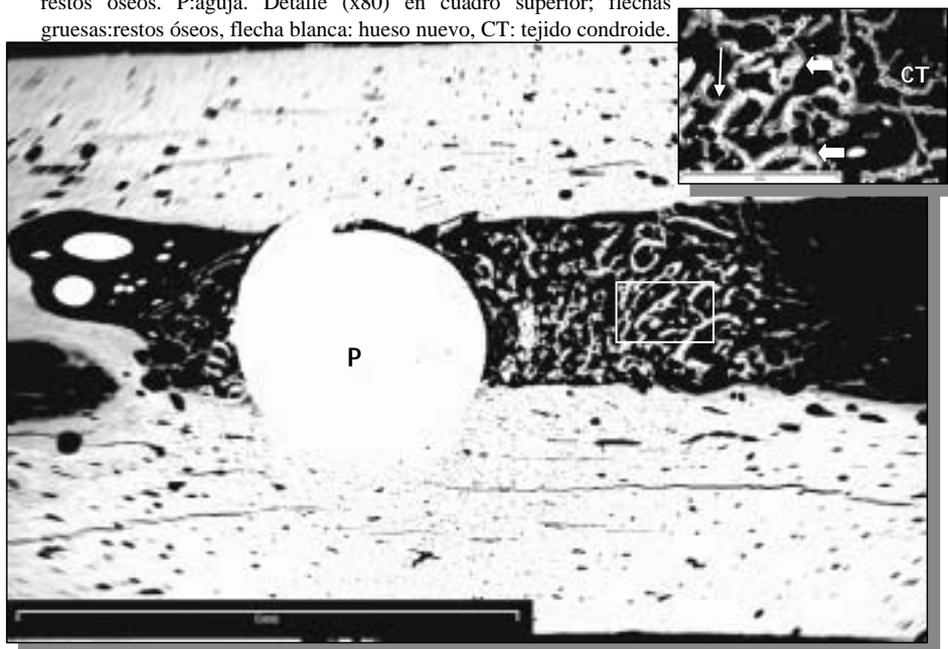


Figura V.20: (animal N° 12-EPD) Callo de distracción de origen perióstico de 2 semanas de evolución (x40) de localización caudal. Presencia de tejido condroide (CT) y hueso fibrorreticular (WB). Flechas: lagunas de Howship en superficie cortical osteotomizada.

Figura V.21: (animal N° 12-EPD, 2 semanas) Imagen panorámica (x10) de la actividad osteogénica en cavidad medular e integración de restos óseos. P:aguja. Detalle (x80) en cuadro superior; flechas gruesas:restos óseos, flecha blanca: hueso nuevo, CT: tejido condroide.



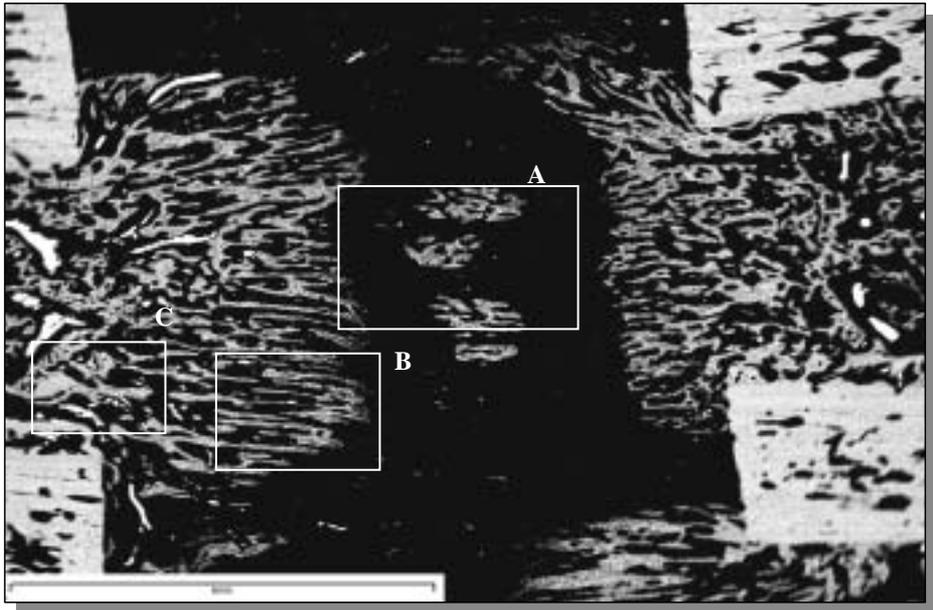
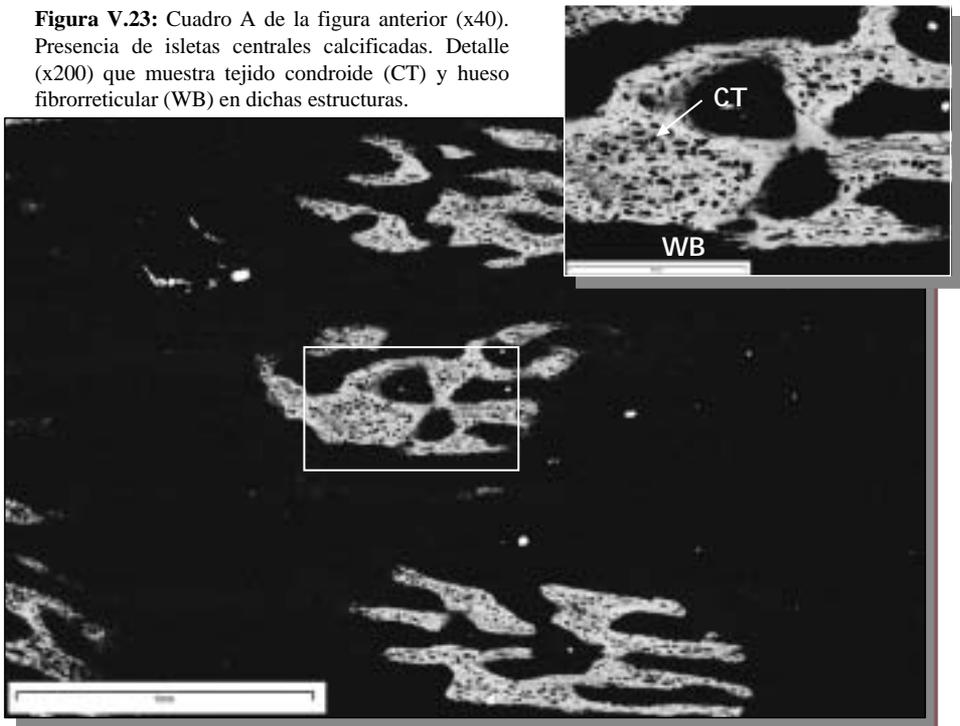


Figura V.22: Callo de distracción de 3 semanas de evolución (x10) (animal N° 8-EPI). Se observa la presencia de isletas de tejido calcificado en la zona central de crecimiento (A), la Zona de mineralización (B) y de remodelación (C).

Figura V.23: Cuadro A de la figura anterior (x40). Presencia de isletas centrales calcificadas. Detalle (x200) que muestra tejido condroide (CT) y hueso fibrorreticular (WB) en dichas estructuras.



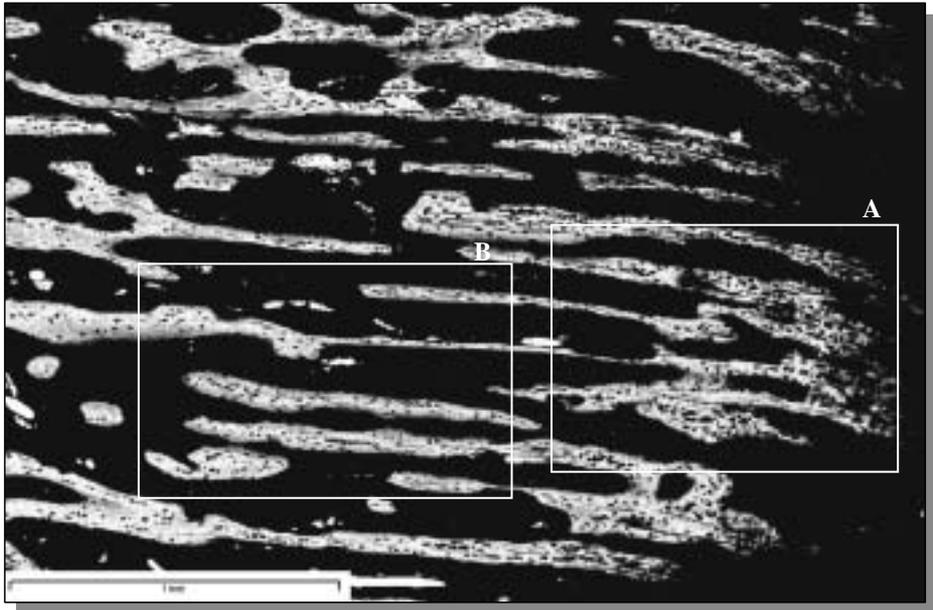
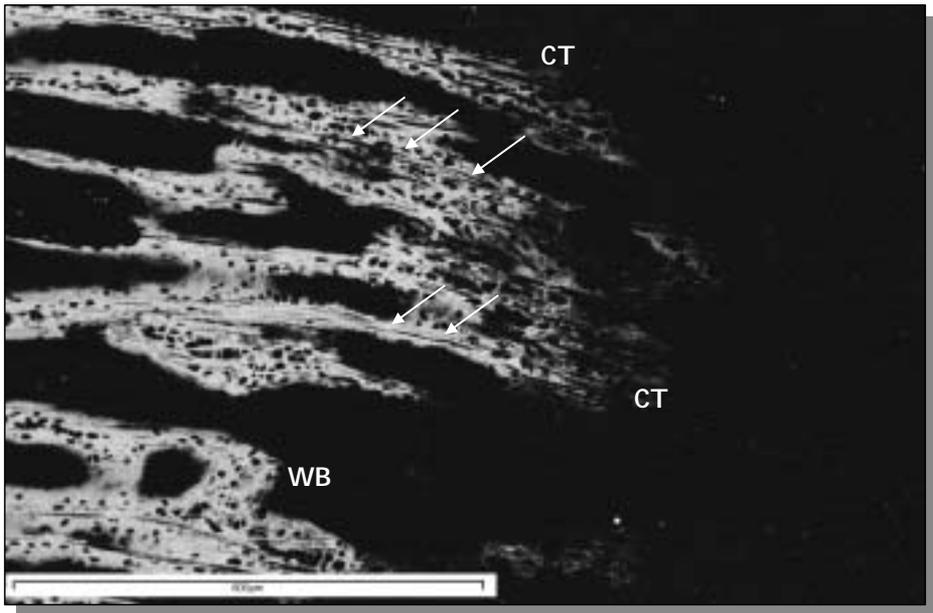


Figura V.24: Cuadro B de la figura V.22 (x40) que corresponde a la Zona de Mineralización del callo de distracción de 3 semanas de evolución. Puede observarse el frente de mineralización (A) y la zona de formación de microcolumnas (B).

Figura V.25: Visión más detallada (x80) del cuadro A de la imagen anterior. Frente de mineralización. CT: tejido condroide, flechas: defectos lineales electrolúcidos que podrían corresponder a fibras de colágenos orientadas en la dirección de la distracción (Fibras de Sharpey).



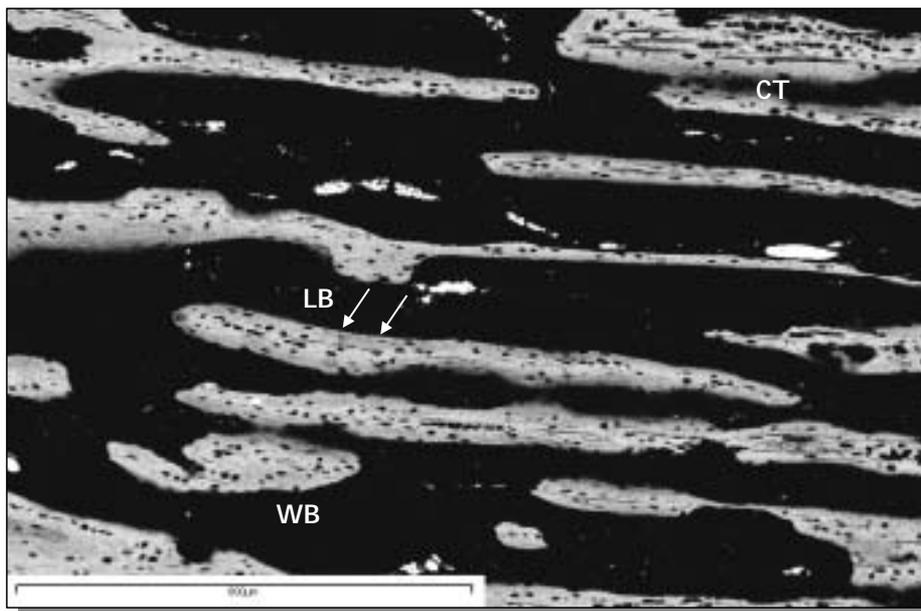
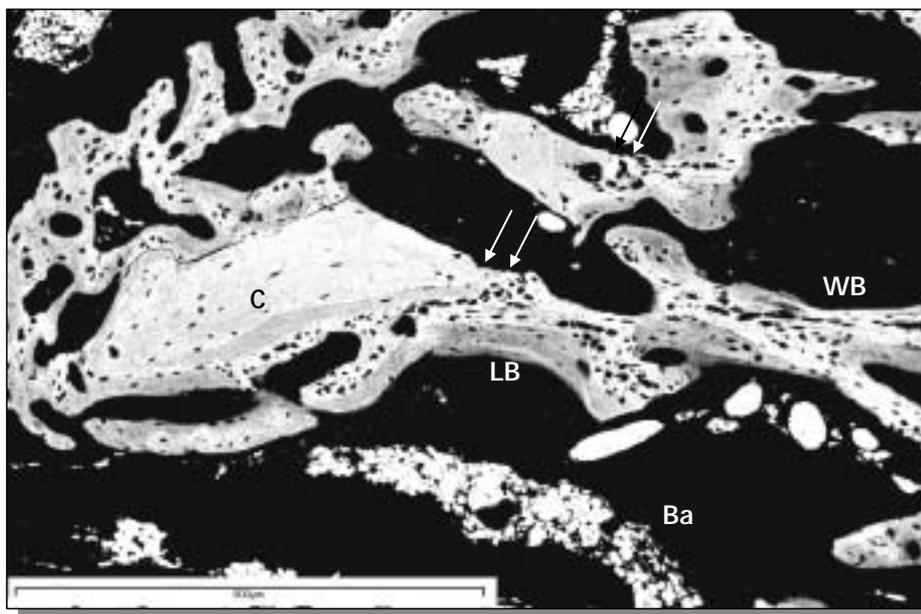


Figura V.26: Imagen más detallada (x80) de la zona B de la figura V.23 (3 semanas). Zona de formación de microcolumnas. CT: tejido condroide, WB: hueso fibrorreticular, LB+flechas: hueso lamelar.

Figura V.27: Imagen a mayor aumento (x80) del cuadro C de la figura V.22. Zona de remodelación y cavidad medular. WB: hueso fibrorreticular, LB: hueso lamelar, C: restos de hueso cortical, flechas: lagunas de Howship.



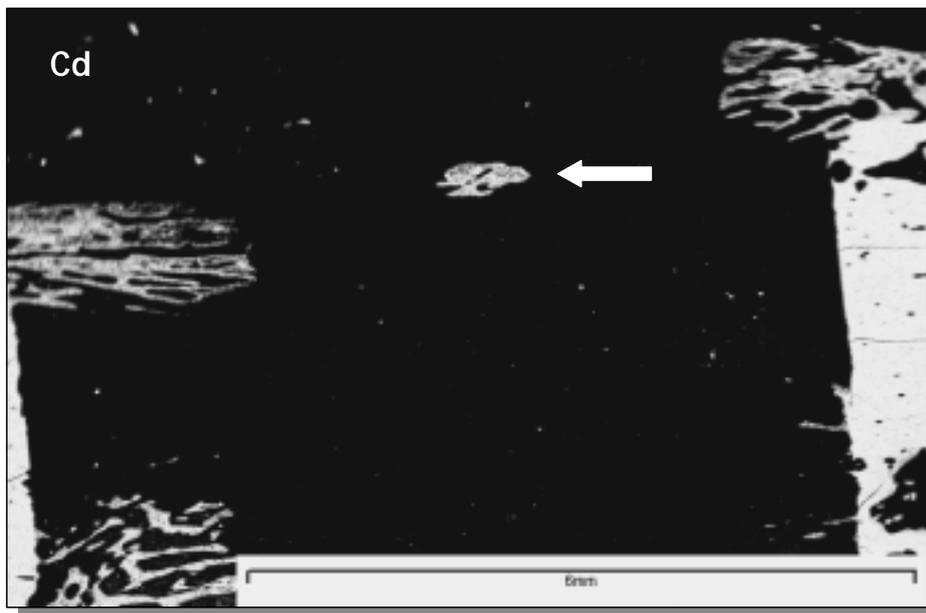
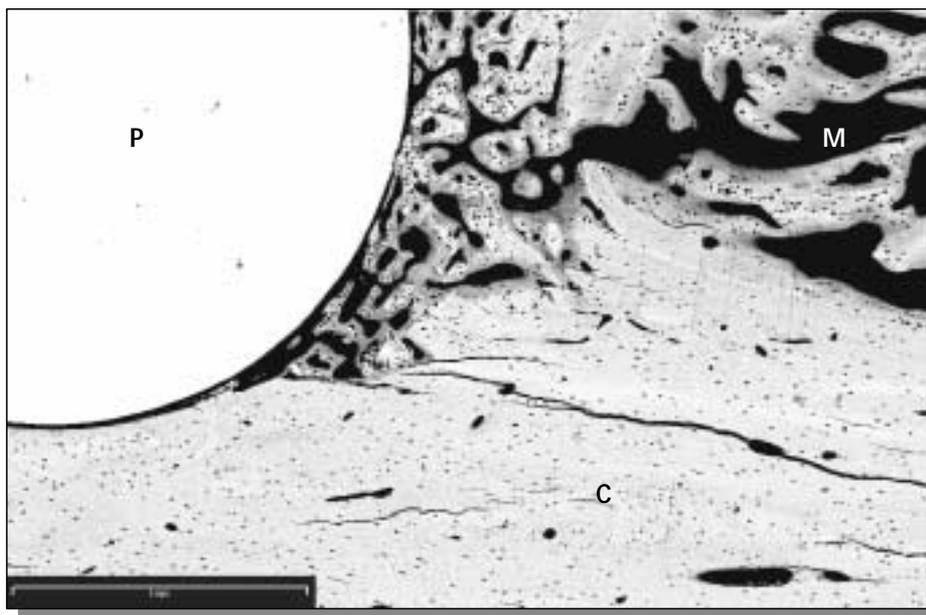


Figura V.28: Imagen panorámica (x10) del callo de distracción de origen perióstico (caudal) de 3 semanas de evolución (animal N° 7-EPI). Se observa la presencia de un islote de tejido calcificado en la Zona Central de Crecimiento (flecha).

Figura V.29: (animal N° 7-EPI, 3 semanas) Imagen (x40) de la interfase entre la aguja, el hueso cortical y la cavidad medular. P: aguja, C: hueso cortical, M: cavidad medular.



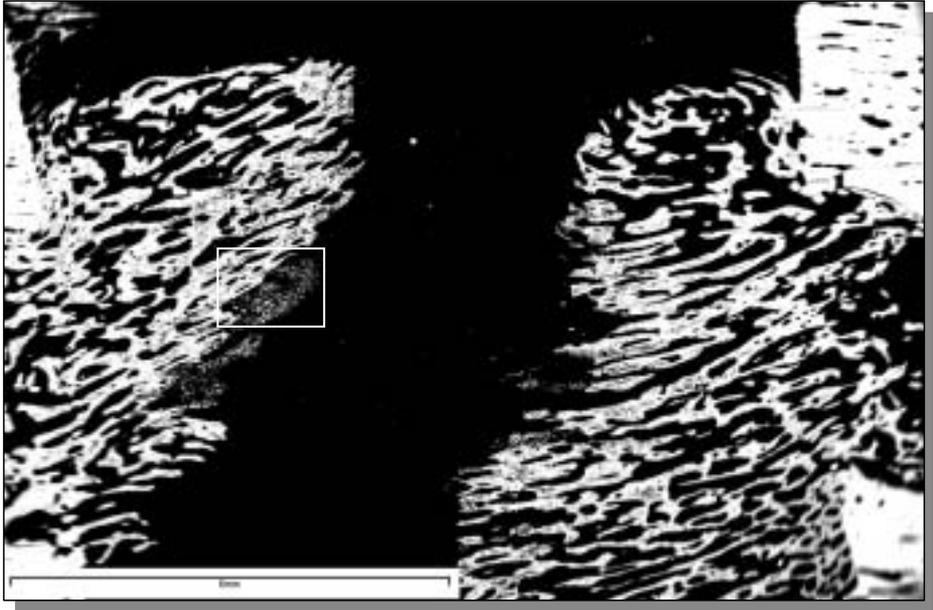
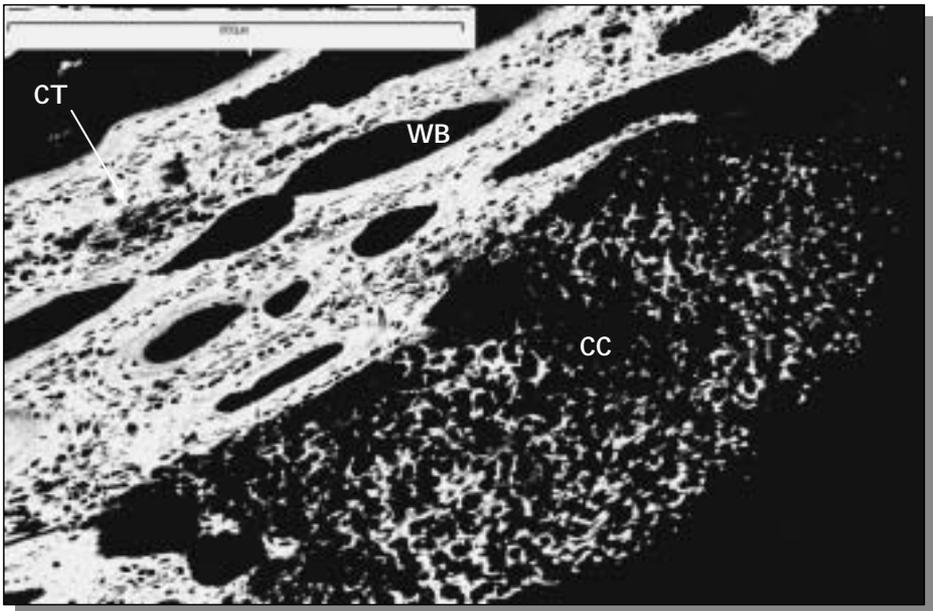


Figura V.30: Vista panorámica (x10) del callo de distracción de 4 semanas de evolución (animal N° 3-EPI).

Figura V.31: Detalle (x80) del cuadro señalado en la imagen anterior. Presencia de un foco de tejido cartilaginoso calcificado en el frente de mineralización. CC: cartílago calcificado, CT: tejido condroide, WB: hueso fibrorreticular.



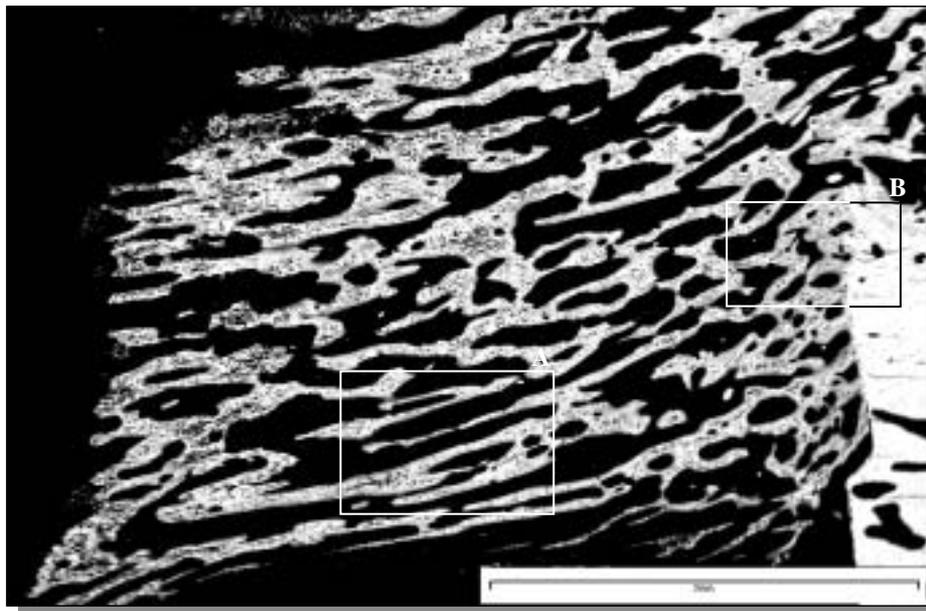
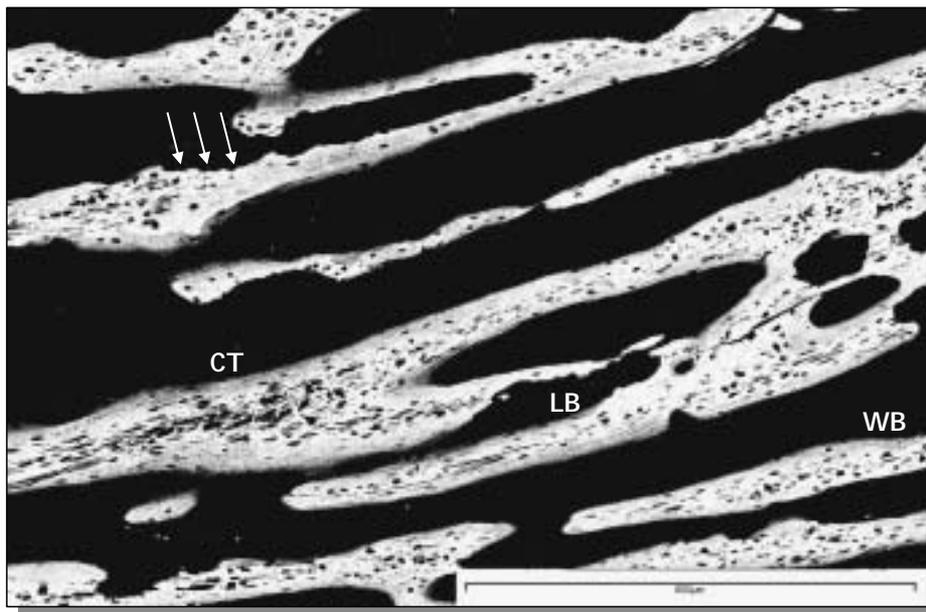


Figura V.32: (animal N° 3-EPI, 4 semanas) Imagen (x20) del callo de distracción distal (derecha en figura V.29). Destaca la presencia de Zona de Remodelación (B) y la integración entre el callo y el hueso cortical.

Figura V.33: Detalle (x80) correspondiente al cuadro A de la imagen anterior. Zona de formación de microcolumnas, dispuestas en la dirección de la distracción formadas por hueso fibrorreticular (WB) y hueso lamelar (LB). Presencia de núcleos aislados de tejido condroide (CT) y lagunas de Howship (flechas).



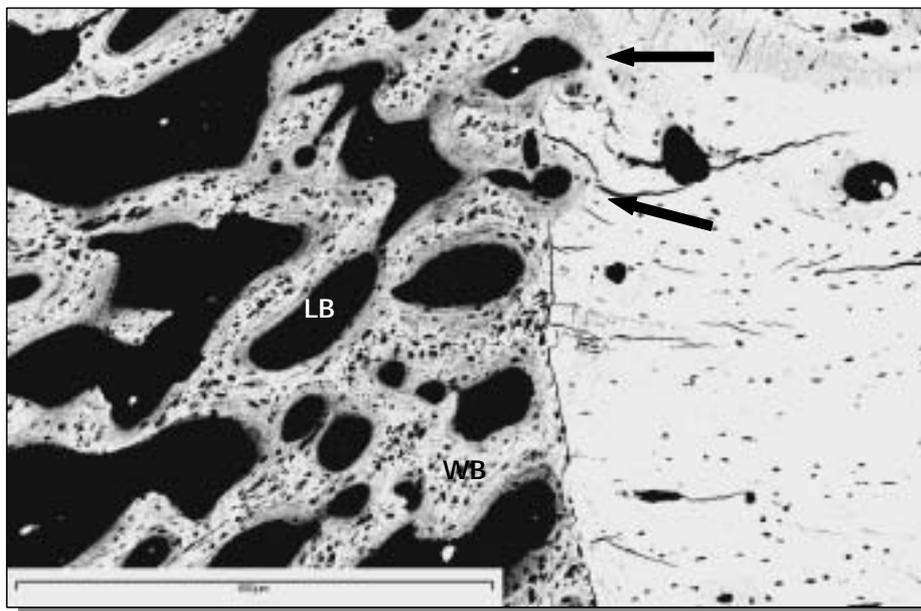
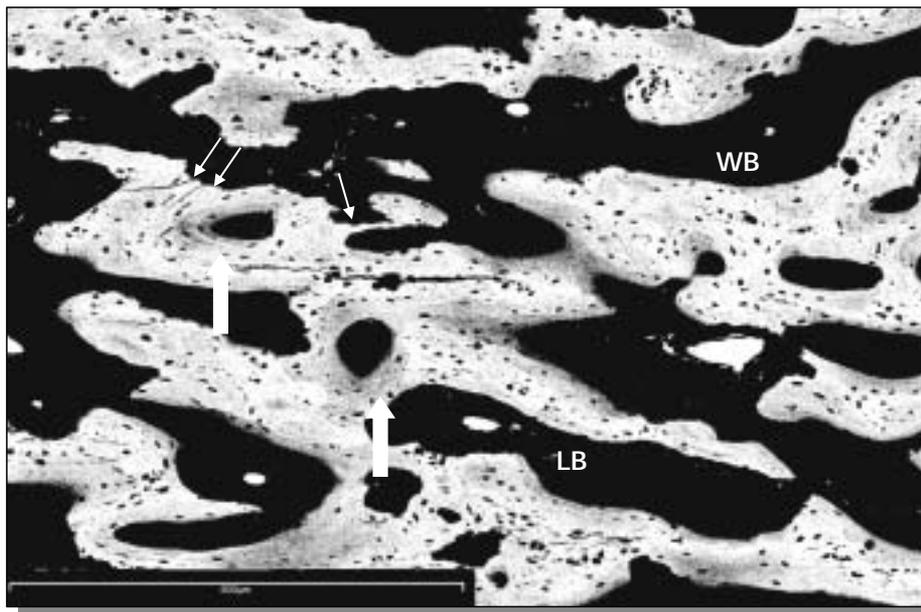


Figura V.34: Imagen aumentada (x80) del cuadro B de la figura V.31. Integración entre el callo de distracción y el hueso cortical con la presencia de conos interfragmentarios de remodelación atravesando dicha unión (flechas). (WB): hueso fibrorreticular y (LB): hueso lamelar.

Figura V.35: (animal N° 2-EPI, 4 semanas). Imagen (x80) de la Zona de Remodelación en la que se ha perdido la distribución lineal en forma de columnas. Destaca la presencia de tejidos calcificados más maduros WB: hueso fibrorreticular, LB: hueso lamelar, flechas grandes: osteonas, flechas pequeñas: lagunas de Howship.



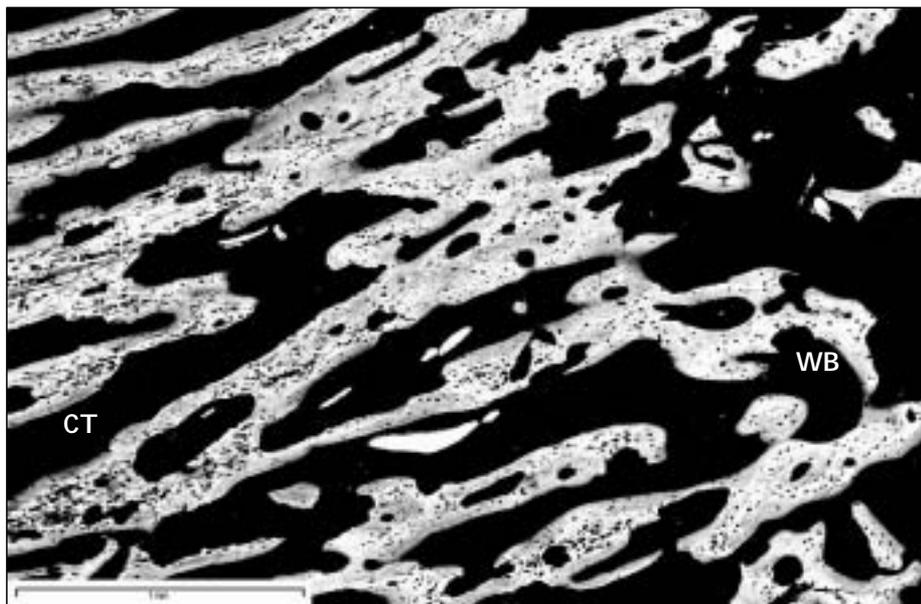
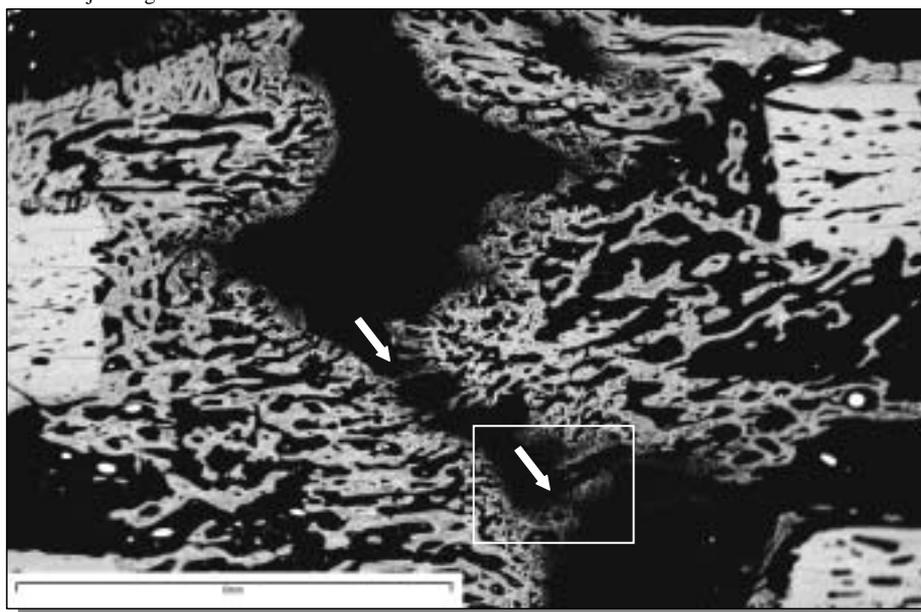


Figura V.36: Fotografía (x40) de la unión entre el callo de distracción (izda) y el tejido calcificado de la cavidad medular (dcha) a las 4 semanas postquirúrgicas (animal N° 3-EPI). Destaca la presencia más abundante de tejido condroide (CT) en el callo de elongación. WB: hueso fibrorreticular.

Figura V.37: Visión panorámica (x10) del callo de distracción de 6 semanas de evolución (animal N° 10-EPD). Presencia de puentes de unión (flechas blancas) entre las porciones proximal y distal del callo de distracción. No se observa tampoco la organización longitudinal del tejido regenerado.



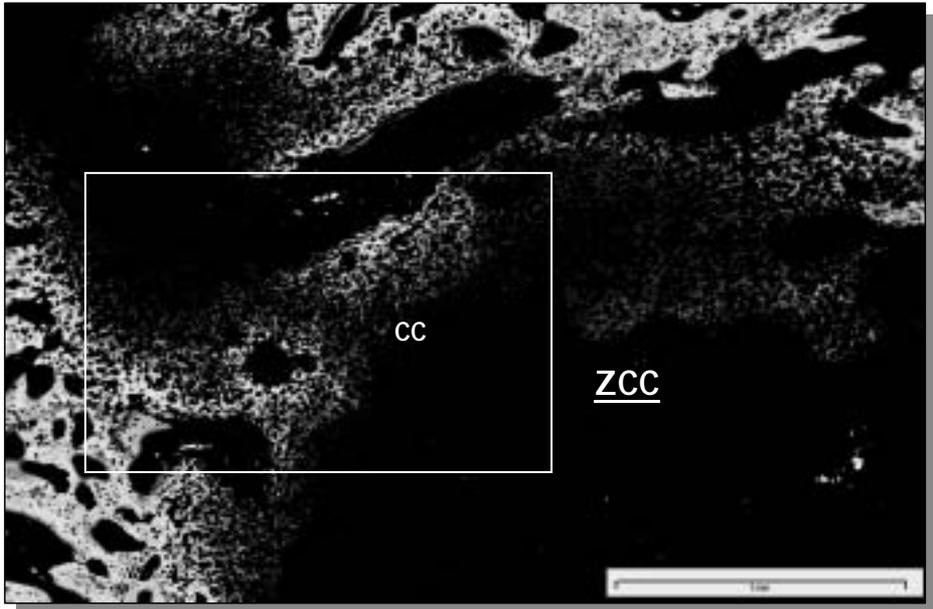
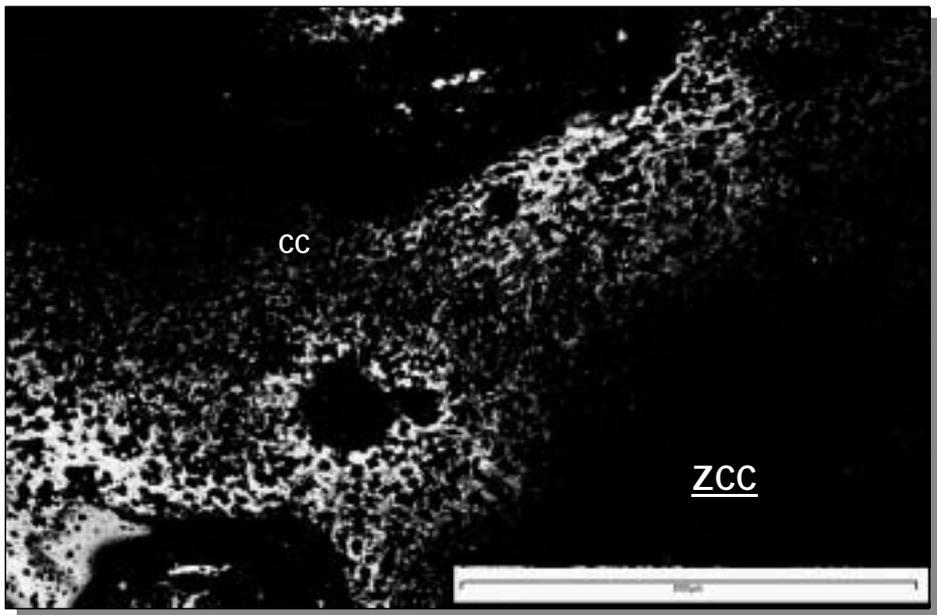


Figura V.38: Detalle (x40) del cuadro destacado en la figura anterior. Puente de unión formado por tejido cartilaginoso calcificado (CC). ZCC: Zona Central de Crecimiento.

Figura V.39: Vista a mayor aumento (x80) del puente de unión entre el callo de distracción proximal y el distal a las 6 semanas postquirúrgicas (cuadro de la imagen anterior). CC: tejido cartilaginoso calcificado, ZCC: Zona Central de Crecimiento.



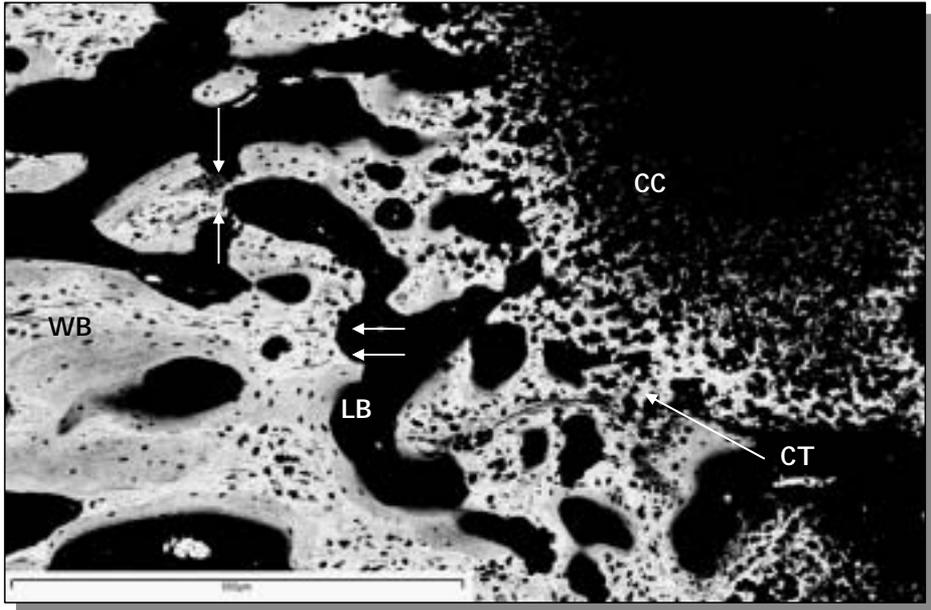
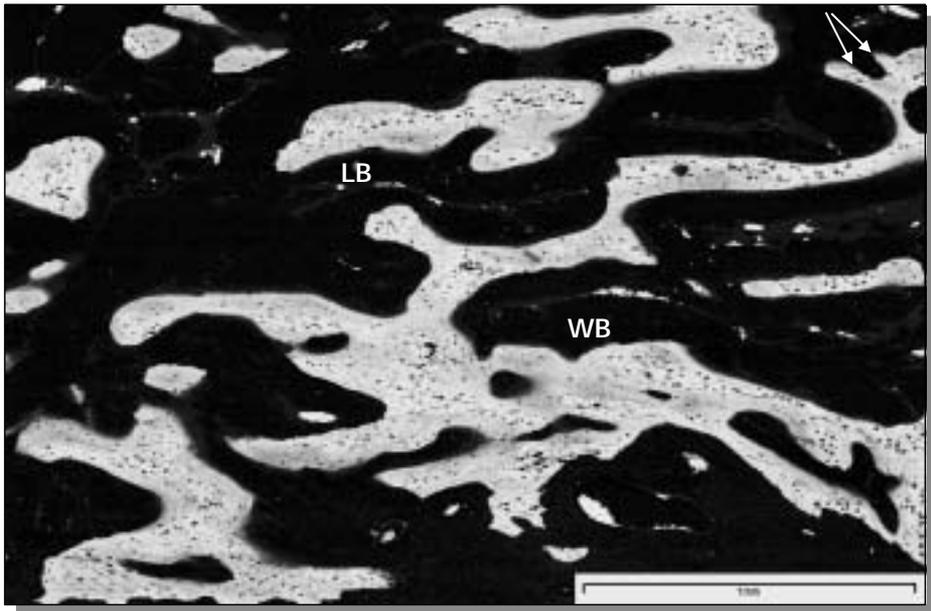


Figura V.40: Frente de mineralización del callo de distracción de 6 semanas de evolución (x80) (animal N° 10-EPD). Se observa tejido cartilaginoso calcificado (CC) y condroide (CT) y remodelación ósea por la presencia de lagunas de Howship (flechas cortas).

Figura V.41: (animal N° 10-EPD, 6 semanas, x40). Zona periférica del callo de distracción en la que se observa la pérdida de la organización en forma de columnas. WB: hueso fibrorreticular, LB: hueso lamelar, flechas: lagunas de Howship.



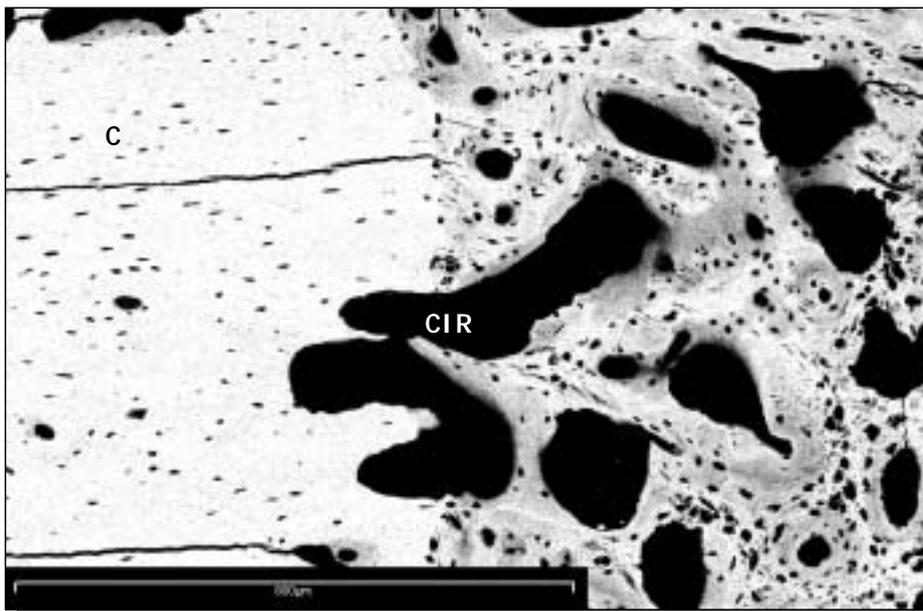
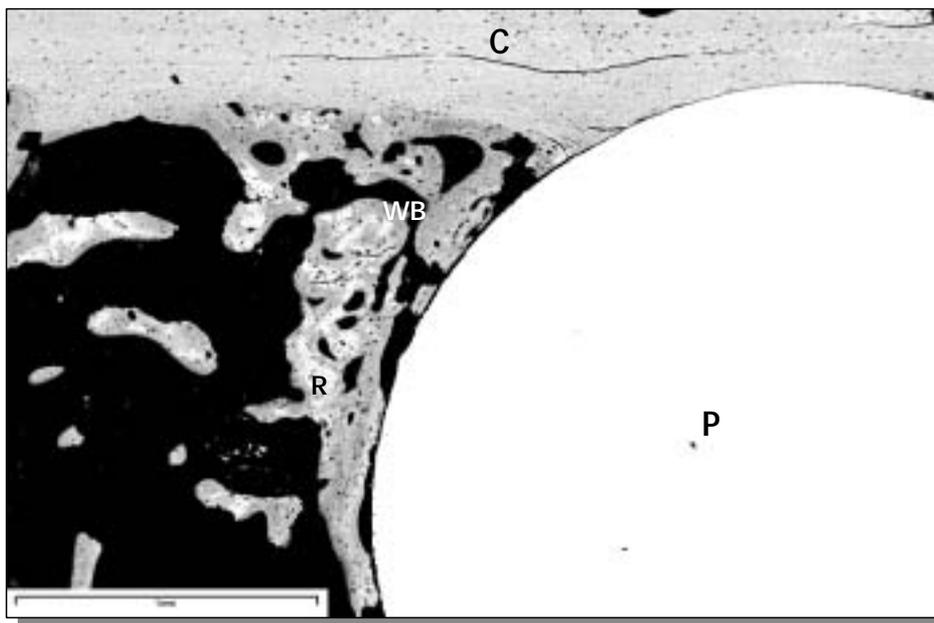


Figura V.42: Fotografía (x80) de la zona de contacto entre el callo de distracción y el hueso cortical (C) a las 6 semanas postquirúrgicas (animal N° 10-EPD). Presencia de Conos Interfragmentarios de Remodelación (CIR) que atraviesan dicha unión.

Figura V.43: Visualización (x40) de la reacción osteogénica alrededor de la aguja transfixiante a las 6 semanas (animal N° 10-EPD). Destaca la incorporación de los restos óseos procedentes de la colocación del implante (R), en el tejido neoformado. P: aguja transfixiante, C: cortical, WB: hueso fibrorreticular.



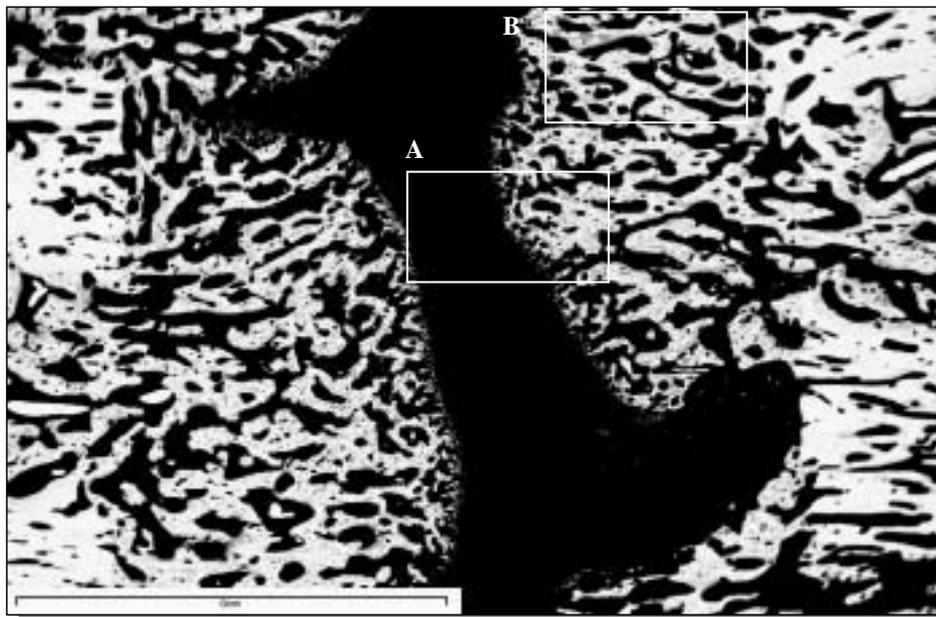
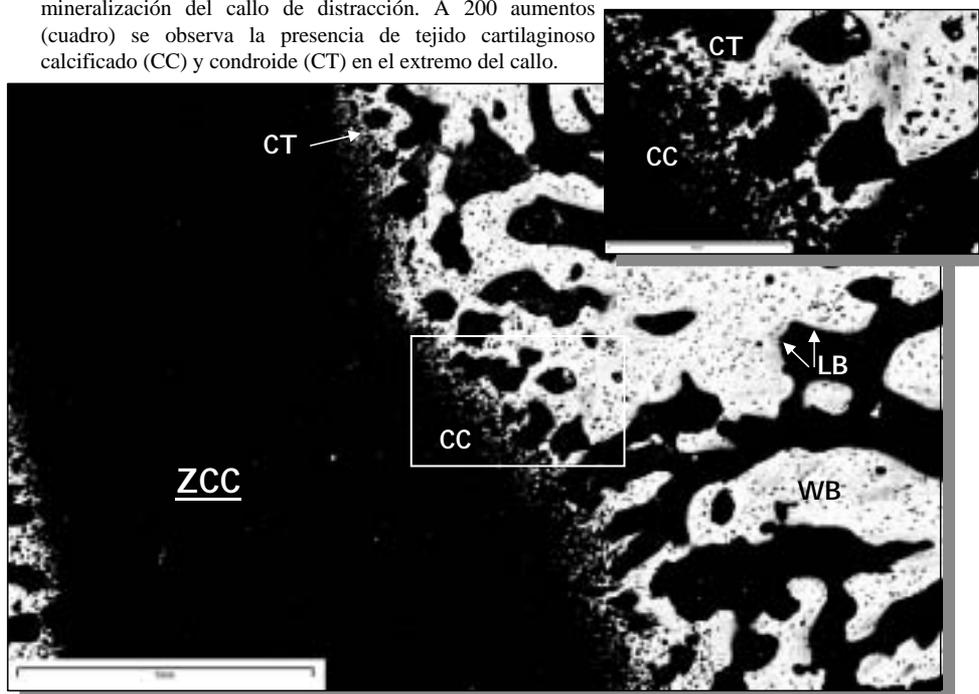


Figura V.44: Imagen panorámica (x10) del callo de distracción de 8 semanas de evolución (animal N° 8-EPD).

Figura V.45: Vista a mayor aumento (x40) del cuadro A de la imagen anterior. Zona Central de Crecimiento y frente de mineralización del callo de distracción. A 200 aumentos (cuadro) se observa la presencia de tejido cartilaginoso calcificado (CC) y condroide (CT) en el extremo del callo.



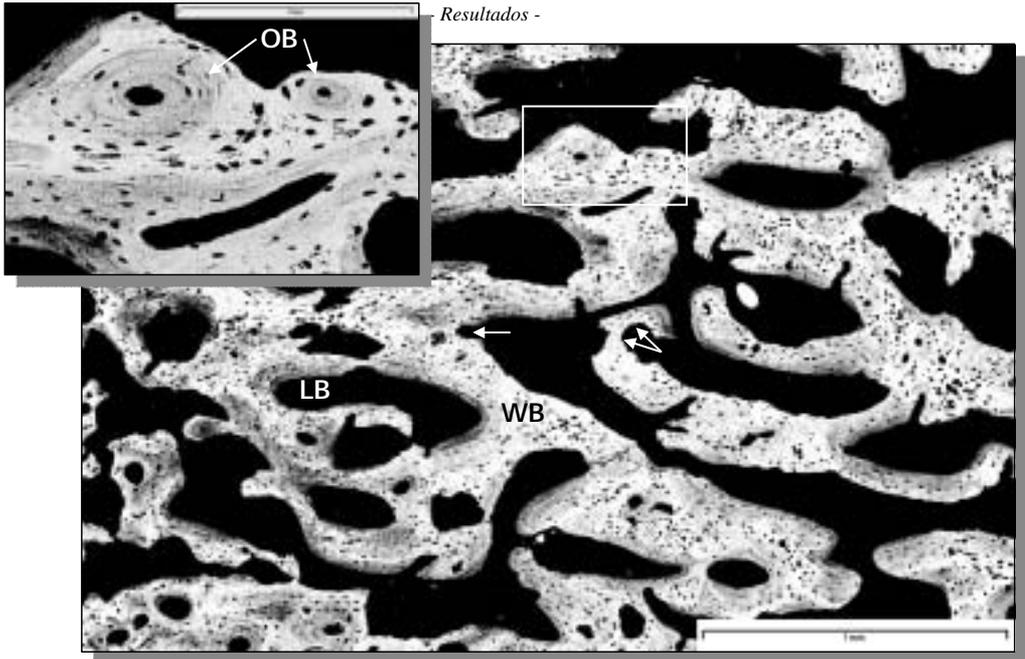
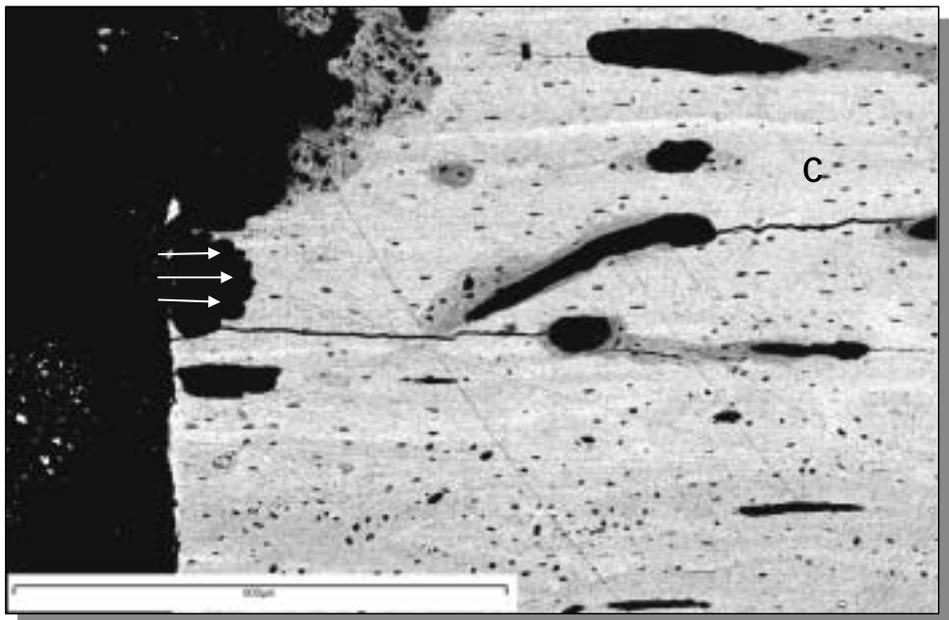


Figura V.46: Detalle (x40) del cuadro B de la figura V.43. Zona de Remodelación ósea con presencia de hueso fibrorreticular (WB), lamelar (LB) y osteonal (OB) y lagunas de Howship (flechas). A 200 aumentos (cuadro) se observa claramente unidades osteonales (flechas).

Figura V.47: Fotografía (x80) de la superficie osteotomizada a las 8 semanas postquirúrgicas (animal N° 7-EPD). Se observa remodelación del borde osteotomizado del hueso cortical, con la presencia de lagunas de Howship (flechas).



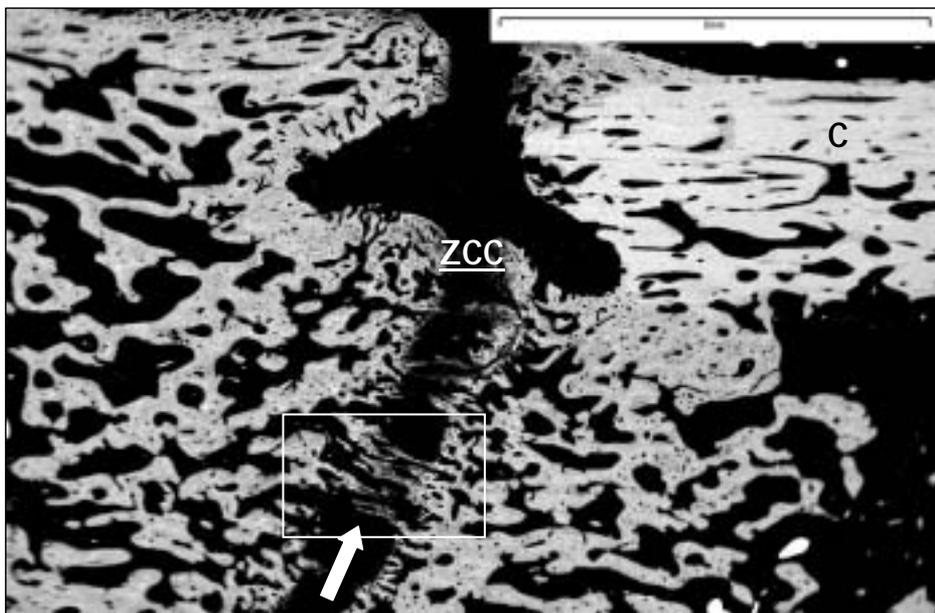
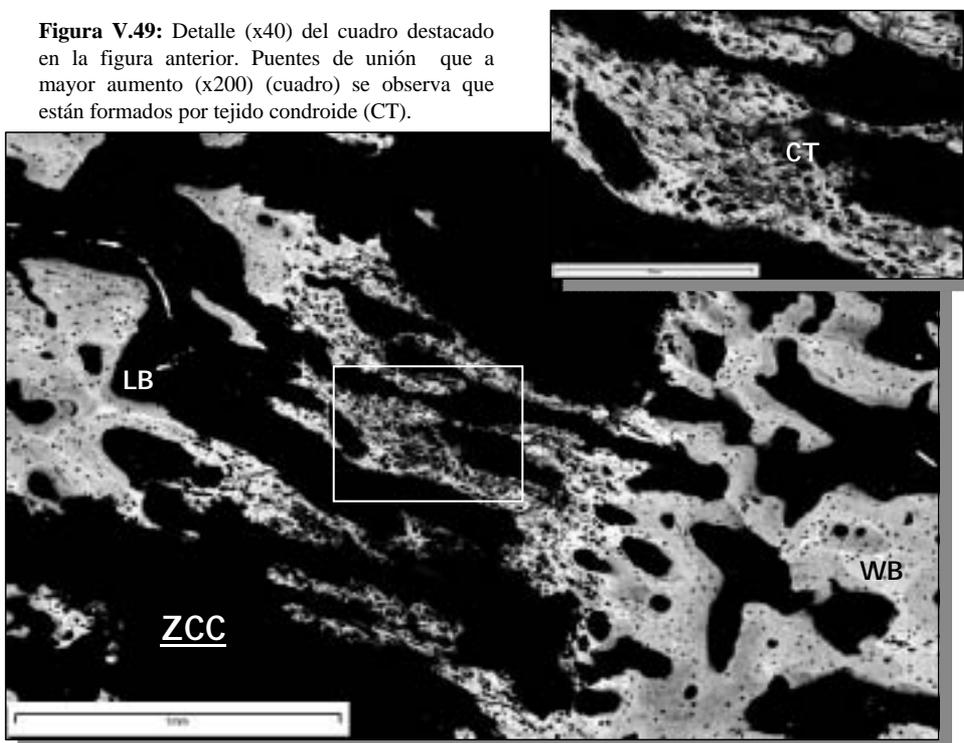


Figura V.48: Visión panorámica (x10) del callo de distracción de 10 semanas de evolución (animal N° 6-EPD). Se observan puentes de unión entre el callo proximal (izda.) y el distal (dcha.) (flecha).

Figura V.49: Detalle (x40) del cuadro destacado en la figura anterior. Puentes de unión que a mayor aumento (x200) (cuadro) se observa que están formados por tejido condroide (CT).



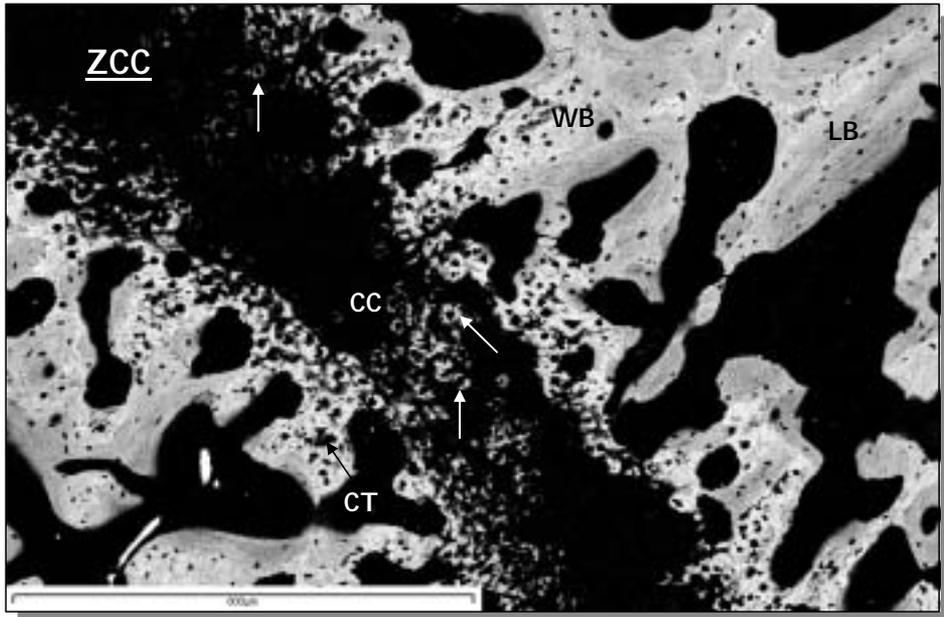
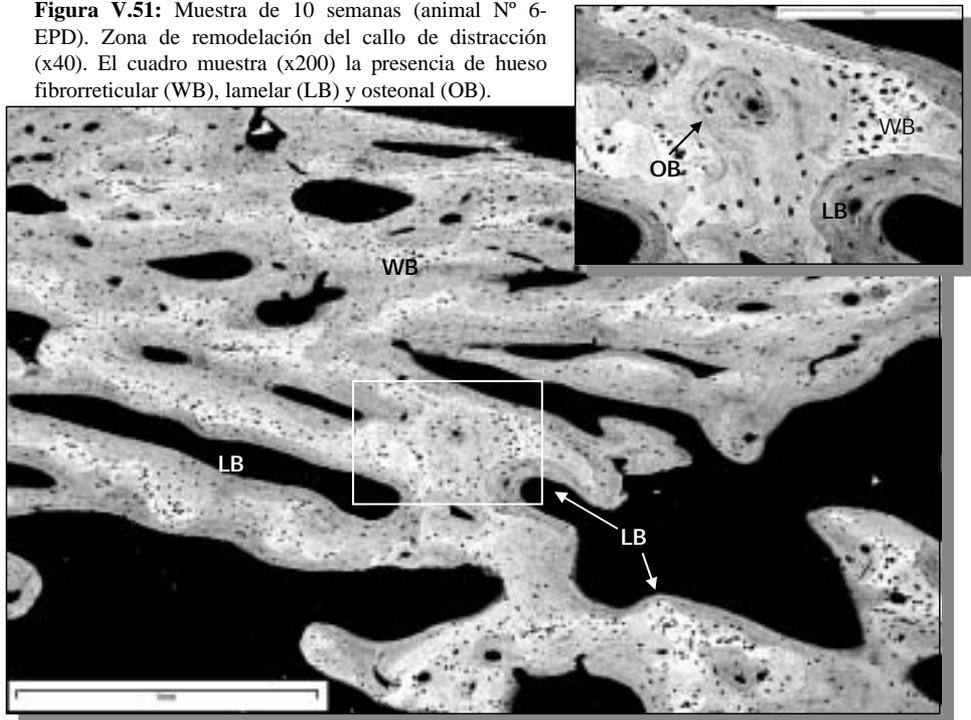


Figura V.50: Zona Central de Crecimiento con formación de puentes de unión de tejido cartilaginoso calcificado (CC) a las 10 semanas postquirúrgicas (x80) (animal N° 1-EPI). Nótese la calcificación centrífuga de ese tejido (flechas). WB: hueso fibrorreticular, LB: hueso lamelar.

Figura V.51: Muestra de 10 semanas (animal N° 6-EPD). Zona de remodelación del callo de distracción (x40). El cuadro muestra (x200) la presencia de hueso fibrorreticular (WB), lamelar (LB) y osteonal (OB).



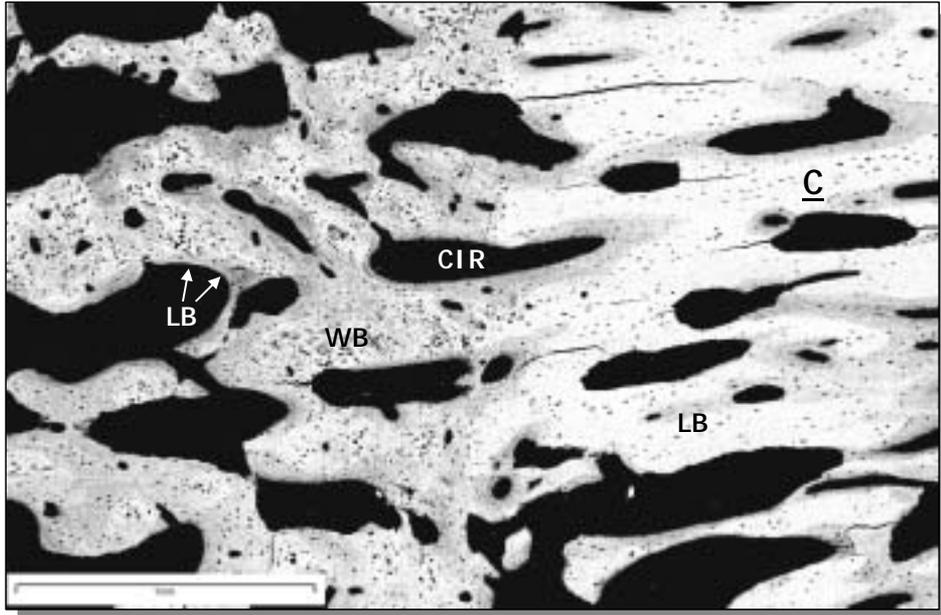
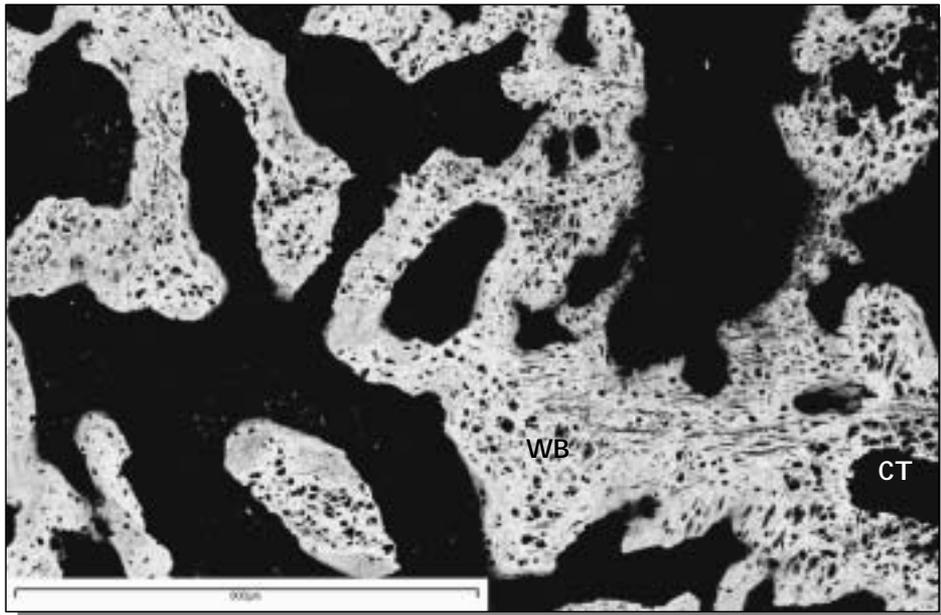


Figura V.52: Muestra de 10 semanas de evolución (animal N° 1-EPI). Integración entre el callo de distracción y el hueso cortical (x40). Se observan Conos Interfragmentarios de Remodelación atravesando la línea de unión (CIR). C: hueso cortical, WB: hueso fibrorreticular, LB: hueso lamelar.

Figura V.53: Zona de Remodelación ósea del callo de distracción de origen perióstico (x80) a las 10 semanas de evolución (animal N° 1-EPI). Destaca la menor madurez de los tejidos, predominando el hueso fibrorreticular (WB) y el tejido condroide (CT).



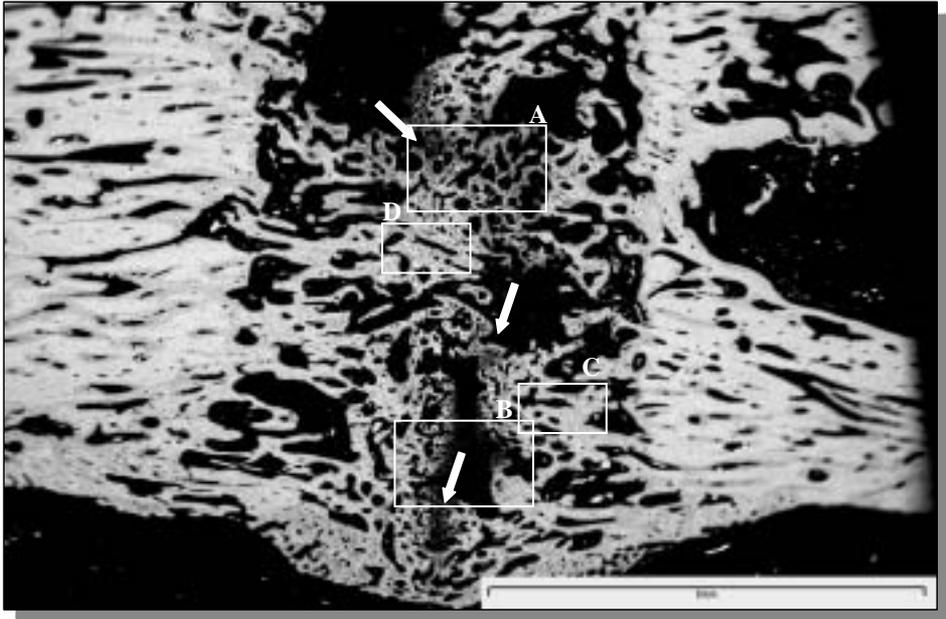
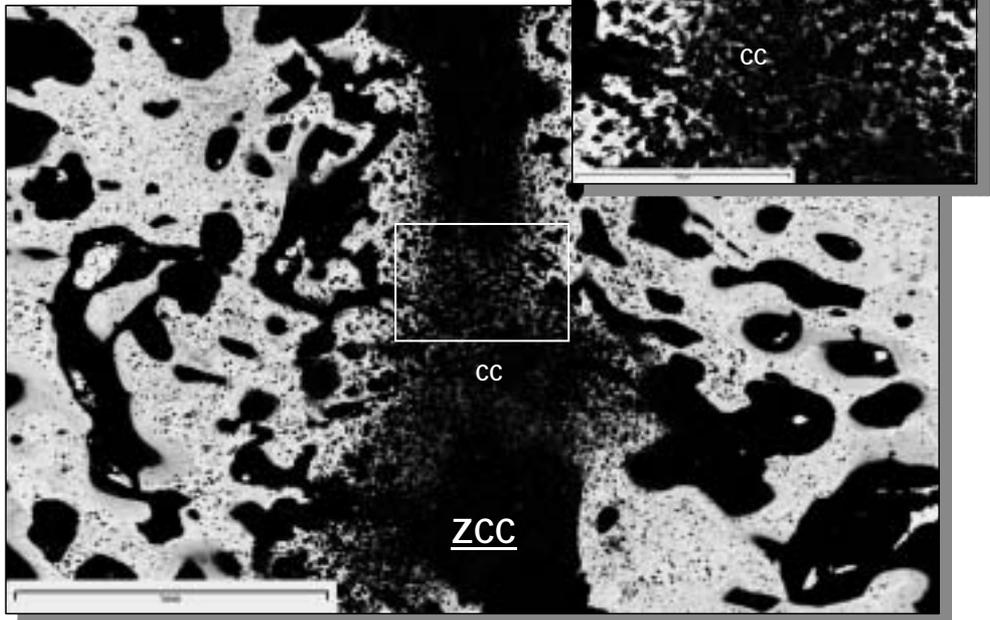


Figura V.54: Imagen panorámica (x10) de una muestra de 12 semanas (animal N° 4-EPD). Presencia de puentes de unión entre los callos proximal (izda) y distal (dcha) de distracción (flechas).

Figura V.55: Imagen aumentada (x40) del cuadro B de la imagen anterior. Puente de unión inmaduro donde, a mayor aumento (x200) (cuadro), se observa tejido cartilaginoso calcificado (CC).



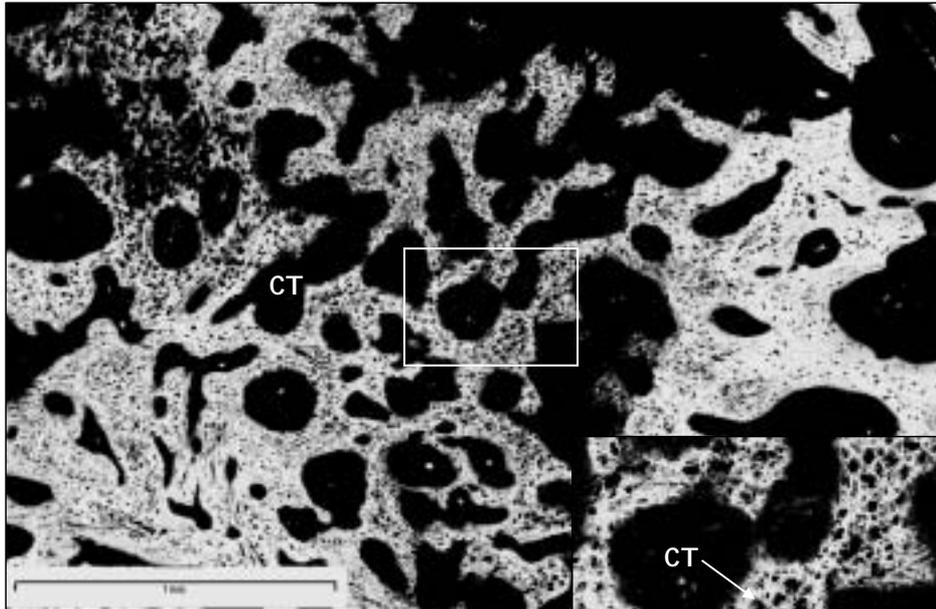


Figura V.56: Imagen aumentada (x40) del cuadro A de la figura V.53. Unión completa entre ambos callos mediante tejido condroide (CT) (cuadro) (x200).

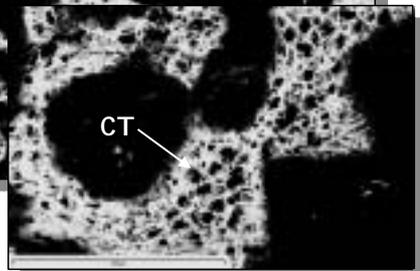
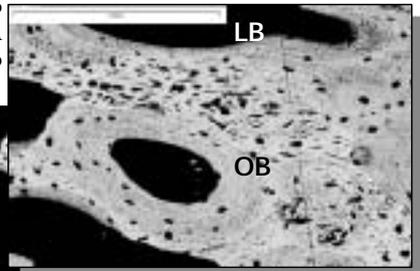
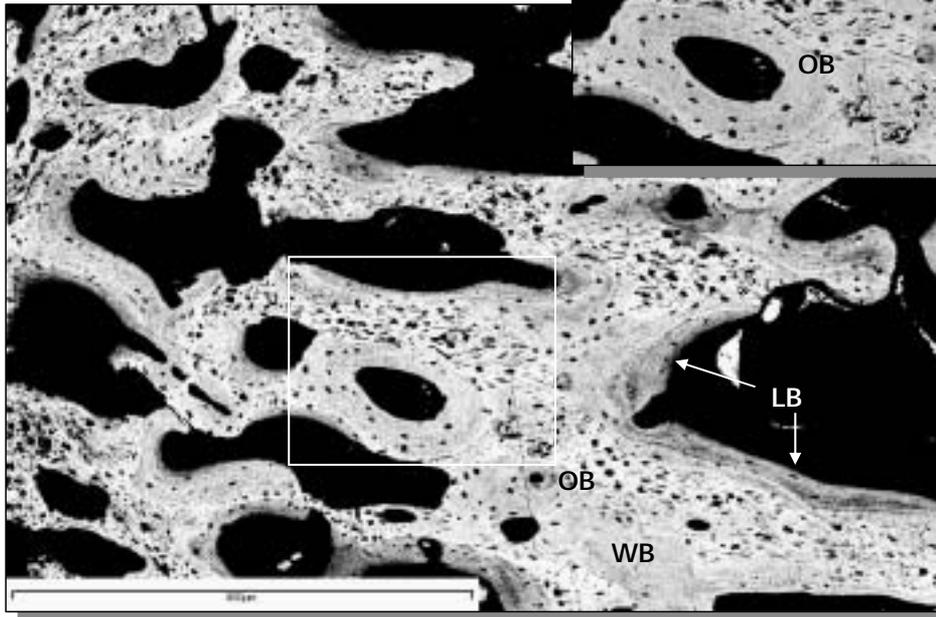


Figura V.57: Zona de Remodelación del callo correspondiente al cuadro C de la figura V.53 (x80). A mayor aumento (x200) se observa la presencia de hueso fibrorreticular (WB), hueso lamelar (LB) y osteonal (OB).



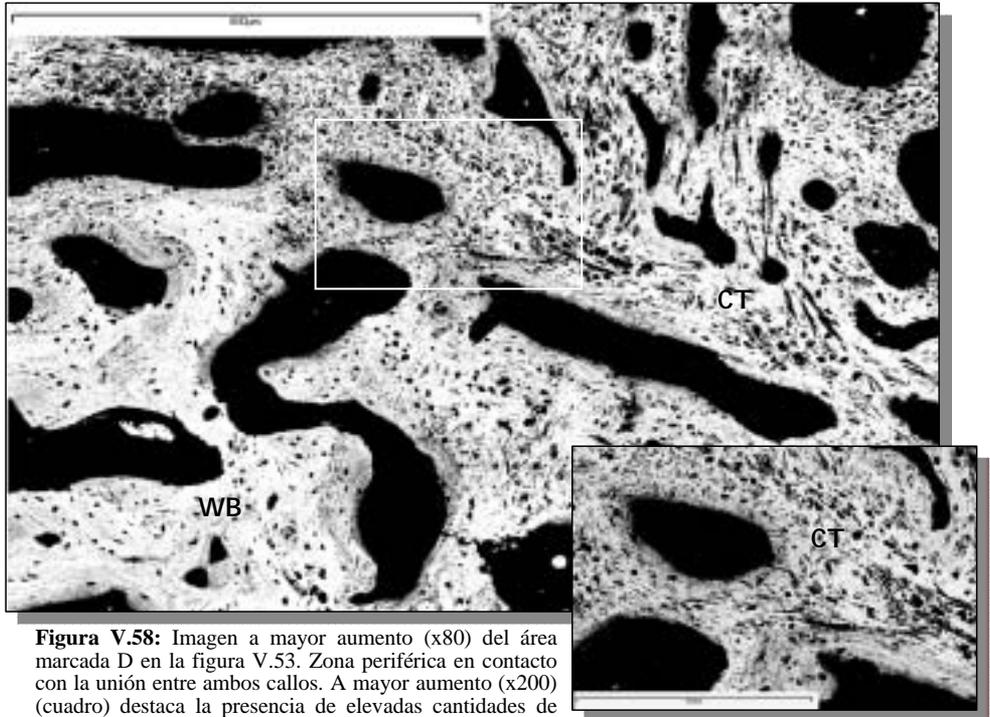
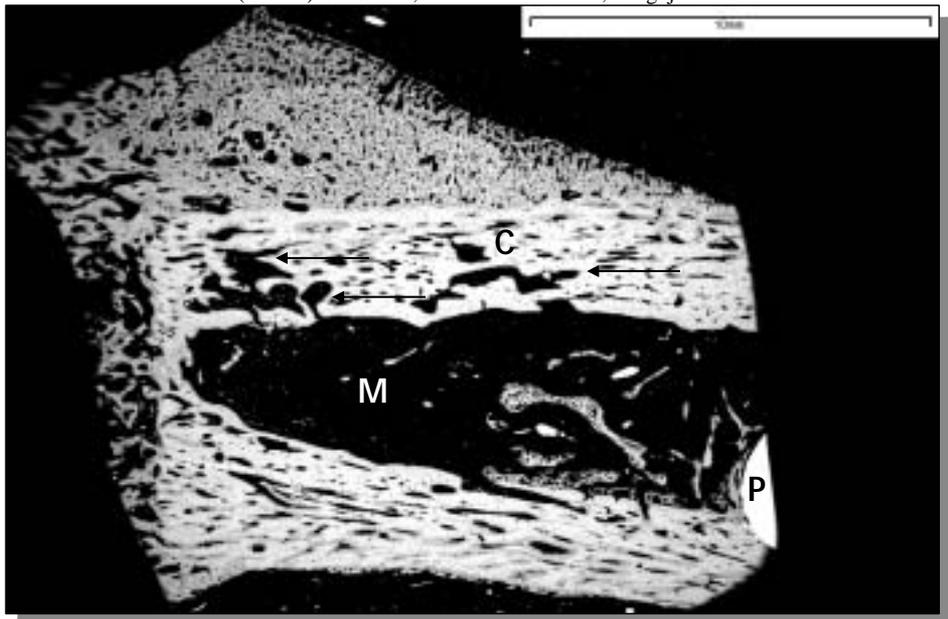


Figura V.58: Imagen a mayor aumento (x80) del área marcada D en la figura V.53. Zona periférica en contacto con la unión entre ambos callos. A mayor aumento (x200) (cuadro) destaca la presencia de elevadas cantidades de tejido condroide (CT).

Figura V.59: (x5) Fragmento óseo original a las 12 semanas (animal N° 4-EPD). Se observa una disminución de la reactividad ósea a nivel de la cavidad medular y alrededor de los implantes. Destaca la remodelación del hueso cortical con formación de grandes cavidades principalmente cerca de la osteotomía (flechas). C: cortical, M: cavidad medular, P: aguja transfixiante.



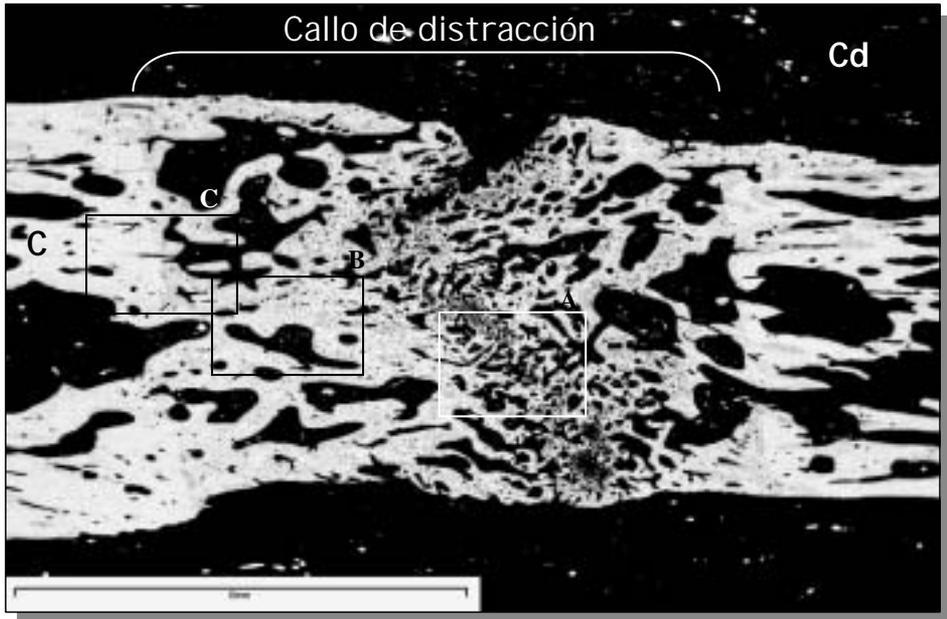


Figura V.60: Fotografía panorámica (x10) de la muestra de 14 semanas de evolución (animal N° 2-EPD). Unión de los callos de distracción proximal y distal excepto en zona caudal (Cd). C: cortical.

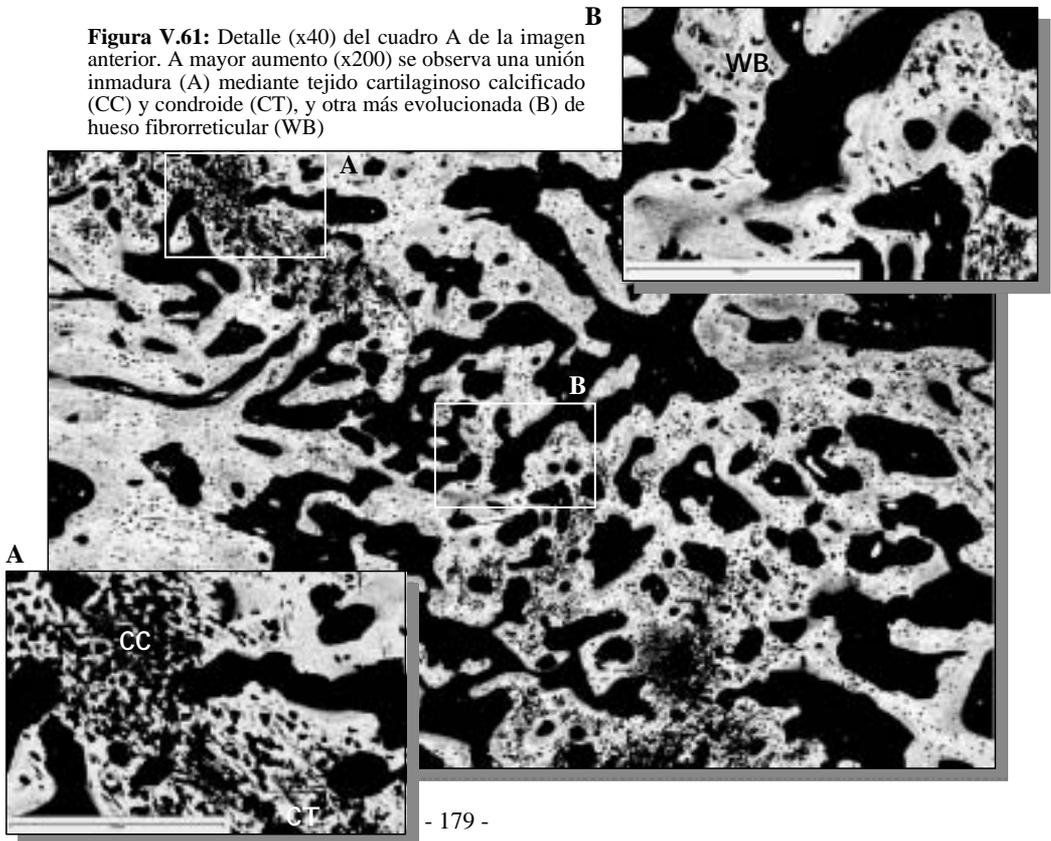


Figura V.61: Detalle (x40) del cuadro A de la imagen anterior. A mayor aumento (x200) se observa una unión inmadura (A) mediante tejido cartilaginosa calcificado (CC) y condroide (CT), y otra más evolucionada (B) de hueso fibrorreticular (WB)

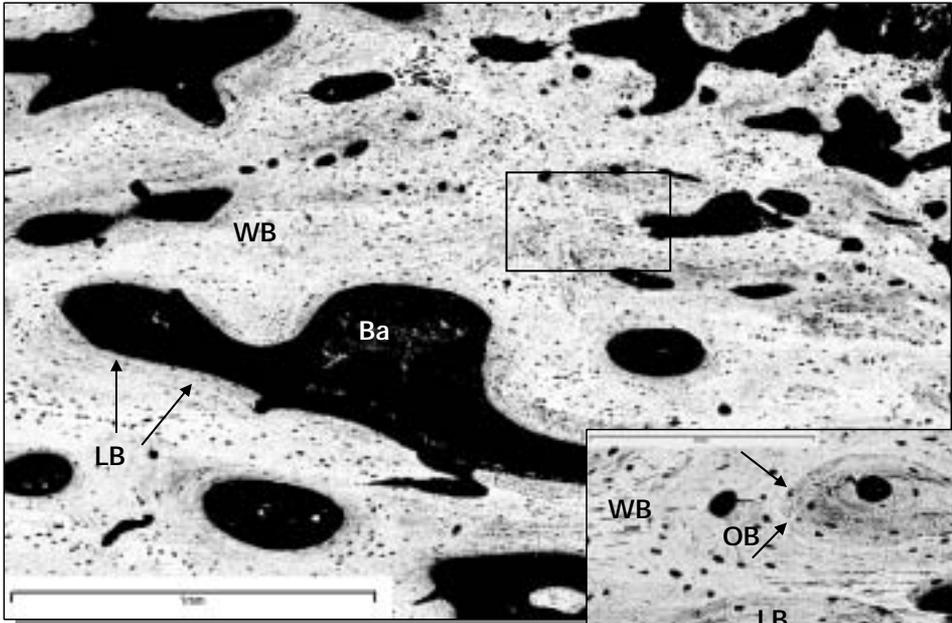


Figura V.62: Vista (x40) del cuadro B de la figura V. 59. Zona periférica del callo de distracción. A 200 aumentos se observa hueso fibrorreticular (WB), lamelar (LB) y osteonal (OB).

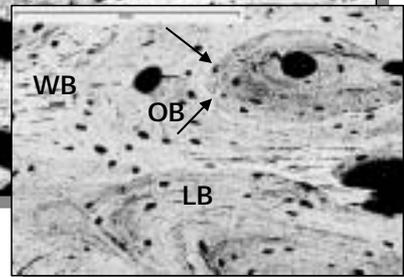
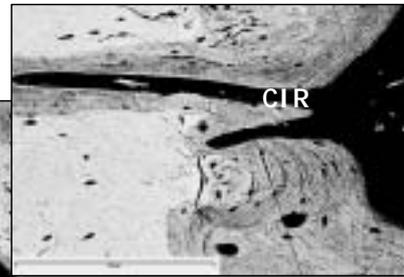
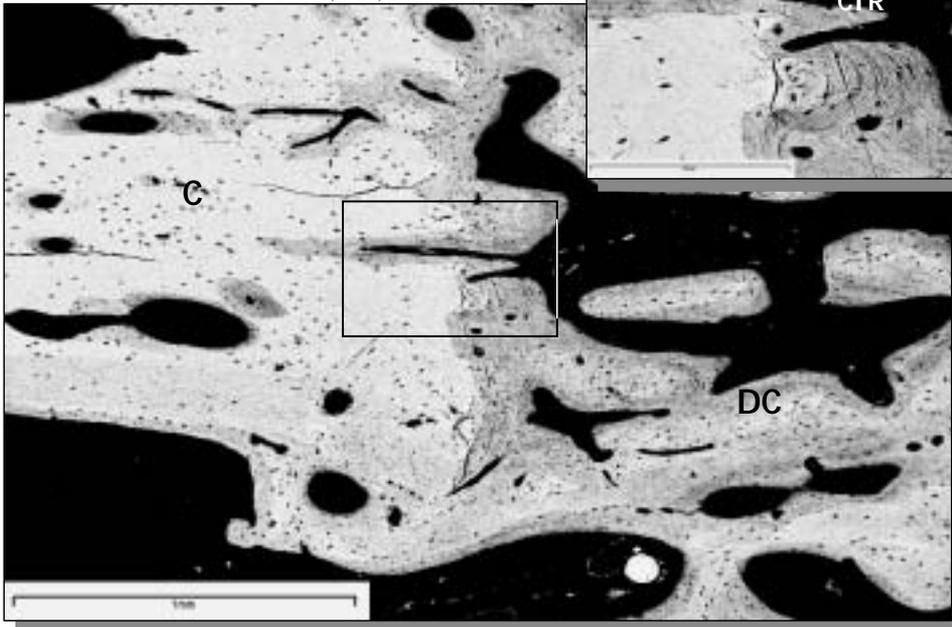


Figura V.63: Cuadro C de la figura V.59 (x40). Unión entre el hueso cortical (C) y el callo de distracción (DC) con un Cono Interfragmentario de Remodelación (CIR) atravesando dicha unión. Detalle (x200) en cuadro.



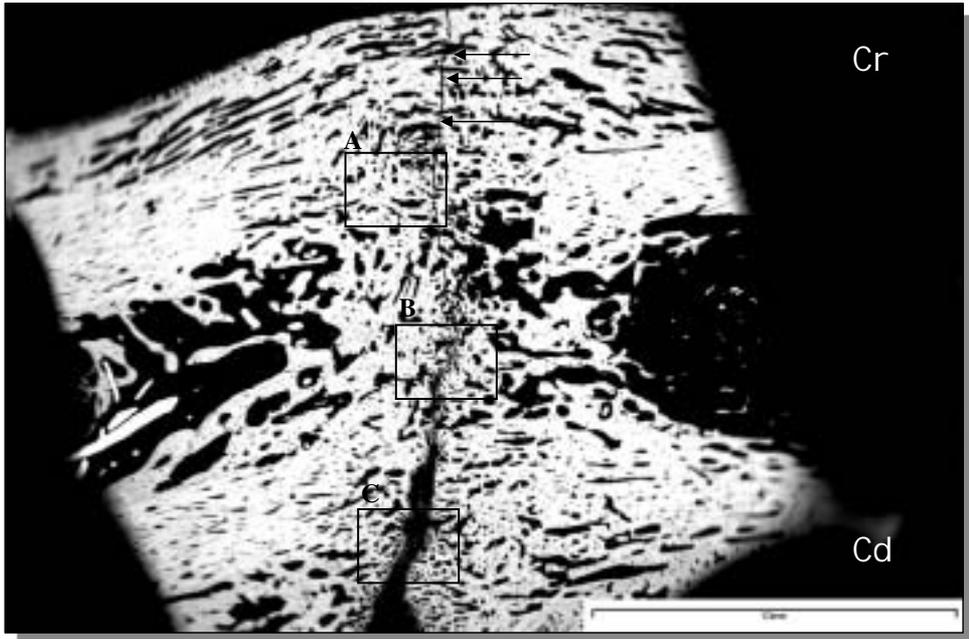
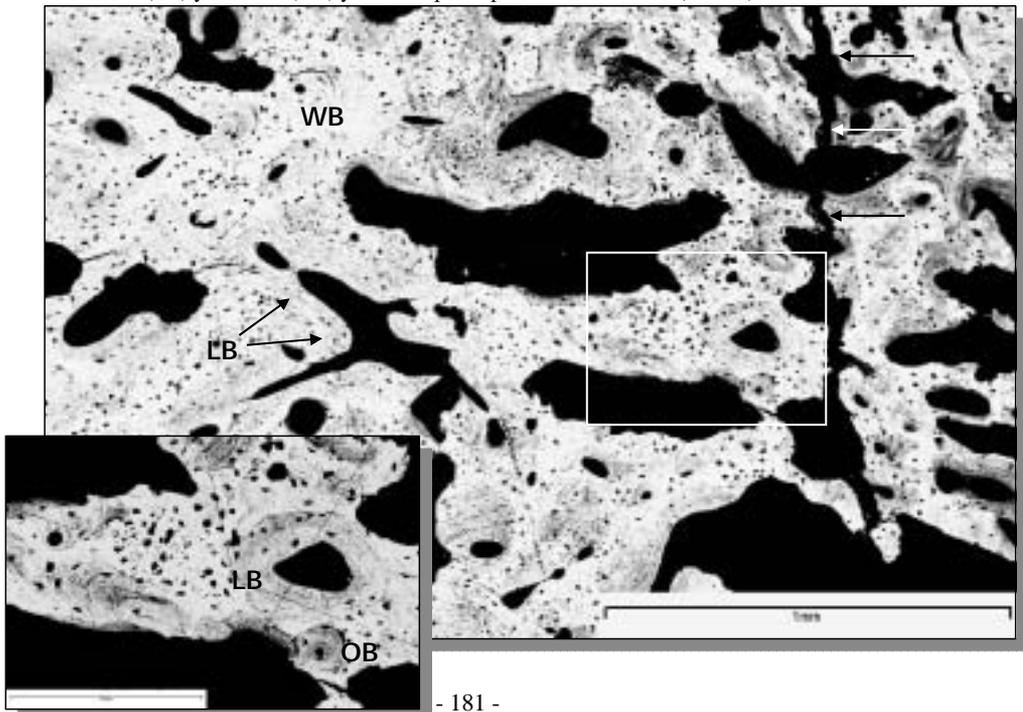


Figura V.64: Imagen panorámica (x5) de la muestra de 18 semanas de evolución (animal N° 1-EPD). Unión completa de los callos de distracción proximal y distal en la cara craneal (Cr) pero no en la caudal (Cd). Presencia de una fisura del material de inclusión de la muestra (flechas).

Figura V.65: Vista a mayor aumento (x40) de la zona A de la imagen anterior. Zona central unida de localización más craneal. A 200 aumentos se observa la presencia de hueso fibrorreticular (WB), lamelar (LB) y osteonal (OB) y la fisura por el proceso de inclusión (flechas).



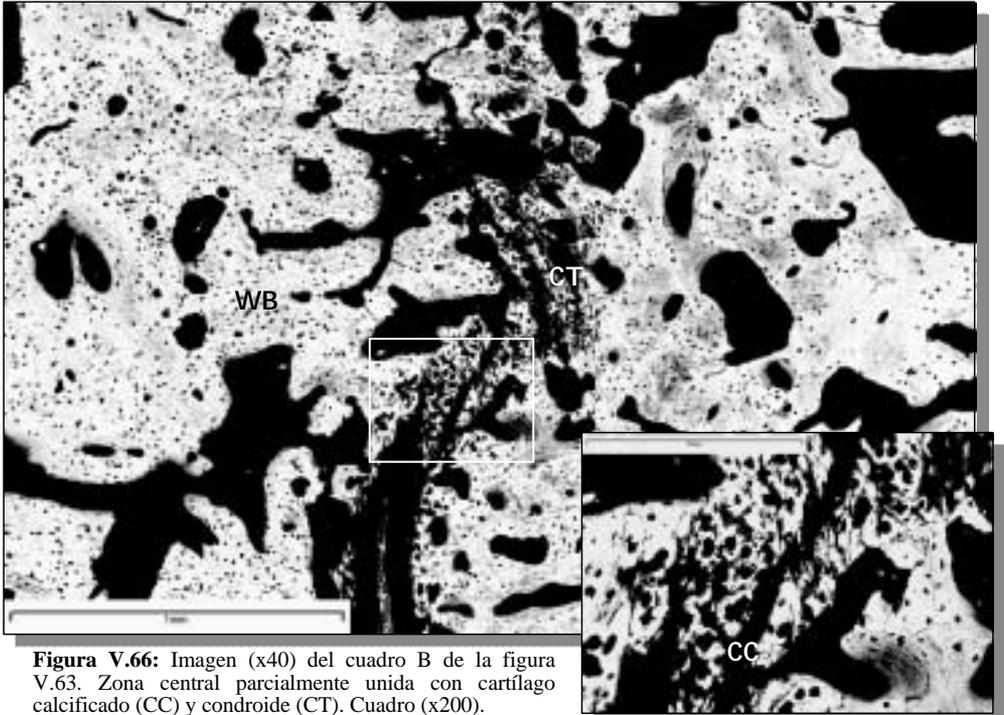
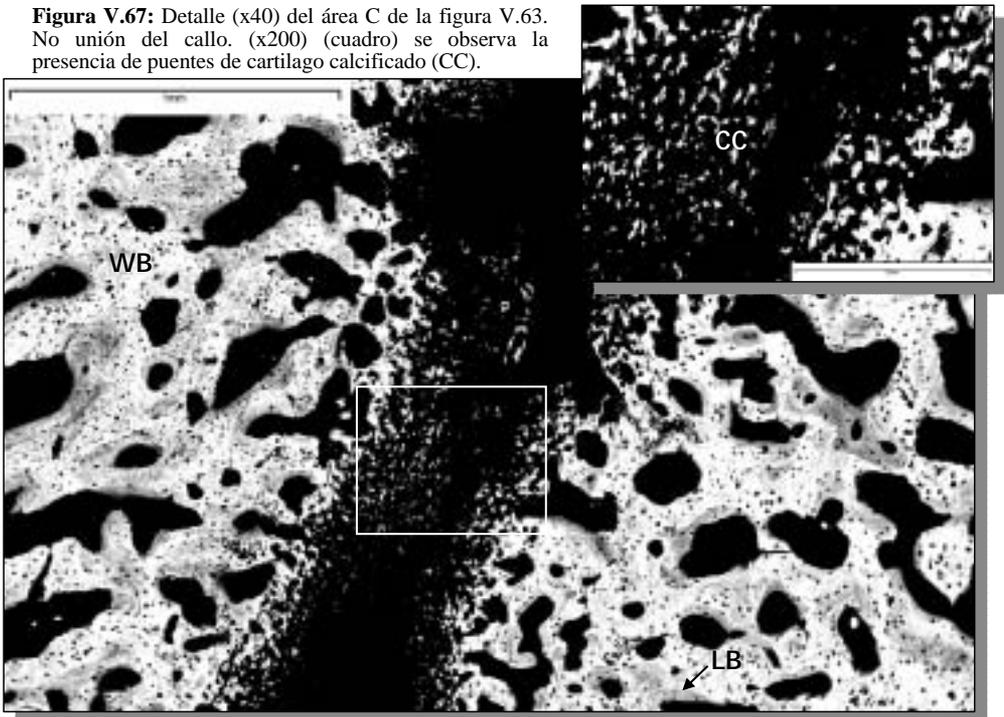


Figura V.66: Imagen (x40) del cuadro B de la figura V.63. Zona central parcialmente unida con cartilago calcificado (CC) y condroide (CT). Cuadro (x200).

Figura V.67: Detalle (x40) del área C de la figura V.63. No unión del callo, (x200) (cuadro) se observa la presencia de puentes de cartilago calcificado (CC).



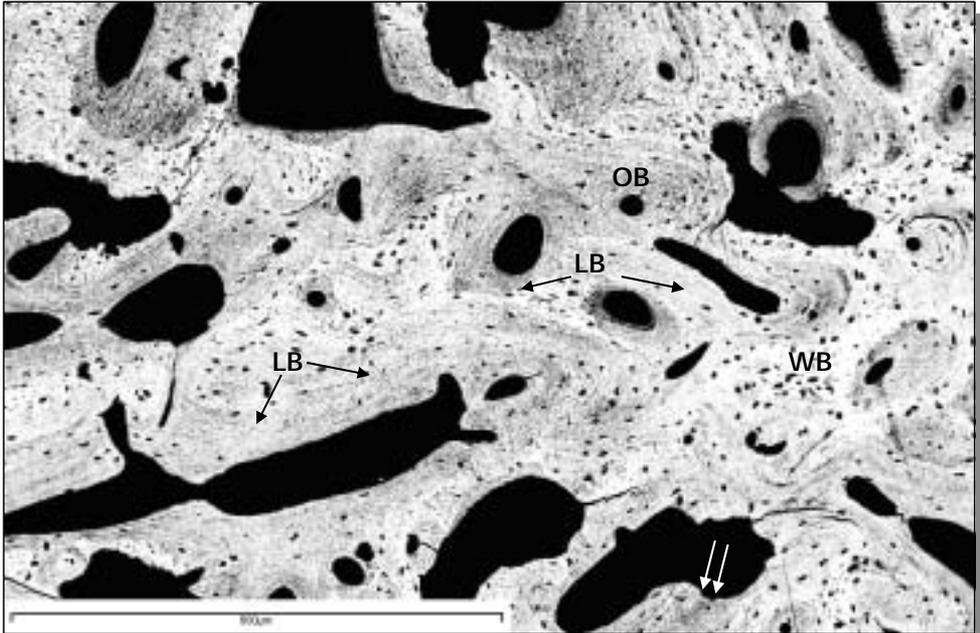
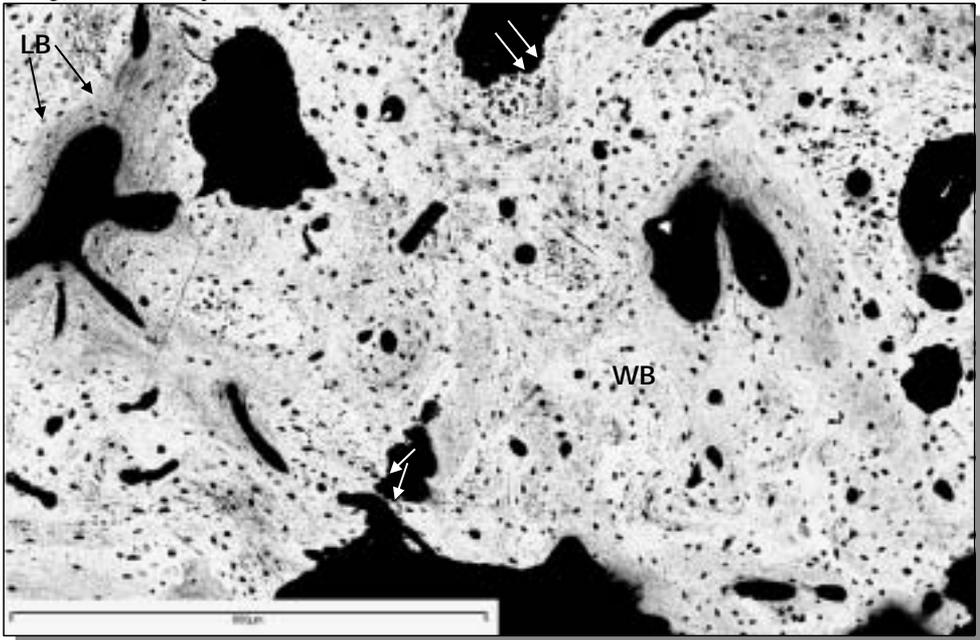


Figura V.68: (animal N° 1-EPD) (x80). Zona periférica del callo de distracción a nivel de la cortical original. Se observa una elevada proporción de hueso lamelar (LB) con respecto al hueso fibrorreticular (WB). Indicios de hueso osteonal (OB) y de remodelación ósea, lagunas de Howship (flechas blancas).

Figura V.69: (animal N° 1-EPD, 18 semanas) (x 80). Zona periférica del callo de distracción a nivel de la cavidad medular. La proporción de hueso fibrorreticular es mayor que de lamelar. Se observan lagunas de Howship (flechas blancas) indicativas de remodelación ósea.



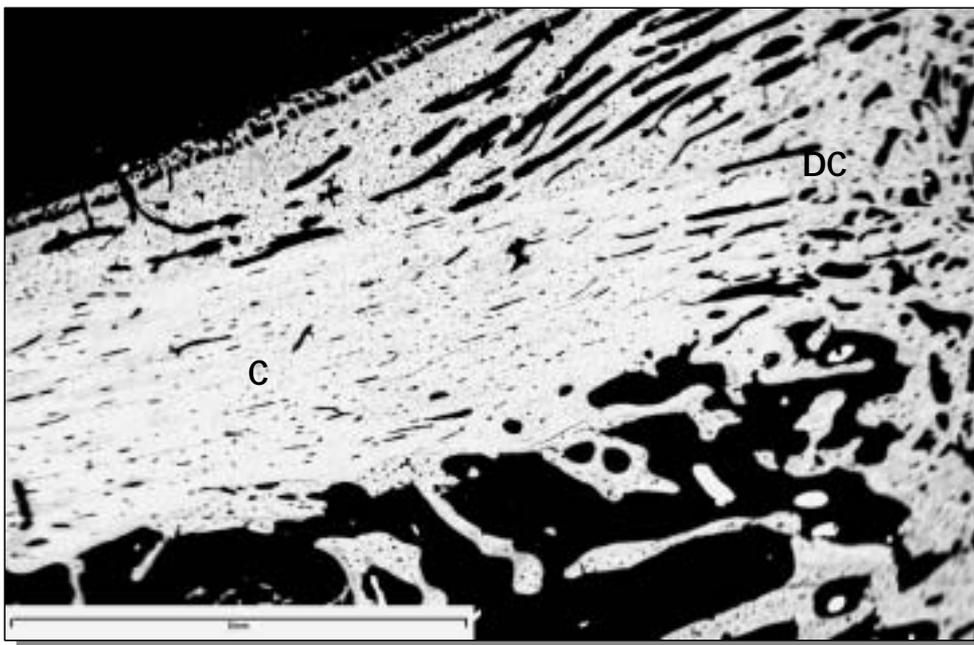
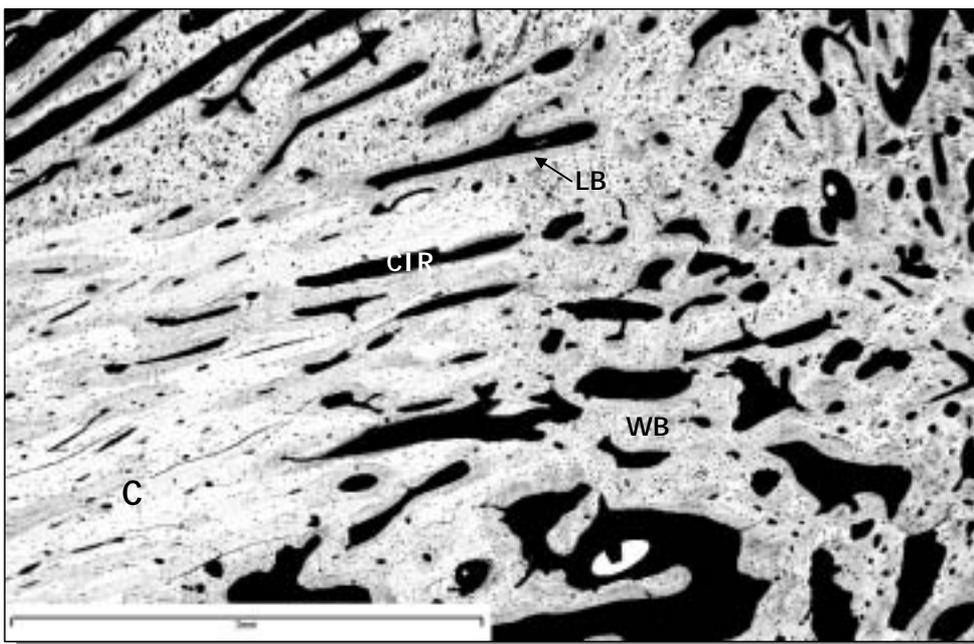


Figura V.70: Interfase entre hueso cortical (C) y callo de distracción (DC) de la misma muestra (x10). Se observan los primeros signos de corticalización, resultando difícil diferenciar la cortical original de la región correspondiente del callo de distracción.

Figura V.71: Imagen anterior a mayor aumento (x20). Destaca la organización lamelar tan compacta del callo de distracción en contacto con la cortical original (C) y la presencia de Conos Interfragmentarios de Remodelación (CIR).



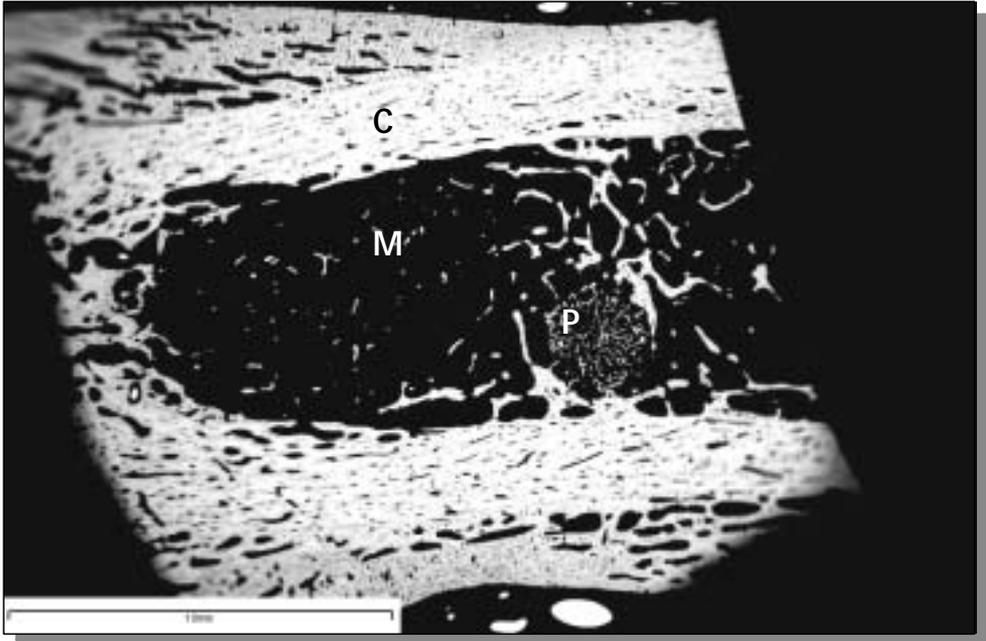
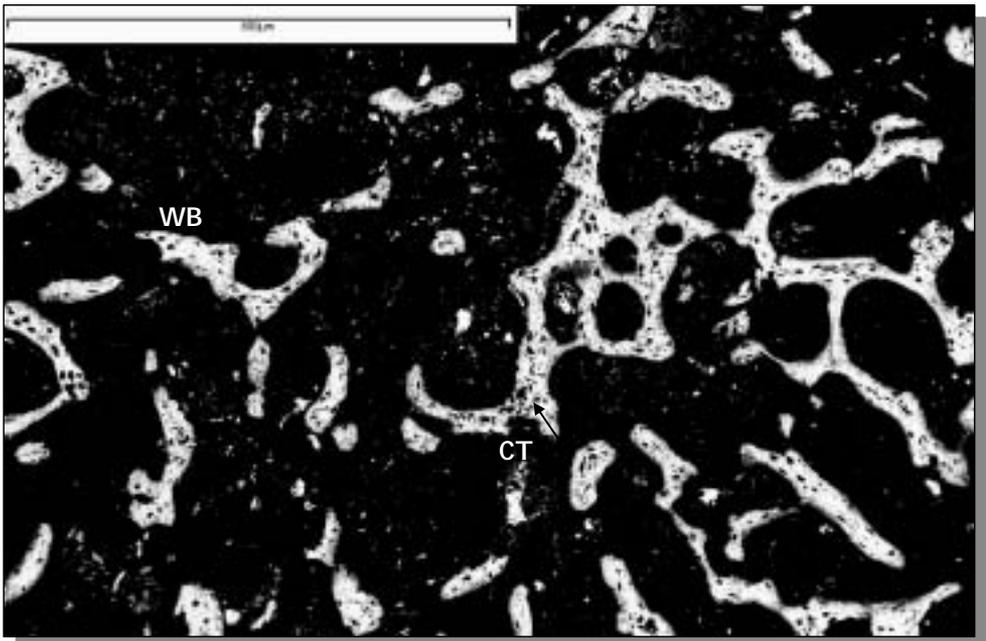


Figura V.72: Muestra de 18 semanas (animal N° 1-EPD) (x5). Segmento óseo original en el que destaca la disminución en la reactividad ósea a nivel de la cavidad medular (M) y la formación de una estructura reticular en el espacio dejado por la aguja transfixiante (P).

Figura V.73: Detalle (x80) del espacio ocupado con anterioridad por la aguja transfixiante. Se observa una formación ósea reticular constituida por hueso fibrorreticular (WB) y tejido condroide (CT).



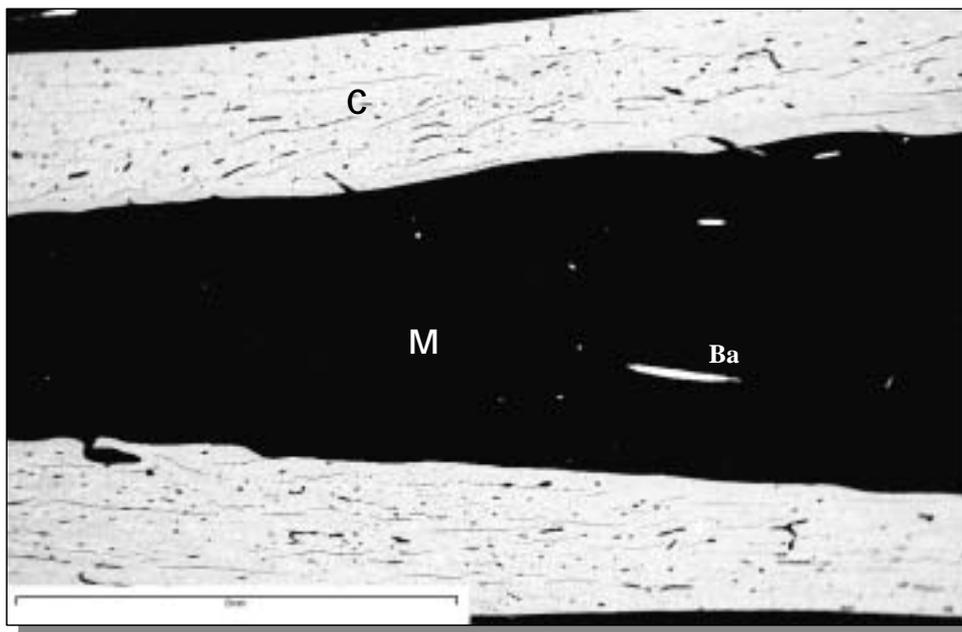
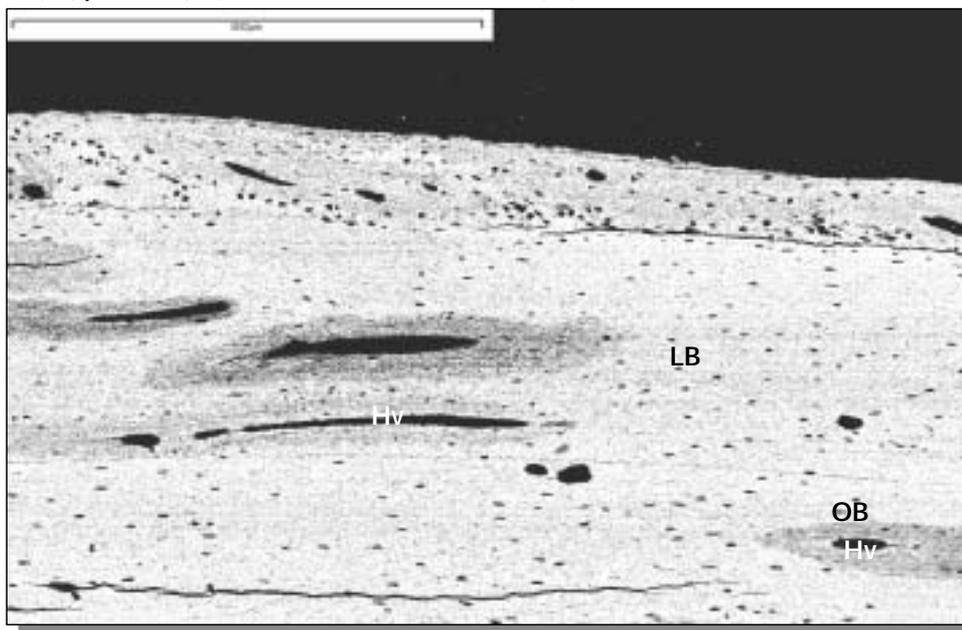


Figura V.74: Imagen panorámica (x10) de la muestra control (animal N° 12-EPI). Segmento óseo original en el que se observa el hueso cortical (C) y la cavidad medular sin tejido óseo en su interior (M), pero con contraste baritado (Ba).

Figura V.75: Detalle (x80) del hueso cortical en el que se observa la presencia de hueso lamelar (LB) y osteonal (OB), así como de conductos de Havers (Hv).



V.4.- ANEXO (TABLAS)

Tabla V.1.- Valores medios y desviación estándar de la Puntuación Total obtenidos a lo largo del estudio

	Día1	Día2	Día3	Día4	Día5	Día6	Día7
Media± d.estandar	1.72±1.30	1.20±1.02	0.93±0.71	0.87±0.72	0.67±0.66	0.62±0.53	0.54±0.58
	Semana2	Semana3	Semana4	Semana5	Semana6	Semana7	Semana8
Media± d.estandar	0.48±0.58	0.36±0.52	0.19±0.44	0.14±0.34	0.12±0.32	0.21±0.44	0.16±0.42
	Semana9	Semana10	Semana11	Semana12	Semana13	Semana14	Semana15
Media± d.estandar	0.14±0.35	0±0	0±0	0.27±0.45	0.27±0.44	0±0	0±0
	Semana16	Semana17	Semana18				
Media± d.estandar	0±0	0±0	0±0				

Tabla V.2.- Valores medios y desviación estándar del Grado de Cojera obtenidos a lo largo del estudio.

	Día1	Día2	Día3	Día4	Día5	Día6	Día7
Media± d.estandar	3.88±1.27	2.83±1.52	2.33±1.65	2.02±1.61	1.89±1.58	2.09±1.60	2.09±1.59
	Semana2	Semana3	Semana4	Semana5	Semana6	Semana7	Semana8
Media± d.estandar	1.64±1.52	1.46±1.83	1.26±1.61	0.77±1.49	0.61±1.34	0.80±1.34	0.88±1.22
	Semana9	Semana10	Semana11	Semana12	Semana13	Semana14	Semana15
Media± d.estandar	0.53±0.89	0.99±1.60	0.32±0.76	0±0	0±0	0±0	0±0
	Semana16	Semana17	Semana18				
Media± d.estandar	0±0	0±0	0±0				

Tabla V.3.- Relación de las osteotomías desviadas, plano y grado de dicha desviación.

Animal	Extremidad	t.e.c.	Plano	Sentido	Grado
Nº 1	EPD	18 semanas	M-L	Medial	Marcada (18°)
Nº 3	EPD	12 semanas	M-L	Medial	Marcada (19°)
Nº 4	EPD	12 semanas	M-L	Medial	Marcada (20°)
Nº 4	EPI	4 semanas	M-L	Medial	Ligera (8°)
Nº 5	EPD	10 semanas	M-L	Medial	Marcada (18°)
Nº 5	EPI	2 semanas	M-L	Medial	Marcada (19°)
Nº 6	EPI	1 semana	Cr-Cd	Craneal	Marcada (24°)
Nº 11	EPD	6 semanas	M-L	Medial	Ligera (8°)

Tabla V.4.- Relación de las elongaciones teórica y real, así como la (*= colapso en el callo de distracción de 1mm en el momento de sustituir el elongador por un fijador externo convencional).

Animal	Extremidad	t.e.c	Elong.teórica	Elong.real	%elong.teórica
Nº 1	EPD	18 sem	10mm	7mm	70%
Nº 1	EPI	10 sem	10mm	6mm	60%
Nº 2	EPD	14 sem	10mm	*9mm	90%
Nº 2	EPI	4 sem	10mm	10mm	100%
Nº 3	EPD	12 sem	10mm	*7.5mm	75%
Nº 3	EPI	4 sem	10mm	10mm	100%
Nº 4	EPD	12 sem	10mm	*8mm	80%
Nº 4	EPI	4 sem	10mm	7mm	70%
Nº 5	EPD	10 sem	10mm	7mm	70%
Nº 5	EPI	2 sem	10mm	4mm	40%
Nº 6	EPD	10 sem	10mm	9mm	90%
Nº 6	EPI	1 sem	2mm	1mm	50%
Nº 7	EPD	8 sem	10mm	7mm	70%
Nº 7	EPI	3 sem	10mm	8mm	80%
Nº 8	EPD	8 sem	10mm	10mm	100%
Nº 8	EPI	3 sem	10mm	10mm	100%
Nº 9	EPD	6 sem	10mm	6mm	60%
Nº 9	EPI	1 sem	2mm	2mm	100%
Nº 10	EPD	6 sem	10mm	10mm	100%
Nº 10	EPI	1 sem	2mm	2mm	100%
Nº 11	EPD	6 sem	10mm	7mm	70%
Nº 11	EPI	2 sem	10mm	8mm	80%
Nº 12	EPD	2 sem	10mm	9mm	90%

Tabla V.6.- Media y desviación estándar de la valoración del grado de reacción perióstica de cada aguja y de la osteotomía obtenidas en cada control radiográfico.

Control	Aguja I	Aguja II	Aguja III	Aguja IV	Osteotomía	Tamaño muestra
1 semana	0.1±0.17	0.1±0.17	0±0	0.43±0.51	0.17±0.29	n=3
2 semanas	0.01±0.06	0.14±0.21	0.03±0.09	0±0	0.13±0.28	n=20
3 semanas	0±0	0.15±0.21	0±0	0±0	0±0	n=2
4 semanas	0.12±0.22	0.47±0.40	0.22±0.29	0.27±0.31	0.4±0.44	n=15
6 semanas	0.17±0.26	0.87±0.39	0.47±0.44	0.26±0.36	1.05±0.72	n=12
8 semanas	0.22±0.28	0.89±0.36	0.63±0.60	0.22±0.44	1.19±0.77	n=9
10 semanas	0.28±0.29	0.76±0.25	0.63±0.53	0.24±0.42	1.36±0.99	n=7
12 semanas	0.25±0.29	0.57±0.30	0.32±0.47	0.25±0.29	1.5±1.08	n=4
14 semanas	0.4±0.14	0.75±0.35	0.5±0.7	0.25±0.35	1.25±1.77	n=2
16 semanas	0.5	0.7	1	0.4	2	n=1
18 semanas					2	n=1

VI.- DISCUSION

VI.-DISCUSION

En este capítulo se procederá a la discusión del procedimiento aplicado y de los resultados obtenidos en cada uno de los diferentes estudios realizados sobre la elongación ósea en perros.

VI.1.- DISCUSION DEL PROCEDIMIENTO REALIZADO

A pesar de que habitualmente el capítulo de “Discusión” suele referirse a los resultados obtenidos en el trabajo, dada la controversia existente con respecto a diferentes aspectos de la técnica quirúrgica, hemos considerado interesante establecer una cierta discusión sobre el procedimiento de elongación utilizado, contrastando nuestros resultados metodológicos con los citados en la literatura científica a éste respecto.

Existen numerosos estudios sobre la elongación ósea y los factores que en ella influyen en el campo de la medicina humana pero, aunque aquellos que no tienen un carácter meramente clínico se han llevado a cabo en animales de experimentación, el número de ellos cuyas conclusiones son potencialmente aplicables a la clínica veterinaria es reducido. A pesar de que algunos de ellos se han llevado a cabo en perros (Kawamura, 1968; Aronson *et al.*, 1988; Ilizarov, 1989ayb; Delloye *et al.*, 1990; Orbay *et al.*, 1992; Frierson *et al.*, 1994), la mayoría de los restantes se llevaba a cabo en especies cuya aplicabilidad a la clínica veterinaria es cuestionable, tales como monos (Cheung y Zhang, 2003), cerdos (Kolbeck *et al.*, 1999; Kessler *et al.*, 2002), conejos (Kojimoto *et al.*, 1988; White y Kenwright, 1991; Meffert *et al.*, 2000; Muhonen *et al.*, 2002), ratas (Yasui *et al.*, 1997; Pacicca *et al.*, 2002; Aronson *et al.*, 2001), ovejas (Carroll *et al.*, 1981; Monticelli y Spinelli, 1981; Steen y Fjeld, 1989) o cabras (Welch *et al.*, 1998; Lindsey *et al.*, 2002). Estas especies presentan no sólo características fisiológicas y anatómicas diferentes, sino que su carácter y manejo difiere totalmente del de los animales que con frecuencia llegan a nuestra consulta de traumatología. Ello conlleva que los resultados obtenidos en dichos estudios deban ser interpretados y aplicados con precaución en la práctica clínica de pequeños animales. Asimismo, la

totalidad de las técnicas e implantes utilizados en medicina humana no pueden ser empleados en medicina veterinaria. Como se plasmó en la introducción de esta tesis, ello se debe principalmente a la situación de la traumatología veterinaria en comparación con la traumatología humana y a las características de los pacientes a los que se aplica esta técnica en nuestra profesión. Esta tesis tiene como medio de trabajo y objetivo final la especie canina, de forma que los resultados son directamente aplicables a medicina veterinaria sin necesidad de adaptar la técnica o el sistema de elongación utilizado. Asimismo, dadas las similitudes óseas entre el perro y el hombre, muchos de los resultados obtenidos pueden también ser fácilmente extrapolables a medicina humana (Rhineland y Wilson, 1982).

Por otra parte, dado el número tan elevado de protocolos quirúrgicos y de distracción reflejados en la bibliografía (De Bastiani *et al.*, 1987; Kojimoto *et al.*, 1988; Ilizarov, 1989a; Cañadell, 1994; Aronson *et al.*, 2001), optamos por una técnica quirúrgica que fuera sencilla, económica y de fácil aplicación a nivel clínico veterinario, y que sin embargo no interfiriera de forma negativa en el proceso de elongación posterior. Los parámetros propios de la fase de distracción fueron adaptados a las posibilidades de manejo postoperatorio tanto de personal veterinario como de propietarios, sin que produjeran alteraciones significativas en el callo regenerado o en los tejidos blandos adyacentes.

Con respecto a la intervención quirúrgica, no existe un acuerdo claro sobre qué técnica de corte del hueso a elongar es la más adecuada, corticotomía u osteotomía. Algunos autores son partidarios de la realización de una corticotomía en lugar de una osteotomía ya que, al preservar la vascularización intramedular se obtiene un callo de distracción de mayor calidad (DeBastiani *et al.*, 1987; Ilizarov, 1989b; Aronson y Shen, 1994). No obstante, tras la realización de estudios angiográficos, Arrien y Cañadell (1987) sostienen que la microvascularización intramedular casi siempre se ve dañada, si no por la corticotomía, sí por la maniobra de osteoclasia realizada (White y Kenwright, 1991). Asimismo, Franch *et al.* (1998b) observaron mediante microangiografía, que aunque se realice una osteotomía la vascularización interfragmentaria se restituye alrededor de una semana después de la cirugía.

Frierson *et al.* (1994) sostienen que no existen diferencias en la capacidad osteogénica del callo tras la realización de una corticotomía o la de una osteotomía completa. Pero afirman que la osteotomía debe llevarse a cabo mediante la perforación múltiple de la cortical y fractura ósea con osteotomo, y no mediante una sierra oscilante ya que en este caso se causa un mayor riesgo de consolidación retardada, una línea radiolúcida central más ancha y menor grado de regeneración vascular en el callo de elongación (Frierson *et al.*, 1994). No obstante, otros autores demuestran que no existen diferencias entre la realización de una corticotomía y una osteotomía mediante sierra oscilante (Kojimoto *et al.*, 1988; Delloye *et al.*, 1990; Zembo *et al.*, 1989 en Elkins *et al.*, 1993; Yanoff *et al.*, 1992), o mediante la sierra de Gigli (Paley y Tetsworth, 1991). Puesto que la corticotomía supone una mayor dificultad técnica y no ofrece un beneficio claro en la formación del callo de distracción, en este estudio optamos por la realización de una osteotomía con sierra oscilante, tal y como realizan otros autores (Steen y Fjeld, 1989; Shirai *et al.*, 1997; Marcellin-Little *et al.*, 1998; Lindsey *et al.*, 2002).

La realización de la osteotomía a nivel de la diáfisis tibial en nuestro estudio dio lugar a un callo de distracción sólido y abundante. Sin embargo, en las referencias bibliográficas consultadas existen discrepancias acerca de la localización más adecuada de dicha osteotomía. Algunos autores defienden la realización de una distracción metafisaria ya que, debido a su alto contenido en hueso esponjoso y a la presencia de una densa red vascular, esta región ósea presenta un mayor potencial osteogénico en comparación con la diáfisis (Ilizarov, 1990; Fischgrund *et al.*, 1994; Aronson y Shen, 1994). Sin embargo, Steen y Fjeld (1989) sostienen que, a pesar de estas características y contrariamente a lo que afirman Aronson y Shen (1994), el callo de distracción metafisario no muestra una resistencia superior al diafisario. Asimismo, debido a que la desviación axial, inestabilidad y dificultad técnica es mayor cuando se realizan osteotomías a nivel metafisario, dichos autores mantienen que la aplicación clínica de la distracción metafisaria puede no ser correcta (Steen y Fjeld, 1989).

Con referencia al período de latencia, es decir, el tiempo transcurrido entre la intervención quirúrgica y el inicio de la distracción, nosotros utilizamos el de 5 días ya que este valor se encontraba en un término medio entre el período de 1 día descrito por Aronson *et al.* (2001) y los 10-15 días de DeBastiani *et al.* (1987) o Aldegheri *et al.* (1989) en diferentes especies. Según la bibliografía consultada, este tiempo no es ni

demasiado corto ni demasiado largo, de forma que el riesgo de consolidación retardada o prematura, respectivamente, es mínimo. Asimismo, además de permitir la formación del tan importante hematoma interfragmentario, este espacio de tiempo permite al animal recuperarse de la cirugía al mismo tiempo que disminuye la inflamación de los tejidos blandos circundantes (White y Kenwright, 1991).

No obstante, algunos autores afirman que el período de latencia no es necesario para realizar la elongación ósea. Ilizarov (1977, en White y Kenwright, 1991) postula que si la vascularización intramedular se encuentra intacta, no es preciso mantener temporalmente la osteotomía en fase neutra previamente a la distracción, aunque dicho autor aplicaba tiempos de entre 5 y 7 días de espera (Ilizarov, 1989a). Esta idea es corroborada por Aronson y Shen (1994), quienes mantienen que la aplicación de un período de espera no ha demostrado ejercer un efecto positivo sobre el potencial osteogénico de la osteotomía, sino que por el contrario, puede favorecer la consolidación prematura de la osteotomía si supera los 7 días. Sin embargo, White y Kenwright (1991) sostienen lo contrario, ya que si se inicia la distracción inmediatamente después de la realización de la osteotomía, el callo formado presentará un menor volumen, una deficiente vascularización y una mayor presencia de tejido fibroso.

En cuanto a la velocidad y ritmo de distracción, hemos comprobado que los valores escogidos han permitido la formación de un callo de distracción adecuado, sin alteraciones manifiestas de los tejidos blandos pero sin ofrecer dificultades para su aplicación en la clínica diaria. Ilizarov (1989b), sostiene que la velocidad y ritmo de distracción que permiten la óptima formación del callo de elongación es de 1mm diario en distracción continua. No obstante, debido a la dificultad técnica de realizar una distracción continua, recomienda la elongación de 1 mm diario en 4 distracciones de 0.25 mm cada una. Yanoff *et al.* (1992) consideran este ritmo inviable para los pacientes clínicos en veterinaria, por lo que recomiendan la realización de dos distracciones diarias de 0.5 mm cada una, ritmo aplicado por diferentes autores tanto en medicina humana como veterinaria (Orbay *et al.*, 1992; Elkins *et al.*, 1993; Aronson y Shen, 1994; Cañadell, 1994; Tsuchiya *et al.*, 1997; Shirai *et al.*, 1997; Hancock *et al.*, 2003). Siguiendo la recomendación realizada por Yanoff *et al.* (1992), en el presente

trabajo se optó por la realización de dos distracciones diarias, de 0.5 mm cada una, ritmo perfectamente aceptado por los pacientes.

La aplicación de un elongador unilateral en esta tesis ha demostrado que se trata de un implante de fácil aplicación y utilización, de reducido coste, cómodo para el paciente al mismo tiempo que permite la obtención de un adecuado callo de distracción. Sin embargo, de los tres grandes tipos de elongadores que se están utilizando en la actualidad, fijadores externos circulares, uniplanares y clavos intramedulares, existe controversia sobre qué modelo resulta el más adecuado. A pesar de que algunos autores afirman que los fijadores de tipo circular presentan una gran versatilidad en su uso, permiten un micromovimiento axial estimulante de la osteogénesis, apenas lesionan los tejidos blandos circundantes (Goodship y Kenwright, 1985; Flemming *et al.*, 1989; Ilizarov, 1989b) y permiten la corrección simultánea de deformaciones axiales (Ilizarov, 1990; Marcellin-Little *et al.*, 1998; Welch y Lewis, 1999), también presentan un volumen considerable, requieren de una elevada inversión económica y formación clínica (Yanoff *et al.*, 1992; Hancock *et al.*, 2003). Otros autores abogan por la aplicación de clavos intramedulares distractores, sosteniendo que permiten preservar el periostio y los tejidos blandos adyacentes y reducen las desviaciones axiales del hueso elongado (Baumgart *et al.*, 1997; Cole *et al.*, 2001; Guichet *et al.*, 2003). Sin embargo, también son conscientes de sus limitaciones, tales como la dificultad en el seguimiento de la elongación realizada, la necesidad de cirugía para retirar el implante y su menor estabilidad biomecánica. Por último, otros autores manifiestan que los fijadores externos uniplanares unilaterales presentan una excelente estabilidad, proporcionan un micromovimiento axial modulable estimulante de la osteogénesis y la corticalización ósea, son fáciles de usar, menos voluminosos y permiten una buena movilidad articular (DeBastiani *et al.*, 1987; Aldegheri *et al.*, 1989; Yanoff *et al.*, 1992).

VI.2.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS CLINICOS

La exploración clínica llevada a cabo en nuestro estudio tenía en cuenta parámetros que valoraban tanto el bienestar animal como la funcionalidad de la extremidad intervenida. Inicialmente esta exploración fue concebida únicamente para la evaluación del estado de los animales y la detección temprana de posibles problemas en la extremidad elongada, pero posteriormente se valoró la posibilidad de utilizar los datos obtenidos para establecer patrones de conducta y evolución de la recuperación funcional de la extremidad. De esta forma, y aunque no se llevó a cabo ningún estudio estadístico de los valores registrados por los cuidadores, los resultados obtenidos pueden resultar de interés durante la aplicación clínica de la elongación ósea.

Con respecto al bienestar animal, los resultados muestran unos valores de puntuación total extremadamente bajos ya que, como se puso de manifiesto en el apartado de “Material y Métodos”, el valor máximo posible era 31. Es necesario destacar que el 87% de los animales presentó una puntuación total inferior a 2 el primer día postquirúrgico, de los cuales el 60% fue inferior a 1. La reducción gradual en los valores obtenidos queda reflejado en el hecho de que el sexto día tras la cirugía, el 74% de los animales obtuvo una puntuación total de 0, la cual no se elevó durante la fase de distracción. Asimismo, durante todo el procedimiento experimental se observa una disminución progresiva de estos valores a lo largo del tiempo con la obtención de un valor medio de 0 a partir de la décima semana postquirúrgica, aunque hay que insistir que se trata de valores medios y no medidas individuales. Los valores obtenidos en las semanas 12^a y 13^a son ligeramente superiores a los anteriores pero continúan siendo muy reducidos. Puesto que dicha puntuación se corresponde teóricamente con el dolor potencial que están padeciendo los animales, es posible establecer que los animales únicamente muestran molestias inmediatamente después de la cirugía, y no durante el proceso de elongación. Estas observaciones coinciden con las de Elkins *et al.* (1993) tras realizar una elongación ósea en perros, pero no se corresponden con la experiencia registrada por Paley (1990) en pacientes humanos sometidos a elongación ósea, quien afirma que durante el proceso de distracción se produce un dolor crónico y grave.

Esta discrepancia en los resultados, puede ser debida en parte a la incapacidad que muestran los animales para comunicar sus sensaciones. A pesar de que la tabla de

seguimiento tiene en cuenta parámetros que, tanto de forma objetiva como subjetiva, reflejan el dolor en los animales (Morton y Griffiths, 1985; Hellyer y Gaynor, 1998; Firth y Haldane, 1999; Holton *et al.*, 2001), su sensibilidad para con estímulos dolorosos crónicos puede ser limitada. De esta forma, un dolor agudo e intenso puede quedar claramente reflejado en los exámenes diarios, mientras que un malestar leve y constante puede pasar inadvertido en los controles. Sin embargo, la experiencia del cuidador en el trato y manejo de animales intervenidos por causas traumatológicas (fracturas, artrodesis, triple osteotomía de cadera, etc.) en los que el dolor es fácilmente detectable, reafirma la sensación de falta de dolor en los animales de este estudio.

Por otra parte, la ausencia aparente de dolor en los perros puede también ser debida a la adecuada velocidad de distracción (0.5 mm/12 horas), así como a la reducida elongación realizada, ya que únicamente se obtenía una distracción de 10 mm, aunque esta distancia suele ser suficiente para compensar la mayoría de procesos óseos dismétricos que requieren elongación en la clínica veterinaria de pequeños animales. Como se ha comentado anteriormente, elevadas velocidades de distracción impiden una correcta adaptación de los tejidos blandos a la elongación, causando lesiones musculares, articulares, nerviosas y vasculares (DeBastiani *et al.*, 1987; Ilizarov, 1989a; Stanitski, 1994; Simpson *et al.*, 1995; Makarov *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001). De forma similar, elongaciones elevadas y prolongadas en el tiempo provocan también lesiones de los tejidos blandos y contracturas musculares (Lee *et al.*, 1993; Ippolito *et al.*, 1994; Mizumoto *et al.*, 1995; Makarov *et al.*, 2001) causando dolor en el paciente (Paley, 1990). De esta forma, las reducidas variables de distracción aplicadas en nuestro estudio no serían suficientes para causar graves trastornos en los tejidos blandos adyacentes al hueso, y por lo tanto no serían fuente de dolor en los animales.

No obstante, tal y como reflejamos en el apartado de “Resultados”, uno de los animales mostró dolor durante las fases iniciales del proceso de distracción (Nº 4-EPD). A pesar de que radiológicamente no pudimos observar una osteotomía incompleta de peroné, se optó por la reintervención quirúrgica exploratoria y la realización de una pequeña osteotomía en dicho hueso, tras lo cual se resolvió el problema. Paley (1990) sostiene que en estos casos, la continuación de la distracción produce la rotura de los puentes óseos interfragmentarios y la solución del problema. No obstante, el intenso dolor causado por dicha maniobra junto con el fuerte malestar manifestado por el

animal durante la distracción, nos inclinó a rechazar este tratamiento. Este dolor tan temprano manifestado por la perra durante la elongación, parece ser debido a la rotura progresiva del segmento de peroné no cortado, causada a su vez por la tensión ejercida por la separación de los fragmentos tibiales, mucho más fuerte que en el peroné.

Probablemente, uno de los resultados más destacables de la exploración clínica se refiere al registro del grado de cojera, o lo que es lo mismo, de la funcionalidad de la extremidad elongada. Tal y como puede observarse en la tabla que refleja los valores medios del grado de cojera registrado a lo largo del tiempo (Tabla V.2, página 187), la recuperación completa de la funcionalidad de la extremidad no se consigue hasta 12 semanas después de la cirugía. No obstante, hay que tener en cuenta que se trata de valores medios, de modo que algunos animales presentaban valores de cojera mayores a los registrados en la tabla, mientras que otros presentaban menores grados de cojera en un momento concreto de tiempo. Es de destacar el hecho de que se considera recuperación completa, la obtención de un valor igual a “0”, pero valores comprendidos entre “0” y “1” se corresponden con una cojera prácticamente indetectable. Recordemos que el valor “0” definía una extremidad clínicamente normal y el “1”, una ligera cojera sólo visible tras el ejercicio, tal y como queda reflejado en el apartado de “Material y Métodos”. De esta forma, los valores incluidos en este rango podrían considerarse casi normales, puesto que el animal puede llevar una vida normal, de forma que la recuperación funcional de la extremidad elongada quedaría modificada y se obtendría a las 5 semanas postquirúrgicas.

Como ya se ha comentado, estos resultados corresponden a valores medios y no a registros individuales. Estas lecturas muestran cómo algunos animales comenzaban a apoyar la extremidad operada de forma muy temprana, a las 2 ó 3 horas tras la cirugía, llegando a incorporarse sobre el tercio posterior, con apoyo de ambas extremidades, al segundo día de la cirugía y desplazándose al trote sin dificultad. Asimismo, la excelente recuperación de la funcionalidad motora queda patente en el hecho de que el 60% de los animales presentaron una cojera inferior a 2 el segundo día postquirúrgico y, aunque a partir de la retirada de los analgésicos y durante la elongación esta puntuación se veía aumentada muy ligeramente, al final de la fase de distracción el 74% de las perras no presentaron cojera alguna. Cabe destacar que se intentaba evitar que los animales realizaran ejercicio muy activo que pudiera causar alguna complicación, dado el corto

período de tiempo transcurrido desde la intervención quirúrgica. No obstante, el apoyo tan temprano de la extremidad elongada no sólo era un signo evidente de la ausencia de dolor y de la marcha correcta de la elongación, sino que presentaba efectos beneficiosos sobre el proceso de elongación ósea. Tal y como afirman Green (1991b) y Pacicca *et al.* (2002), el uso activo de la extremidad durante el proceso de elongación estimula la formación del callo de distracción, aunque sin afectar su fuerza, contenido mineral o presencia de tejido cartilaginoso en su interior.

Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas por otros autores en casos clínicos sometidos a elongación ósea en veterinaria. Hancock *et al.* (2003) observan una ausencia total de cojera al final de la distracción del III y IV metacarpiano en un perro a la tercera semana postquirúrgica. Otros autores recogen el buen uso y apoyo de la extremidad elongada durante todo el proceso de elongación ósea en perros (Yanoff *et al.*, 1992; Elkins *et al.*, 1993; Langley-Hobbs *et al.*, 1996; Marcellin-Little *et al.*, 1998; Preston, 2000). El apoyo tan temprano de la extremidad operada presentado por los animales de nuestro estudio coincide con las observaciones de Cruz *et al.*, (2001). Estos autores presentan un caso de elongación mandibular en un camello, el cual se mostraba confortable y comía con toda normalidad, haciendo uso del hueso intervenido 24 horas después de la cirugía, si bien se trata de un hueso que no precisa apoyo.

Es necesario resaltar que las extremidades de aquellos animales que mostraron una recuperación funcional más tardía se encontraban dentro de las primeras cirugías realizadas en este estudio, posiblemente debido a la mayor duración de la intervención quirúrgica y a la manipulación de los tejidos blandos, mientras que las mejores puntuaciones correspondían a las extremidades operadas con posterioridad. Este resultado puede relacionarse con la curva de aprendizaje del cirujano que llevó a cabo dichas intervenciones. Esta observación coincide con las de Paley (1990) y Dahl *et al.* (1994), quienes afirman que el índice de complicaciones disminuye conforme el cirujano va adquiriendo experiencia en el procedimiento de elongación ósea.

Algunos animales manifestaron diferentes grados de cojera en fases más tardías del procedimiento experimental. Dos de ellos precisaron de la administración prolongada de antibióticos, tras la cual remitió (Nº 1) o se redujo (Nº 6) la

sintomatología. Ambos animales presentaron una secreción seromucosa en la interfase piel-aguja, especialmente a nivel de las agujas proximales. Debido a esta observación, y ante la ausencia de alteraciones radiológicas, se sospechó de la presencia de infección en el trayecto de las agujas del fijador externo. Se trata de un problema bastante frecuente, tal y como afirman algunos autores con gran experiencia en elongación ósea (Paley 1990; Eldridge y Bell, 1991; Reichel *et al.* 1996).

No existen estudios en la bibliografía consultada que comparen la prevalencia de aparición de infección en el trayecto de las agujas durante la elongación ósea entre personas y animales. En nuestro estudio, el 8.6% de prevalencia de infección en el trayecto de las agujas coincide con el 8.3% de presentación señalada por Green (1983) para el uso de fijadores externos. No obstante, no coincide con el 2% observado por Eldridge y Bell (1991) ni con el 22% registrado por Karger *et al.* (1993), en casos clínicos de elongación ósea en medicina humana llevados a cabo mediante un elongador uniplanar. A pesar de la falta de acuerdo entre los autores respecto al porcentaje de presentación de este problema, la mayoría coincide al afirmar que se trata de uno de los problemas más frecuentes durante la elongación ósea (Green, 1983; Paley, 1990; Eldridge y Bell, 1991; Karger *et al.*, 1993). Parece lógico pensar que ésta podría ser mayor en veterinaria debido a la propia anatomía de los animales, las condiciones ambientales en las que se desenvuelven y la dificultad para limitar su ejercicio activo, sin embargo Paley (1990) y Eldridge y Bell (1991) afirman que este problema depende directamente de la estabilidad y movimiento de las agujas y del volumen muscular que atraviesan.

Los problemas presentados por estos dos animales a nivel del trayecto de las agujas, corresponderían a una alteración de grado 1 según Paley (1990). La presencia de descarga serosa en varias de las agujas y la ausencia de infección ósea comprobada radiográficamente, coincidía con la definición descrita por Paley para este tipo de problemas. Aunque este autor recomienda la administración de antibióticos sin precisar la duración, este tratamiento fue prolongado el tiempo suficiente hasta conseguir la mejoría de la sintomatología. No obstante, otros autores han establecido clasificaciones diferentes a la anterior con respecto a la infección del trayecto de las agujas. Dahl *et al.* (1994) introducen 6 niveles de gravedad para estas alteraciones (de 0 a 5) con sus correspondientes tratamientos. Aplicando esta clasificación, las alteraciones observadas

serían clasificadas en el grado 2, correspondiendo el mismo tratamiento que el recomendado por Paley (1990).

Teniendo en cuenta la clasificación de las complicaciones descrita por Paley (1990), los casos anteriormente descritos corresponderían a problemas, ya que aparecieron durante el período de distracción o consolidación y fueron resueltas por medios no quirúrgicos antes de la finalización del procedimiento. Según la clasificación realizada por Dahl *et al.* (1994), las cojeras observadas en estos dos animales del estudio corresponderían al grado más leve de complicación, las complicaciones menores. Aunque con diferente nomenclatura, ambas clasificaciones coinciden ampliamente ya que utilizan requisitos de agrupación muy similares.

A pesar de que algunos autores han descrito la aparición de numerosas complicaciones asociadas a la osteogénesis por distracción (Green, 1983; Paley, 1990; Eldrige y Bell, 1991; García-Cimbreló *et al.*, 1992; Dahl *et al.*, 1994), ninguno de los animales de nuestro estudio desarrolló más complicaciones clínicas durante el procedimiento, hecho que coincide con lo observado por Elkins *et al.* (1993) y Hancock *et al.* (2003) en las elongaciones óseas llevadas a cabo en perros. Sin embargo, de forma paralela a lo que ocurría con el dolor, esta ausencia de complicaciones puede ser debido a la aplicación de valores adecuados de velocidad y ritmo de distracción, y a la realización de una elongación relativamente corta, ya que de esta forma se reduce considerablemente el riesgo de aparición de lesiones estructurales y funcionales de los tejidos blandos, y por lo tanto de complicaciones (Ilizarov, 1989a; Lee *et al.*, 1993; Stanitski, 1994; Ippolito *et al.*, 1994; Mizumoto *et al.*, 1995; Simpson *et al.*, 1995; Makarov *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001). Por el contrario, otros autores en veterinaria han observado la aparición de contracturas musculares y articulares de carpo tras la realización de una elongación extensa de radio en perros con acortamiento de dicho hueso (Langley-Hobbs *et al.*, 1996; Preston, 2000).

VI.3.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS RADIOLOGICOS

El protocolo radiológico realizado en nuestro estudio, no sólo permitía controlar el correcto desarrollo del proceso de elongación ósea, sino también valorar la evolución de la mineralización del callo de distracción y diferenciar las estructuras que aparecían a lo largo de todo el proceso, además de detectar prematuramente complicaciones como la rotura de implantes, la osteólisis periaguja, la infección o la desviación ósea, entre otros. Aunque se han descrito otras técnicas más eficaces en el seguimiento de la evolución de la mineralización del callo de distracción (tomografía axial computerizada, ecografía, etc.), se trata de métodos que presentan algunas limitaciones en su uso clínico veterinario, como la elevada emisión de radiación, el complicado manejo que requerían los animales o los costes tan elevados (Hamanishi *et al.*, 1994; Hughes *et al.*, 1994; Muir *et al.*, 1995; Kolbeck *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2002). La radiología se considera una técnica sencilla, asequible y de buena calidad diagnóstica (Kolbeck *et al.*, 1999; Cheung y Zhang, 2003). Con objeto de mejorar su sensibilidad, decidimos introducir el uso de chasis y películas mamográficas, ya que al eliminar una de las pantallas intensificadores del chasis y tratarse de una película de grano más fino y matriz no fluorescente, era posible obtener imágenes con mayor definición (Thrall y Widmer, 2002).

Con referencia a la desviación axial de la osteotomía, tal y como se ha descrito en la sección de “Resultados”, el 26% de las extremidades elongadas en el estudio presentaron una desviación axial superior a 10° durante la fase de distracción ósea, siendo únicamente el 9% superior a 20°. Esta proporción es inferior a la registrada por otros autores de medicina humana, tales como Karger *et al.* (1993), Trivella *et al.* (1996) o Caja *et al.* (2003), quienes registran desviaciones axiales superiores a 16°, 10° y 15° en un 56, 43 y 41% de las tibias elongadas mediante fijadores unilaterales, respectivamente. Sin embargo, no es posible realizar una comparación aceptable de dichas proporciones con las obtenidas en nuestro estudio ya que en éste último fueron implantadas modificaciones con objeto de evitar dicha desviación axial.

Todas las muestras afectadas presentaron una desviación axial medial, excepto una que mostró una desviación cráneo-caudal de la osteotomía. Este animal correspondía a uno de los que presentaron una cojera crónica severa de la extremidad

posterior derecha y que requirió de la administración prolongada de antibióticos. A pesar de la intervención quirúrgica en la EPI, dicho animal evitaba el apoyo constante de la EPD, cargando la mayor parte de su peso sobre la extremidad recientemente operada. Este hecho, junto al aflojamiento de las rótulas que fijaban las agujas al elongador por el exceso de carga, pudo causar el colapso y desviación craneal del fragmento proximal durante el período postquirúrgico. No obstante, la causa de la aparición de una desviación craneal tras el colapso de la osteotomía, y no medial como en el resto de los animales, podría estar relacionada con una posición excesivamente alejada de las agujas con respecto a la osteotomía, provocando entonces un efecto palanca sobre el hueso.

La desviación medial de los fragmentos óseos ocurrida en el resto de los animales afectados por esta complicación, podría ser debida tanto a la tensión ejercida por los grupos musculares dominantes en la tibia como al aflojamiento de las agujas y el debilitamiento de sus fijaciones en el elongador causado por las fuerzas de apoyo, tal y como afirman Paley (1990), Eldridge y Bell (1991). Mientras que el elongador separaba los segmentos tibiales en la cara medial, la elevada tensión ejercida por el músculo tibial craneal en la cara lateral de la extremidad dificultaba dicha separación lateralmente. Este hecho, junto con el aflojamiento de las fijaciones de las agujas, daba lugar al desplazamiento medial de la osteotomía y la consiguiente desviación axial del hueso (Paley, 1990). A pesar de que este autor recomienda la inserción angulada de las agujas y Caja *et al.* (2003) el recubrimiento de las agujas con hidroxapatita, no se aplicó ninguna de estas sugerencias ya que podían interferir en el estudio que se estaba llevando a cabo. No obstante, se optó por la colocación de una barra conectora adicional entre el hueso y el elongador para evitar que las agujas soportaran fuerzas tan elevadas durante el apoyo y se desviarán. En el proceso de distracción diario, era necesario aflojar las rótulas distales de la barra adicional, realizar la distracción y ajustarlas de nuevo. Puesto que aquellos animales a los que se introdujo esta modificación no presentaron desviación axial del hueso, podemos deducir que la causa principal de dicha deformación durante la elongación ósea es el aflojamiento de las fijaciones de las agujas en el elongador durante el apoyo, y no debido a las fuerzas musculares. Es necesario tener en cuenta que durante la elongación ósea no existe contacto entre los segmentos óseos, de forma que toda las fuerzas se transmiten al elongador a través de las agujas. Adicionalmente, la elongación realizada era tan reducida que resultaba poco probable

que se crearan tensiones musculares suficientemente elevadas para provocar la desviación ósea.

Por otra parte, de las 5 extremidades desviadas medialmente, 3 pertenecían a animales muy nerviosos y asustadizos y que realizaban un ejercicio más activo y movimientos más bruscos que el resto de las perras del estudio. Este hecho, podría indicar la existencia de una predisposición individual de los animales más activos a sufrir desviación axial del callo de distracción, ya que, como se ha comentado anteriormente, la causa más importante de desviación axial parecen ser las fuerzas de apoyo. La colocación de la barra conectora adicional en el resto de animales evitó la desviación axial de los segmentos óseos incluso en aquellas perras más activas.

Según la clasificación establecida por Paley (1990), la desviación axial de las extremidades elongadas, observada en algunos animales de nuestro estudio es considerada como una complicación mayor ya que supera los 5° de angulación y se mantiene al final del proceso de elongación.

En cuanto a la obtención final de la elongación teórica, 13 de las 23 elongaciones realizadas (56%) obtuvieron una longitud final igual o inferior al 80% de la elongación esperada, de las cuales la mitad presentaban una desviación axial. Esta observación era deducible ya que la desviación axial producía un acortamiento más o menos marcado del espacio interfragmentario. Ningún animal presentó una elongación real superior a la teórica. Esta reducción en la elongación obtenida parece ser debida tanto a la tensión ejercida por los músculos regionales como al aflojamiento de la sujeción de las agujas en el elongador, y no a un error en el proceso de elongación tal y como afirma Yanoff *et al.* (1992), ya que el proceso de distracción fue realizado de forma muy cuidadosa por una misma persona, quien comprobaba la separación de las agujas a medida que se realizaba la distracción. De forma similar a lo que sucedía con las desviaciones axiales, 10 de esas 13 elongaciones inferiores a la teórica (77%) correspondían a 5 animales del estudio. Esta observación podría indicar que podía existir una predisposición individual para la reducción de la elongación obtenida respecto a la esperada, pero no existen hechos concluyentes ni referencias que lo corroboren.

Gracias a la realización de controles radiológicos cada dos semanas, tal y como recomiendan algunos autores (Vade y Eissenstat, 1990; Young *et al.*, 1990) fue posible observar que el inicio de la mineralización del callo de distracción comenzaba, en el 79% de los animales, a las dos semanas de la intervención quirúrgica. Esta presentación coincide con las observaciones registradas en elongaciones llevadas a cabo en animales (Delloye *et al.*, 1990; Welch y Lewis, 1999; Yanoff *et al.*, 1992; Elkins *et al.*, 1993; Lesser, 1998; Marcellin-Little *et al.*, 1998; Preston, 2000; Hancock *et al.*, 2003) quienes pudieron visualizar el comienzo de la mineralización del tejido regenerado entre la primera y tercera semana postquirúrgica. Esta calcificación comenzaba por la zona del callo de distracción que se encontraba en contacto con la cavidad medular de los segmentos óseos originales, y aparecía formada por numerosas estructuras lineales radiodensas. Asimismo, el tejido neoformado localizado a nivel perióstico también era de las primeras estructuras en calcificarse, aunque en menor medida que el callo medular, coincidiendo ambas observaciones con las registradas por Delloye *et al.* (1990). Asimismo, estudios realizados mediante densitometría de energía dual muestran que el contenido óseo mineral es superior en el corte longitudinal central a lo largo de todo el proceso de elongación ósea (Cheng *et al.*, 2002). Sin embargo, el escaso volumen de tejido calcificado y la presencia en algunos casos de depósitos muy dispersos de calcio, no permitieron observar la estructuración típica del callo de distracción hasta dos semanas después. En ese momento pudo observarse la presencia de una línea radiolúcida central de entre 2 y 3mm de grosor y de un callo calcificado en los extremos proximal y distal en contacto con los fragmentos óseos originales, tal y como describen Ilizarov (1998ayb), Delloye *et al.* (1990), Samchukov (1998), Stallings *et al.* (1998) o Welch y Lewis (1999).

El proceso de mineralización del callo de distracción durante la fase de consolidación tenía lugar en sentido centripeto, es decir desde las corticales originales hacia el centro del callo, hecho corroborado por otros autores y a pesar de la aplicación de protocolos diferentes (Ilizarov, 1989a; Aronson *et al.*, 1990; Delloye *et al.*, 1990; Samchukov, 1998; Stallings *et al.*, 1998; Welch y Lewis, 1999). De esta forma, la línea central radiolúcida iba disminuyendo progresivamente de grosor hasta desaparecer por completo en el momento de la consolidación del callo de distracción. Cabe destacar la forma zigzagueante de dicha línea central que ya fue observada por Ilizarov en 1990. En nuestro estudio pudimos observar que dicha conformación irregular era más claramente

observada en la proyección radiográfica medio-lateral, dando lugar a una asimetría entre los callos proximal y distal, decreciente en sentido caudal para el callo proximal y creciente para el distal. Este fenómeno producía la superposición de ambas estructuras en la proyección radiográfica antero-posterior, dando el aspecto de un callo consolidado cuando en realidad no era así. Aunque no hemos encontrado una explicación lógica a este fenómeno, no parece tener un efecto aparentemente negativo en el proceso de osteogénesis por distracción. Vade y Eissenstat (1990) afirman que la observación radiológica de una línea radiolúcida en forma de “hoja de sierra” en el centro del callo de distracción puede corresponder a una consolidación retardada o a una fractura por estrés. Sin embargo, puesto que la línea observada en nuestro estudio está presente desde el comienzo de la distracción, y que la fractura de estrés suele precederse de signos clínicos evidentes de dolor, aspecto que podemos descartar en nuestro caso, no resulta razonable considerar ninguna de las dos justificaciones aportadas por estos autores.

Debido a que los períodos de supervivencia de los animales eran relativamente cortos, únicamente pudo observarse la consolidación total del callo de distracción en dos animales, en ambos casos a las 14 semanas de la intervención quirúrgica. Este tiempo coincide con los rangos indicados por Young *et al.* (1990), Welch y Lewis (1999) y Cheung y Zhang (2003), pero no por los índices aportados por otros autores (DeBastiani *et al.*, 1987; Paley, 1990; Minty *et al.*, 1994; Trivella *et al.*, 1996; Donan *et al.*, 2002), quienes aportan valores inferiores de consolidación para 1 cm de hueso regenerado. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos valores han sido obtenidos en pacientes humanos en los que se han llevado a cabo elongaciones prolongadas, y tal y como afirma Fischgrund *et al.* (1994) el aumento de la distancia elongada tiende a reducir el tiempo de consolidación por centímetro elongado.

Los signos radiológicos de consolidación observados en ese tiempo se adaptaban a los requisitos indicados en el apartado de “Material y Métodos”, no obstante, no se retiró el fijador externo en dicho momento por diferentes razones. Uno de los animales (Nº 2-EPD) presentaba un período de supervivencia de 14 semanas de forma que la extracción del implante, sin la posibilidad de observación posterior de la evolución clínica y radiológica de la extremidad, no tenía mucho sentido. En el caso Nº 1 (EPD), paciente con un período de supervivencia de 18 semanas, no se retiró el fijador externo

a las 14 semanas a pesar de estar consolidado el hueso, por considerar que la extremidad contralateral, también intervenida, podría afectar a la extremidad más longeva al desencadenar una mayor carga en ella. Por este motivo, decidimos esperar dos semanas más para retirar el fijador.

Con respecto a la reacción perióstica alrededor de las agujas, se trata de un fenómeno frecuente en los huesos intervenidos con fijadores externos (Johnson *et al.*, 1989; Franch, 1994). En nuestro estudio pudo observarse que los valores de esta reacción aumentaban claramente a partir de las 2 semanas después de la finalización de la distracción, siendo la interfase aguja-hueso 2 la más afectada, seguida de la aguja 3. Aunque no se han encontrado referencias sobre este hallazgo, es posible que la mayor reactividad perióstica en la segunda y tercera aguja se deba a su posición más próxima a la osteotomía, y por lo tanto a las fuerzas tan elevadas a las que se encuentran sometidas. El aumento progresivo de la reacción perióstica detectada a nivel de la osteotomía corresponde a la evolución en la formación del callo de distracción de origen perióstico, cuyo volumen se incrementa durante la fase de consolidación.

A pesar de que no se realizó una clasificación de los callos de distracción en función de su forma, polaridad y consistencia radiográfica, tal y como describen Donnan *et al.* (2002), pudieron observarse conformaciones interesantes en algunos animales. Destaca la imagen radiográfica del hueso regenerado de ambas extremidades en el animal N° 2. Ambos callos se caracterizan por presentar una morfología poco voluminosa, en la que el espesor del hueso regenerado es inferior al diámetro óseo, así como por mostrar una ausencia prácticamente total de reacción perióstica alrededor de las agujas y la osteotomía. Teniendo en cuenta lo descrito por Donnan *et al.* (2002), el reducido crecimiento del callo durante las fases iniciales de distracción, generalmente se encuentra asociado a una respuesta pobre del hueso a la elongación. Sin embargo, las observaciones en fases más tardías lo asocian con resultados satisfactorios del proceso de elongación del hueso. No obstante, la visualización de estrías longitudinales en dicho callo se encuentra relacionada con evoluciones correctas de la consolidación del callo (Donnan *et al.*, 2002), tal y como tuvo lugar en la extremidad de 14 semanas de evolución. Este escaso desarrollo del callo de distracción y de reacción perióstica a los implantes podría encontrarse relacionado con el hecho de que este animal presentó una serología positiva a *Leishmania infantum*. Esta patología, además de afectar diferentes

sistemas orgánicos, en ocasiones se ha relacionado con la aparición de problemas ortopédicos, principalmente articulares (Pedersen *et al.*, 2000). Sin embargo, en el caso aquí presentado no resulta evidente dicha relación, ya que otros dos animales que también presentaron una serología positiva a este parásito, no mostraron alteraciones radiográficas de esta naturaleza en el desarrollo del callo de distracción de ambas extremidades.

VI.4.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE RETRODISPERSION (BS-SEM)

La microscopía electrónica de retrodispersión presenta un mayor interés para el estudio de la evolución en la mineralización y consolidación del callo de distracción que las técnicas histológicas convencionales, ya que éstas requieren de la decalcificación de las muestras con la consiguiente pérdida de numerosa información relacionada con los procesos antes mencionados. Las técnicas histológicas convencionales permiten la identificación de los tejidos que participan en la formación del callo, pero no la determinación del grado, patrón ni progresión de calcificación de cada uno de ellos, hecho de gran importancia en elongación ósea y posterior consolidación del callo de distracción. De este modo, resulta de diferente pronóstico para la evolución en el proceso de consolidación del callo de distracción, la presencia de cartílago sin calcificar en etapas avanzadas del proceso (sugere de una posible consolidación retardada o no-unión del tejido neoformado) a la de cartílago completamente calcificado. Este último, aunque indica un cierto retraso en el proceso, sugiere una evolución hacia la completa consolidación del callo. Del mismo modo, las técnicas convencionales tampoco permiten identificar los diferentes patrones de calcificación ósea, indicativos del grado de madurez de los tejidos óseos presentes.

La aplicación de la microscopía electrónica de retrodispersión en nuestro estudio, aunque ha conllevado un procesado más laborioso de las muestras, ha proporcionado información de gran relevancia para la identificación de los diferentes tejidos involucrados en la consolidación del callo de distracción. De esta forma, ha sido posible evaluar de forma precisa todo el proceso de mineralización y osificación del tejido neoformado durante la elongación ósea de la tibia mediante un elongador uniplanar unilateral, ya que existe una gran controversia acerca del mecanismo de osificación que tiene lugar durante la elongación ósea

A pesar de que radiográficamente no aparecen signos de actividad ósea o de calcificación del callo de distracción hasta la segunda semana postquirúrgica, mediante microscopía electrónica de retrodispersión pueden observarse los primeros signos de reactividad ósea y vascular a los 7 días de la cirugía. Esta apreciación coincide con las observaciones realizadas por Franch (1994) en un estudio relacionado con la

consolidación de fracturas estabilizadas mediante fijadores externos, en el que observó una respuesta vascular interfragmentaria y una temprana actividad osteoclástica a nivel de la cavidad medular y de la superficie endóstica, mediante microangiografía y microscopía electrónica de retrodispersión, respectivamente.

En nuestro estudio, las imágenes obtenidas de las muestras de 1 semana de evolución muestran una elevada respuesta vascular en el centro del espacio interfragmentario, tal y como ponen de manifiesto los numerosos depósitos de Sulfato de Bario que pueden apreciarse. Estos depósitos, aunque aparentemente presentes, disminuyen en densidad hasta desaparecer a las 4 semanas postquirúrgicas, hallazgo que no coincide con las observaciones realizadas por Franch (1994) mediante gammagrafía y microangiografía en el proceso de consolidación de osteotomías tibiales. Puesto que la captación gammagráfica de los tejidos se encuentra directamente relacionada con el desarrollo vascular a ese nivel, y a pesar de que dichas osteotomías no se encontraban sometidas a distracción, Franch pudo cuantificar un aumento gradual de la captación gammagráfica, que alcanzaba un valor máximo alrededor de las 4 semanas postquirúrgicas y a partir del cual disminuía progresivamente a lo largo del tiempo (Franch, 1994). Sin embargo, es necesario tomar las observaciones registradas en nuestro estudio con precaución ya que la microscopía electrónica de retrodispersión no es la técnica de elección para la valoración de la vascularización. Para ello existen métodos más eficaces y específicos, como puede ser la microangiografía o la gammagrafía. No obstante, la presencia de contraste baritado resulta de gran utilidad a la hora de identificar los conductos vasculares intraóseos, especialmente aquellos que comunican el hueso neoformado con las corticales originales y que son indicativos de actividad de remodelación ósea.

En esta fase evolutiva, puede observarse también gran cantidad de esquirlas y restos óseos procedentes de la realización de la osteotomía y de la colocación de los tornillos, sin embargo, no existen todavía evidencias de ataque osteoclástico a este material. A medida que transcurre el tiempo, parte de estos restos óseos son eliminados por la acción de los osteoclastos mientras que otros son incluidos en el tejido neoformado o reactivo para posteriormente desaparecer por medio de la remodelación ósea (Franch, 1994). Por el contrario, en este momento ya es visible una reactividad

perióstica incipiente próxima a la osteotomía, principalmente en la cara caudal, hecho que todavía no es visible radiográficamente.

A partir de la segunda semana postquirúrgica es posible observar la conformación típica del callo de distracción descrita por numerosos autores (Ilizarov, 1989a, 1992; Delloye *et al.*, 1990; Aronson *et al.*, 1990; Frierson *et al.*, 1994; Lengelé, 1996; Yasui *et al.*, 1997; Kessler *et al.*, 2002), constituida por una banda central de tejido no calcificado y por un callo proximal y distal, formado por columnas de tejido calcificado que se orientan en la dirección de la distracción.

En las imágenes panorámicas obtenidas del área de distracción, destaca el origen de ese callo de elongación, ya que no se forma homogéneamente en toda la superficie ósea osteotomizada. En las fases iniciales del proceso de elongación, es posible observar cómo el callo se forma a partir de la cavidad medular y del periostio adyacente a la osteotomía. Ambos callos aumentan de tamaño progresivamente, no sólo longitudinalmente en dirección hacia el centro del espacio interfragmentario, sino también transversalmente hacia la periferia. De este modo, puede observarse que el callo de origen medular se desplaza lateralmente cubriendo parte de la superficie cortical osteotomizada. Al mismo tiempo, el callo de origen perióstico, crece transversalmente hacia el interior del espacio interfragmentario, cubriendo también parcialmente la superficie cortical osteotomizada. Este crecimiento transversal da lugar a la unión de ambos callos, los cuales acaban por cubrir completamente el espacio correspondiente a la cortical ósea. La evolución centrípeta en el proceso de formación del hueso regenerado ha sido descrita por numerosos autores (Ilizarov, 1989a; Delloye *et al.*, 1990; Aronson *et al.*, 1990; Lengelé, 1996; Frierson *et al.*, 1994; Samchukov, 1998; Stallings *et al.*, 1998; Welch *et al.*, 1998), mientras que el origen perióstico y medular del callo de distracción ha sido observado por Delloye *et al.* (1990) y Lengelé (1996) mediante microrradiografía en muestras no decalcificadas de hueso elongado. Otros autores, tales como Kojimoto *et al.* (1988) y Frierson *et al.* (1994), ratifican la importancia de la preservación del periostio y el endostio ya que influyen de forma importante en la formación del callo de distracción. De forma similar, Ilizarov (1989b) defiende la preservación tanto del periostio como de la vascularización medular para la obtención de una adecuada formación del callo de distracción. De este modo, nuestros resultados confirman los resultados de estudios previos, en el sentido que la formación

del callo durante la distracción depende principalmente del periostio y de la cavidad medular (Kojimoto *et al.*, 1988; Ilizarov, 1989b; Frierson *et al.*, 1994), y cuya mineralización tiene lugar en sentido centrípeto, es decir, desde los fragmentos óseos originales hacia el centro del callo (Ilizarov, 1989a; Delloye *et al.*, 1990; Aronson *et al.*, 1990; Lengelé, 1996; Frierson *et al.*, 1994; Samchukov, 1998; Stallings *et al.*, 1998; Welch *et al.*, 1998).

Gracias a las visualizaciones panorámicas de las muestras, es posible observar la conformación general del callo de elongación y su evolución durante la fase de consolidación. Destaca el hecho que el tejido neoformado procedente del periostio localizado en la cara caudal de la tibia presenta generalmente un mayor volumen que el formado en la cara craneal. Incluso en las etapas más iniciales de la distracción ósea, es posible observar una mayor reacción perióstica en la cara caudal de la osteotomía que en la cara craneal. Dicha diferencia no es tan marcada a nivel de la diáfisis tibial, pero está presente en muchas de las muestras. Aunque la bibliografía consultada no hace referencia a las observaciones realizadas en este estudio, éstas pueden ser atribuidas a la existencia de una mayor cobertura muscular en la cara caudal de la tibia. Es bien conocido el papel particularmente trascendental que ejerce la musculatura en el proceso de consolidación de las fracturas, ya que favorece la formación del callo fractuario (Rhineland y Wilson, 1982). De igual forma que en una fractura el músculo adyacente es responsable de la respuesta vascular inmediata en la zona fractuaria (Rhineland y Wilson, 1982), durante la elongación ósea la musculatura en contacto con el hueso podría ejercer también ese efecto estimulante sobre la revascularización interfragmentaria, y por tanto sobre la producción de callo. Por otra parte, la existencia de cierta inestabilidad en el fijador externo ha sido descrita como la causa de formación de un callo de distracción hipertrófico (Donnan *et al.*, 2002). Si dicha inestabilidad es superior en la cara caudal del hueso, podría dar lugar al desarrollo de un callo más voluminoso en esa zona. Sin embargo, en teoría la cara lateral de la tibia sería la región de mayor inestabilidad debido a la presencia de una mayor separación al fijador externo unilateral situado en la cara medial del hueso, y no la superficie caudal.

La visión a grandes aumentos por el microscopio permite identificar los diferentes tejidos que participan en la formación y consolidación del callo durante la elongación ósea. Sin embargo, los tejidos observados en nuestro estudio no coinciden en

su totalidad con los resultados obtenidos por otros autores, y es que existe una gran controversia con referencia al mecanismo de osificación que tiene lugar durante la elongación ósea.

Los extensos estudios llevados a cabo por Ilizarov (1989b) le condujeron a sostener que la formación de hueso nuevo a partir de la separación gradual de dos fragmentos óseos tiene lugar predominantemente mediante osificación intramembranosa. De esta forma, las microcolumnas de tejido fibroso dan paso directamente al depósito de hueso fibrorreticular y la posterior remodelación a hueso lamelar, apareciendo agrupaciones aisladas de tejido cartilaginoso únicamente en aquellos casos en los que existe cierta inestabilidad del implante. Contrariamente, Kojimoto *et al.* (1988) comparan la estructura del callo neoformado visible durante la distracción ósea con la organización histológica típica del cartílago de crecimiento. De este modo, proclaman la osificación endocondral como el mecanismo real de formación de hueso regenerado, aunque sus estudios también se basan en estudios histológicos con muestras decalcificadas. Años más tarde, Yasui *et al.* (1997) describen la presencia de un tercer mecanismo de osificación durante la elongación ósea, en el que participa un tejido con características diferenciadas de las del tejido óseo y cartilaginoso, el tejido condroide. Sin embargo, estos autores visualizan el tejido condroide en muestras decalcificadas, basando sus hallazgos en la morfología celular y afinidad tisular por los colorantes. Lengelé (1996) describe también la presencia de tejido condroide durante la distracción ósea, pero en este caso, basa sus resultados en la observación mediante microrradiografía de muestras no decalcificadas. De este modo puede visualizar, no sólo la morfología celular, sino el patrón de mineralización que sigue dicho tejido (Lengelé, 1996). Posteriormente, otros autores han observado la presencia de tejido condroide en el callo de elongación en aquellos casos en que la distracción se había llevado a cabo de forma discontinua (Kessler *et al.*, 2002) o tras la irradiación del hueso (Muhonen *et al.*, 2002).

Aunque algunos autores ya habían observado la presencia de este tejido en determinadas localizaciones del esqueleto en crecimiento (varios autores en Manzanares *et al.*, 1988), no fue hasta 1982 cuando Goret-Nicaise lo describió por primera vez con el término “tejido condroide” (Goret-Nicaise, 1982). Sus estudios acerca del crecimiento óseo le permitieron observar la presencia de un tejido nuevo que muestra

características intermedias entre hueso y cartílago. El tejido condroide presenta numerosas lagunas celulares irregulares y confluyentes, así como una afinidad por el azul de metileno similar al cartílago, sin embargo su mineralización es mucho más rápida y sigue un patrón de evolución diferente a este tejido. Mientras que la calcificación del tejido cartilaginoso presenta una dirección centrífuga, desde la célula hacia el exterior, el tejido condroide muestra una calcificación centrípeta, dando lugar a su conformación irregular (Goret-Nicaise 1982; Goret-Nicaise, 1986; Lengelé, 1996; Goret-Nicaise *et al.*, 1988). Asimismo, el tejido condroide presenta un mayor grado de calcificación que el cartílago calcificado y el hueso lamelar y contiene fibras de colágeno tanto de tipo I, característica del tejido óseo, como de tipo II, presente en el tejido cartilaginoso (Goret-Nicaise, 1986; Goret-Nicaise *et al.*, 1988, Manzanares *et al.*, 1988). Este tejido fue también observado por Franch en el proceso de consolidación de fracturas estabilizadas mediante fijadores externos en perros (Franch, 1994).

La visualización secuencial y temporal de las muestras obtenidas en diferentes puntos de la evolución del callo de distracción, nos permitió identificar los tejidos que participan en este proceso y su evolución a lo largo del tiempo. La ausencia de material calcificado en la zona central radiolúcida impide la identificación mediante microscopía electrónica de retrodispersión de los tejidos que constituyen dicha estructura. El grosor de esta banda no calcificada disminuye progresivamente a lo largo del periodo de consolidación, debido a la calcificación del tejido localizado en la periferia, hasta desaparecer completamente en el momento de la consolidación ósea. Destaca el hecho de que esta línea central no desaparece simultáneamente en todo el diámetro del callo, sino que persiste y se visualiza durante un mayor periodo de tiempo en la porción caudal. A pesar de que únicamente dos muestras presentan un período de supervivencia suficientemente prolongado para mostrar consolidación ósea (animales N° 1-EPD y N° 2-EPD), resalta el hecho de que este fenómeno tiene lugar en ambos casos. Esta unión más tardía en la porción caudal del callo de distracción podría estar provocada por las mismas causas que dan lugar a la consolidación retardada del callo de elongación, las cuales describe Paley como razones técnicas o individuales (Paley, 1990). Sin embargo su localización únicamente en la región caudal de la tibia, permite descartar causas patológicas en el animal así como la técnica quirúrgica y de distracción aplicadas. De forma similar a lo que ocurriría con respecto al volumen del callo, cierta inestabilidad localizada en la porción caudal del hueso podría ser el origen de esta demora en la

desaparición de la línea central no calcificada a ese nivel. No obstante, resulta confuso pensar cómo puede existir inestabilidad únicamente en la región caudal de la tibia sin que se encuentre presente en otros puntos del hueso. En este sentido, sería necesaria la realización de estudios en mayor profundidad que explicasen estas observaciones.

Es necesario incidir sobre la presencia de núcleos calcificados en el centro de la zona central de crecimiento en las muestras de 3 semanas de evolución (animales N° 7-EPI y N° 8-EPI). Estos núcleos calcificados formados por tejido condroide y hueso fibrorreticular no vuelven a ser visualizados en ninguna de las muestras del estudio. La explicación de este fenómeno no se encuentra exenta de dificultad, ya que la bibliografía consultada no ofrece registro de hallazgos similares y los investigadores de la osteogénesis por distracción coinciden en afirmar la presencia de una zona central no calcificada en el centro del callo de elongación (Ilizarov, 1989a; Delloye *et al.*, 1990; Aronson *et al.*, 1990; White y Kenwright, 1991; Lengelé, 1996; Frierson *et al.*, 1994; Yasui *et al.*, 1997; Kojimoto *et al.*, 1998; Kessler *et al.* 2002). Durante el proceso de distracción de dichas extremidades, no se registró ningún problema ni modificación en el ritmo o velocidad de distracción. Asimismo, la existencia de algún tipo de alteración en la preparación o procesamiento de las muestras del estudio es poco probable, de forma que no podemos aportar una explicación racional para este fenómeno observado.

Con referencia a las zonas de mineralización proximal y distal pueden identificarse dos partes claramente diferenciadas en función del tejido que los constituye y su conformación: un frente de mineralización en contacto con la zona central no calcificada, y una zona de formación de microcolumnas en contacto con los fragmentos óseos originales. Nuestra definición coincide con la descrita por Aronson *et al.* (1990). El frente de mineralización consiste en una banda estrecha, de aspecto más esponjoso que el resto del callo de distracción, cuyo grosor disminuye durante la fase de consolidación hasta desaparecer al fusionarse con el frente de mineralización opuesto, en el momento de la consolidación del callo de elongación. Mediante microscopía electrónica de retrodispersión, es posible observar que la composición tisular de este frente de mineralización varía dependiendo de la fase de elongación en que se encuentra. Durante la fase de distracción, está constituido únicamente por tejido condroide, mientras que en la fase de consolidación puede observarse también la presencia de tejido cartilaginoso. Estos resultados coinciden con las observaciones

realizadas por Lengelé (1996) mediante microrradiografía en muestras de elongación ósea. Si tenemos en cuenta la rápida calcificación del tejido neoformado que tiene lugar durante la distracción ósea (ya es visible radiológicamente a las dos semanas postquirúrgicas) y la mayor velocidad de mineralización que posee el tejido condroide en relación al tejido cartilaginoso, la presencia de condroide en esta fase se encuentra justificada. De este modo, Goret-Nicaise *et al.* (1988) sostienen que el tejido condroide aparece en aquellas zonas en las que actúan fuerzas extrínsecas sobre el crecimiento óseo y donde la velocidad de formación de tejido calcificado es elevada (Goret-Nicaise *et al.*, 1988). Una vez finalizada la distracción, tendría lugar una reducción en la velocidad de calcificación del callo de distracción, lo cual permitiría la participación de tejidos con un ritmo de mineralización más lento, como el tejido cartilaginoso. De esta forma, tras la desaparición de las fuerzas de distracción, la calcificación del callo de elongación seguiría el mecanismo habitual, y más lento, de la consolidación de fracturas. Recordemos que el callo fractuario no suele ser visible radiográficamente como mínimo hasta las 4 semanas postquirúrgicas, mientras que el callo de distracción ya es reconocible radiológicamente dos semanas después de la cirugía. Sin embargo, tal y como muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de retrodispersión en el presente estudio, la aparición de tejido cartilaginoso calcificado en el callo de distracción no tiene lugar inmediatamente después del cese de la elongación. Tras dos semanas de consolidación, únicamente dos muestras presentan algún foco aislado de tejido cartilaginoso calcificado. Es necesario esperar hasta las 4 semanas tras el cese de la distracción para observar una mayor presencia de cartílago calcificado, el cual aparece únicamente en el frente de mineralización del callo. Podría establecerse un paralelismo entre la fase de consolidación del callo de distracción y el proceso de consolidación convencional de una fractura ya que, hasta la cuarta semana postquirúrgica Franch (1994) no pudo observar tejido cartilaginoso calcificado en el callo fractuario.

Durante la distracción, puede observarse que el resto del callo, formado principalmente por hueso fibrorreticular, se organiza en microcolumnas que siguen la dirección de la distracción, tal y como describen numerosos autores (Ilizarov, 1989a; Delloye *et al.*, 1990; Aronson *et al.*, 1990; Lengelé, 1996; Frierson *et al.*, 1994; Yasui *et al.*, 1997; Samchukov, 1998; Stallings *et al.*, 1998; Welch y Lewis, 1999; Welch *et al.*, 1998; Kessler *et al.*, 2002; Muhonen *et al.*, 2002; Rachmiel *et al.*, 2002). Tras el final de

la distracción, estas columnas se engrosan y remodelan perdiendo su conformación longitudinal tan característica, dando lugar a la zona de remodelación, descrita por Samchukov (1998). Las imágenes obtenidas muestran que este hueso fibrorreticular contiene numerosos núcleos de tejido condroide, los cuales se van haciendo más escasos con el tiempo, primero cerca de los fragmentos óseos originales y posteriormente hacia el centro del callo, al mismo tiempo que el hueso fibrorreticular es sustituido por hueso lamelar y osteonal. Finalmente, se produce la unión de los callos proximal y distal aproximadamente 4 semanas después del fin de la distracción, observación con la que coinciden Delloye *et al.* (1990). Tal y como se ha mencionado anteriormente, esta fusión y maduración de ambos tejidos no tiene lugar simultáneamente en todo el callo, sino que sigue una dirección caudal. La posible causa de este fenómeno ya ha sido presentada con anterioridad, sin embargo no se han encontrado citas en la bibliografía que hagan referencia a este a este hecho ni a sus posibles causas.

Llama la atención que la consolidación y unión de los callos proximal y distal de distracción no tiene lugar a partir de una aproximación máxima y toma de contacto entre ambas superficies calcificadas, sino que una vez alcanzada una determinada separación entre ambas estructuras, se forman puentes de cartílago calcificado y tejido condroide que unen dichas formaciones. Estos puentes calcificados aumentan progresivamente en grosor y número hasta dar lugar a la consolidación completa del callo de distracción. Los primeros puentes calcificados son visibles a las 6 semanas postquirúrgicas, y aunque las muestras de 8 semanas no presentan estas uniones, vuelven a ser visibles en las muestras de 10 semanas de evolución, con excepción de la muestra del animal N° 5-EPD. Dada la distribución puntual de estos puentes de unión calcificados entre los callos proximal y distal, su ausencia en una de las fases evolutivas puede ser debida a la realización de los cortes de las muestras a través de planos en los que no coincidiera la presencia de estas uniones. Por otra parte, aunque no se registró ninguna complicación clínica en las extremidades correspondientes a estas muestras, dos de ellas mostraron una elongación total inferior a la esperada, una de las cuales presentó simultáneamente una desviación axial marcada del callo de distracción. Tal y como se ha descrito anteriormente con referencia a la consolidación no homogénea del callo, la ausencia de estos puentes de unión puede ser también debida a los mismos factores que favorecen la consolidación retardada del callo, descritos por Paley (1990). Puesto que la desviación axial observada en una de las muestras no llevaba asociado un desplazamiento de los

fragmentos óseos, la explicación más razonable a esta ausencia de puentes de unión sería la existencia de cierta inestabilidad del fijador, no detectable ni clínica ni radiológicamente. Con el transcurso del tiempo, los tejidos presentes en esta región central unida maduran, de forma que el cartílago calcificado y el tejido condroide son sustituidos gradualmente por hueso fibrorreticular, lamelar y osteonal.

La mayor presencia de tejido condroide en las porciones más centrales del callo de distracción es un indicador de la progresión centrípeta de la maduración de los tejidos que forman parte de esta estructura neoformada. Ello se fundamenta en que el tejido óseo (hueso fibrorreticular y lamelar) necesita de un sustrato calcificado que actúe como soporte para su aposición y, puesto que el tejido condroide presenta una velocidad de calcificación más elevada que el cartílago (Goret-Nicaise, 1986; Goret-Nicaise *et al.*, 1988), implica que su presencia asegura una consolidación más rápida del callo de distracción que en el caso de existir únicamente tejido cartilaginoso calcificado.

A pesar de que los resultados de nuestro estudio muestran la presencia de tejido condroide en todo el proceso de elongación ósea, no coinciden totalmente con los presentados por Yasui *et al.* (1997), Kessler *et al.* (2002) o Muhonen *et al.* (2002). Por una parte, Yasui *et al.* (1997) afirman que en fases iniciales de la distracción tiene lugar una osificación endocondral, mientras que en fases más avanzadas el mecanismo predominante es la osificación intramembranosa. Adicionalmente, describen por primera vez que un tercer mecanismo participa en el proceso de osteogénesis por distracción. Dicho fenómeno incluye la presencia de tejido condroide que permite la transformación gradual de tejido fibroso a hueso. Nuestras observaciones coinciden con lo descrito por estos autores con respecto a la participación de tejido condroide en el proceso de elongación ósea, sin embargo, las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de retrodispersión en este estudio, muestran una ausencia de tejido cartilaginoso calcificado durante la distracción y su posterior aparición durante la fase de consolidación, contrariamente a lo descrito por esos autores. No obstante, es necesario interpretar con precaución ambos resultados ya que, aunque ambos procedimientos de elongación fueron llevados a cabo con un elongador de tipo uniplanar unilateral, cada uno de ellos aplicó diferentes valores de período de latencia, velocidad, hueso elongado y animal de experimentación utilizado así como diferentes técnicas diagnósticas.

Respecto a los estudios llevados a cabo por Kessler *et al.* (2002) y Muhonen *et al.* (2002), que confirman la presencia de tejido condroide en el callo de distracción, nuestros resultados tampoco coinciden en su totalidad con los suyos. Este hecho se debe a que, aunque las imágenes obtenidas en el presente estudio muestran la presencia de tejido condroide, ésta no se encuentra asociada a fenómenos de distracción discontinua o de irradiación ósea, tal y como sostienen dichos autores. En su trabajo, Kessler *et al.* (2002) establecen como distracción discontinua una velocidad de 1.5 mm al día en una sola distracción, comparándola con una distracción constante las 24 horas, siendo esos valores muy superiores a los aplicados en nuestro estudio. Adicionalmente, las diferencias existentes respecto al elongador, hueso elongado y animal de experimentación entre ambos estudios no permiten realizar una comparación adecuada entre ellos. Por otra parte, Muhonen *et al.* (2002) sostienen que la irradiación del hueso a elongar da lugar a la participación de tejido condroide en la formación del callo de distracción. Estos resultados no coinciden con nuestras observaciones ya que en ningún momento de nuestro estudio se aplicó radiación alguna a los huesos elongados, con excepción de la realización de controles radiográficos cada dos semanas que en ningún caso se corresponde a los niveles aplicados por dichos autores (22.4 Gy en 4 fracciones de 5.6 Gy/fracción). Como ocurría en el caso anterior, la utilización de diferentes técnicas laborales, elongadores, valores de distracción, animales y hueso elongado dificulta la comparación de ambos resultados.

De toda la bibliografía consultada, consideramos que el trabajo sobre elongación ósea que ofrece mayor similitud con el nuestro es el llevado a cabo por Lengelé (1996) ya que fue realizado en perros y utilizó la microrradiología de muestras no decalcificadas como método de estudio de la evolución del callo de distracción. Los resultados de nuestro estudio coinciden con los obtenidos por Lengelé (1996), quien también observa la presencia de tejido condroide en el callo durante la fase de distracción y la posterior participación de tejido cartilaginoso calcificado durante la fase de consolidación del callo de elongación. Asimismo, también repasa en el origen predominantemente medular y perióstico del callo de distracción. Sin embargo, es necesario mencionar que Lengelé (1996) utiliza el elongador circular de Ilizarov y aplica una velocidad de distracción inferior, de modo que también se requiere comparar ambos resultados con precaución.

En las preparaciones de mayor evolución de nuestro trabajo, es posible constatar la presencia de fenómenos muy avanzados de maduración y remodelación ósea, tanto en el callo de distracción como en las zonas de unión a la cavidad medular y a las corticales originales, con el inicio de la diferenciación del callo en cortical y medular. En la región del callo en contacto con el córtex, es posible observar la presencia de abundante tejido lamelar y osteonal, la disposición más compacta de estos tejidos y la aparición de estructuras vasculares dispuestas longitudinalmente que atraviesan la unión difícilmente visible entre el hueso neoformado y la cortical original. A nivel del callo en contacto con la cavidad medular, destaca la distribución menos compacta del hueso fibrorreticular y lamelar y que se continua con el hueso existente en la cavidad medular.

Esta remodelación del callo con la aparición de signos incipientes de corticalización a las 14 y 18 semanas postquirúrgicas, coincide con lo descrito por otros autores (Delloye *et al.*, 1990; Samchukov, 1998; Welch y Lewis, 1999) quienes establecen entre 5 y 7 meses el tiempo necesario para la remodelación completa del callo de distracción. La ausencia de muestras con tiempos evolutivos superiores no nos permite determinar con exactitud el momento en que se recupera por completo la estructura ósea original, aunque se ha establecido en aproximadamente un año (Samchukov, 1998; Welch y Lewis, 1999).

En nuestro trabajo, y a partir de los criterios de identificación de tejidos óseos publicados por otros autores (Goret-Nicaise, 1982; 1986; Goret-Nicaise *et al.*, 1988; Manzanares *et al.*, 1988; Franch *et al.*, 1998a) consideramos que el tejido condroide participa activamente y constituye un componente de gran importancia en la formación y consolidación del callo de distracción.

La microscopía electrónica de retrodispersión supone el método más moderno e indicado para el estudio de los procesos de consolidación y remodelación ósea del hueso neoformado durante la elongación ósea. La utilización adicional de otros sistemas de estudio, como la microangiografía o la histología decalcificada convencional, permite el estudio de fenómenos y estructuras no calcificadas que también tienen lugar durante la osteogénesis por distracción.

VII.- CONCLUSIONES

VII.- CONCLUSIONES

VII.1.- CONCLUSIONES

Basándose en los resultados obtenidos en los distintos estudios llevados a cabo en el presente trabajo, y tras la correspondiente contrastación con la bibliografía consultada, podemos formular las siguientes conclusiones:

1. El elongador unilateral utilizado en este estudio permite la realización de la elongación ósea de una forma sencilla, eficaz y cómoda para los pacientes.
2. La aplicación de un período de latencia de 5 días y de una velocidad de distracción de 0.5 mm cada 12 horas, constituye un protocolo factible y eficaz de elongación ósea en medicina veterinaria.
3. El procedimiento de elongación empleado ha permitido una adecuada funcionalidad de la extremidad durante todo el estudio sin afectar en ningún momento el bienestar del paciente.
4. A diferencia del callo de fractura, la mineralización del callo de distracción empieza ya a observarse radiográficamente a las dos semanas de la cirugía, debido a la presencia de tejido condroide y la mayor velocidad de mineralización que presenta respecto al tejido cartilaginoso.
5. La consolidación ósea del callo de distracción se produce 14 semanas después de la intervención quirúrgica.
6. El callo de distracción procede de la cavidad medular y del periostio, los cuales engloban posteriormente el área intercortical.
7. Los tejidos neoformados se orientan longitudinalmente siguiendo la dirección de las fuerzas de distracción y se osifican de forma centrípeta, desde los segmentos óseos originales hacia el centro del callo.
8. Durante la fase de distracción, el tejido condroide constituye el componente mayoritario del frente de mineralización del callo, mientras que en la fase de consolidación lo compone el tejido cartilaginoso calcificado, los cuales finalmente serán sustituidos sucesivamente por hueso fibrorreticular, lamelar y osteonal. Por ello, consideramos que el mecanismo de osificación del callo de distracción en nuestro estudio no es endocondral, sino más concretamente endocondroidal.

VII.2. - CONCLUSIONS

Based on the results obtained in this study and what has been previously reported, we are able to establish the following conclusions:

1. The unilateral external fixator used in the present study allows performing bone lengthening in an easy, effective and comfortable way for the patient.
2. The application of a latency period of 5 days and a rate of distraction of 0.5 mm every 12 hours has been found to be a feasible and effective protocol of bone lengthening in veterinary medicine.
3. Our procedure has allowed satisfactory limb function during the study without affecting the well being of the patient.
4. Unlike the fracture callus, the mineralization of the distraction callus can be seen radiographically 2 weeks after the surgery because of the presence of chondroid tissue, which has a higher mineralization rate than cartilaginous tissue.
5. The healing of the distraction callus is achieved 14 weeks after the surgical procedure.
6. The distraction callus comes from the medullary and periosteal areas, which subsequently embrace the intercortical area.
7. The regenerated tissues become longitudinally oriented following the direction of the distraction forces and they become ossified in a centripetal way, from the original bone segments towards the middle of the callus.
8. During the distraction process, the chondroid tissue is the main component of the mineralization front, while during the consolidation period it is the calcified cartilaginous tissue. Both tissues are finally replaced by woven, lamellar and osteonal bone, successively. The findings of this study allow us to consider the ossification mechanism of the distraction callus is not endochondral but endochondroidal.

VIII.- RESUMEN

VIII.- RESUMEN

VIII.1.- RESUMEN

Los objetivos del presente estudio se centraban en el desarrollo de un elongador y de un protocolo de distracción ósea sencillo, efectivo y confortable para los pacientes, así como en el estudio de la progresión de los tejidos que forman el callo de distracción. Para tales objetivos, se practicó de forma bilateral no simultánea, una osteotomía centrodiafisaria tibial en 12 perros, y se colocó un elongador unilateral. Tras un período de latencia de 5 días, se llevó a cabo la distracción de los segmentos óseos a un ritmo de 0.5mm cada 12 horas durante 10 días, para posteriormente mantenerlos de forma estática con objeto de obtener la consolidación del callo de distracción formado. Durante todo el período postoperatorio, se realizaron controles clínicos diarios y radiológicos cada 2 semanas hasta la eutanasia de los animales, a las 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, y 18 semanas tras la realización de la osteotomía. El estudio postmortem mediante microscopía electrónica de retrodispersión (BS-SEM) se realizó sobre muestras óseas no decalcificadas.

Los resultados clínicos obtenidos pusieron de manifiesto el uso satisfactorio de la extremidad elongada durante todo el estudio, así como su excelente recuperación funcional, sin afectar en ningún momento el bienestar de los animales. Radiológicamente, pudo observarse cómo la mineralización del callo de distracción comenzaba 2 semanas después de la intervención quirúrgica y tenía lugar de forma centrípeta, es decir, desde los fragmentos óseos originales hacia el centro del espacio interfragmentario. La consolidación completa del hueso neoformado ocurrió a las 14 semanas postquirúrgicas. Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de retrodispersión (BS-SEM) mostraron el origen principalmente medular y perióstico del callo de distracción, los cuales englobaban posteriormente el área intercortical. Asimismo, pudo observarse que durante la fase de distracción el frente de mineralización del callo de distracción se encontraba compuesto principalmente por tejido condroide, mientras que durante la fase de consolidación, el tejido predominante en esa región era el tejido cartilaginoso calcificado. A medida que se producía la

mineralización del callo neoformado, estos dos tejidos eran sustituidos sucesivamente por hueso fibrorreticular, lamelar y osteonal. Por todo ello, consideramos que el mecanismo de osificación del callo de distracción en nuestro estudio no es endocondral, sino más concretamente endocondroidal.

VIII.2.- ABSTRACT

The objectives of the present study were focused on the development of an external fixator and a bone distraction procedure, in order to allow an easy, effective and comfortable way of bone lengthening for the patient. The study of the progression of the regenerated tissues was also an important objective in this work. For these reasons, a non simultaneous, bilateral and middiaphyseal tibial osteotomy was performed in 12 dogs, which was stabilized by a unilateral external fixator. A latency period of 5 days and a rate of distraction of 0.5mm every 12 hours were applied for 10 days. Then, the external fixator was kept in place until complete bone healing was obtained. During the postoperative period, a clinical and radiological follow up were performed daily and bimonthly, respectively, until the animals were euthanized at 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 18 weeks after surgery. A postmortem study by means of Backscattered Scanning Electron Microscopy (BS-SEM) was done with non-decalcified bone samples.

The clinical results showed a satisfactory use of the limb during the whole study and an excellent limb function recovery, without affecting the well being of the patient. Radiologically, ossification of the distraction callus was observed 2 weeks after the surgical procedure, and it progressed in a centripetal way, from the original bone segments towards the middle of the callus. Complete healing of the regenerated bone took place at 14th week postoperatively. The images obtained by means of Backscattered Scanning Electron Microscopy (BS-SEM) showed how the distraction callus originated mainly from medullary and periosteal regions, which subsequently embraced the intercortical area. It could also be observed that during the distraction process, chondroid tissue was the main component of the mineralization front, while during the consolidation period it was the calcified cartilaginous tissue. Both tissues were finally replaced by woven, lamellar and osteonal bone, successively. The findings in this study allow us to consider the ossification mechanism of the distraction callus is not endochondral but endochondroidal.

IX.- BIBLIOGRAFIA

1. Aaron A. D., Eilert R. E.: Results of the Wagner and Ilizarov methods of limb lengthening. *Journal of Bone and Joint Surgery* 78-A (1): 20-29, 1996.
2. Aldegheri R., Trivella G., Lavini F.: Epiphyseal distraction. Hemichondrodiatasis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 241: 128-136, 1989a.
3. Aldegheri R., Renzi-Brivio L., Agostini S.: The callotasis method of limb lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 241: 137-145, 1989b.
4. Annefeld M., Caviezel R., Schacht E., Schicketanz K. H.: The Influence of ossein-hydroxyapatite compound ('Ossopan') on the healing of a bone defect. *Current Medical Research and Opinion* 10 (4): 241-250, 1986.
5. Apivatthakakul T., Arpornchayanon O.: Minimally invasive plate osteosynthesis (MIPO) combined with distraction osteogenesis in the treatment of bone defects. A new technique of bone transport: a report of two cases. *Injury* 33: 460-465, 2002.
6. Aronson J., Harrison B., Boyd C. M., *et al.*: Mechanical induction of osteogenesis: The importance of pin rigidity. *Journal of Pediatric Orthopaedics* 8 (4): 396-401, 1988.
7. Aronson J., Good B., Steward C., *et al.*: Preliminary studies of mineralization during distraction osteogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 250: 43-49, 1990.
8. Aronson J., Shen X.: Experimental healing of distraction osteogenesis comparing metaphyseal with diaphyseal sites. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 301: 25-30, 1994.
9. Aronson J.: Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 301: 124-131, 1994.
10. Aronson J., Hogue W. R., Flahiff C. M., *et al.*: Development of tensile strength during distraction osteogenesis in a rat model. *Journal of Orthopaedic Research* 19: 64-69, 2001a.
11. Aronson J., Gao G. G., Shen X. C., *et al.*: The effect of aging on distraction osteogenesis in the rat. *Journal of Orthopaedic Research* 19: 421-427, 2001b.
12. Arrien A., Cañadell J.: Open osteotomy versus percutaneous osteotomy in bone lengthening: Comparative study. Abstract of SIROT. IV. World Congress, Munich, 1987.
13. Baumann F., Harms J.: Der verlängerungsnagel. *Arch Orthop Unfallchir* 90: 139-146, 1977.
14. Baumgart R., Betz A., Schweiberer L.: A fully implantable motorized intramedullary nail for limb lengthening and bone transport. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 343: 135-143, 1997.
15. Brueton R. N., Brookes M., Heatley F. W.: The vascular repair of an experimental osteotomy held in an external fixator. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 257: 286-304, 1990.
16. Brunner U. H., Cordey J., Kessler S., *et al.*: Bone segment transport in combination with an intramedullary nail. *Injury* 24 (suppl 2): 29-44, 1993.
17. Caja V. L., Pizà G., Navarro A.: Hydroxyapatite coating of external fixation pins to decrease axial deformity during tibial lengthening for short stature. *Journal of Bone and Joint Surgery* 85A (8): 1527-1531, 2003.
18. Cañadell J., De Pablos J.: Correction of angular deformities by physeal distraction. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 283: 98-105, 1992.
19. Cañadell J.: Alargamiento de la extremidad inferior. *Avances en Traumatología, Cirugía, Rehabilitación, Medicina Preventiva y Deportiva* 24 (4): 245-252, 1994.

20. Carroll N. C., Grant C. G., Hudson R., *et al.*: Experimental observations on the effects of leg lengthening by the Wagner method. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 160: 250-257, 1981.
21. Cech O., Trc T.: Prof. Ilizarov and his contribution to the challenge of limb lengthening. *Injury* 24 (suppl 2): 2-8, 1993.
22. Codivilla A.: On the means of lengthening, in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 301: 4-9, 1994.
23. Cole J. D., Justin D., Kasparis T. *et al.*: The intramedullary skeletal kinetic distractor (ISKD): first clinical results of a new intramedullary nail for lengthening of the femur and tibia. *Injury* 32: 129-139, 2001.
24. Cross A. R., Lewis D. D., Murphy S. T., Rigaud S., *et al.*: Effects of ring diameter and wire tension on the axial biomechanics of four-ring circular external skeletal fixator constructs. *American Journal of Veterinary Research* 62 (7): 1025-1030, 2001.
25. Cross A. R., Budsberg S. C., Keefe T. J. : Kinetic gait analysis assessment of meloxicam efficacy in a sodium urate-induced synovitis model in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 58 (6): 626-631, 1997.
26. Cruz A. M., Hurtig M. B., Whiteside D. *et al.*: Mandibular lengthening in a juvenile camel by distraction osteogenesis. *Veterinary Compendium in Orthopaedics and Traumatology* 14: 156-160, 2001.
27. Cheng J. C. Y., Maffulli N., Sher A. *et al.*: Bone mineralization gradient at the callotasis site. *Journal of Orthopaedics Science* 7: 331-340, 2002.
28. Cheung L. K., Zhang Q.: Radiologic characterization of new bone generated from distraction after maxillary bone transport. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 96 (2): 234-242, 2003.
29. Dahl M. T., Gulli B., Berg T.: Complications of limb lengthening. A learning curve. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 301: 10-18, 1994.
30. De Bastiani G., Benzi L., Trivella G., Aldegheri R.: Limb lengthening by distraction of the epiphyseal plate. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 68-B (4): 545-549, 1986.
31. DeBastiani G., Aldegheri R., Renzi-Brivio L. *et al.*: Limb lengthening by callus distraction (Callotasis). *Journal of Pediatric Orthopedics* 7: 129-134, 1987.
32. Delloye C., Delefortrie G., Vicent A.: Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 250: 34-42, 1990.
33. Donath K.: Preparation of histologic sections by the cutting-grinding technique for hard tissue and other material not suitable to be sectioned by routine methods. Equipment and methodical performance. Norderstedt: Exact-Kulzer-Publication, 1988.
34. Donnan L. T., Saleh M., Rigby A. S. *et al.*: Radiographic assessment of bone formation in tibia during distraction osteogenesis. *Journal of Pediatric Orthopaedics* 22: 645-651, 2002.
35. Eldridge J. C., Bell D. F: Problems with substantial limb lengthening. *Orthopedic Clinics of North America* 22 (4): 625-631, 1991.
36. Elkins A. D., Morandi M., Zembo M: Distraction osteogenesis in the dog using the ilizarov external ring fixator. *Journal of the American Animal Hospital Association* 29: 419-426, 1993.

37. Eyres K. S., Bell M. J., Kanis J. A.: Methods of assessing new bone formation during limb lengthening. Ultrasonography, dual energy x-ray absorptiometry and radiography compared. *Journal of Bone and Joint Surgery* 75-B (3): 358-364, 1993.
38. Firth A. V., Haldane S. L: Development of a scale to evaluate postoperative pain in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214 (5): 651-659, 1999.
39. Fischgrund J., Paley D., Suter C: Variables affecting time to bone healing during limb lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 301: 31-37, 1994.
40. Fjeld T. O., Steen H: Limb lengthening by low rate epiphyseal distraction. An experimental study in the caprine tibia. *Journal of Orthopaedic Research* 6 (3): 360-368, 1988.
41. Fleming B, Paley D., Krestiansen T., Pope M: A Biomechanical analysis of the ilizarov external fixator. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 241: 95-105, 1989.
42. Forell E. B, Schwarz P. R: Use of external skeletal fixation for treatment of angular deformity secondary to premature distal ulnar physal closure. *Journal of the American Animal Hospital Association* 29: 460-476, 1993.
43. Franch J: Efecto de la implantación angulada o transversa con flexión de las agujas transfixiantes sobre la cicatrización de osteotomías tibiales en perro reducidas mediante fijadores externos. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, 1994.
44. Franch J., García F, Camón J., Manzanares M. C: Backscattered electron imaging of the calcified tissues present in bone healing. *Veterinary Compendium in Orthopaedics and Traumatology* 11: 105-111, 1998a.
45. Franch J., García F, Camón J., Manzanares M. C., *et al.*: Microangiographic pattern of bone healing in canine tibial osteotomies treated with Type II. external fixators. *Veterinary Compendium in Orthopaedics and Traumatology* 11: 118-124, 1998b.
46. Frierson M., Ibrahim K., Boles M., Boté H., *et al.*: Distraction osteogenesis (a comparison of corticotomy techniques). *Clinical Orthopaedics and Related Research* 301: 19-24, 1994.
47. Ganey T. M., Klotch D. W., Sasse J., Ogden J. A., *et al.*: Basement membrane of blood vessels during distraction osteogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 301: 132-138, 1994.
48. García-Cimbrello E, Olsen B, Ruiz-Yagüe M., *et al.*: Ilizarov technique. Results and difficulties. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 283: 116-123, 1992.
49. Goldman H. M., Kindsvater J., Bromage T. G: Correlative light and backscattered electron microscopy of bone. Part I: Specimen preparation methods. *Scanning* 21 (1): 40-43, 1998.
50. Goldman H. M., Blayvas A, Boyde A, *et al.*: Correlative light and backscattered electron microscopy of bone. Part II: Automated image analysis. *Scanning* 22(6): 337-344, 2000.
51. Goodship A. E, Kenwright J: The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *Journal of Bone and Joint Surgery* 67-B (4): 650-655, 1985.
52. Goret-Nicaise M., Dhém A: Presence of chondroid tissue in the symphyseal region of the growing human mandible. *Acta Anatomica*. 113: 189-195, 1982.
53. Goret-Nicaise M: La croissance de la mandibule humaine: conception actuelle. Thesis, Université Catholique de Louvain, 1986.
54. Goret-Nicaise M., Manzanares M. C., Bulpa P., *et al.*: Calcified tissues involved in the ontogenesis of the human cranial vault. *Anatomy and Embriology* 178 (5): 399-406, 1988.

55. Green S. A: Complications of external skeletal fixation. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 180: 109-116, 1983.
56. Green S. A: The Ilizarov method: Rancho technique. *Orthopedic Clinics of North America* 22 (4): 677-688, 1991a.
57. Green S. A: Postoperative management during limb lengthening. *Orthopedic Clinics of North America* 22 (4): 723-734, 1991b.
58. Green S. A: Skeletal defects (A comparison of bone grafting and bone transport for segmental skeletal defects). *Clinical Orthopaedics and Related Research* 301: 111-117, 1994.
59. Green S. A, Horton E, Baker M., *et al.*: Distraction of skeletal muscle: Evolution of a rat model. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 403-S: 126-132, 2002.
60. Guarniero R., Barros T. E. P: Femoral lengthening by the Wagner method. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 250: 155-159, 1990.
61. Guichet J. M., Deromedis B, Donnan L. T., *et al.*: Gradual femoral lengthening with the Albizzia intramedullary nail. *Journal of Bone and Joint Surgery* 85-A (5): 838-848, 2003.
62. Hamanishi C., Yoshii T., Totani Y., Tanaka S: Bone mineral density of lengthening rabbit tibia is enhanced by transplantation of fresh autologous bone marrow cells. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 303: 250-255, 1994.
63. Hamanishi C., Yoshii T., Totani Y., Tanaka S: Lengthening Callus Activated by Axial Shortening. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 307: 250-254, 1994.
64. Hancock R. B., Cook J. L., Tomlison J. L.: Distraction osteogenesis for treatment of premature physal closure and shortening of the third and fourth metatarsals of a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 39: 97-102, 2003.
65. Hellyer P. W., Gaynor J. S.: Acute postsurgical pain in dogs and cats. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian (Small Animal)* 20 (2): 140-153, 1998.
66. Holton L., Reid J., Scott EM. *et al.*: Development of a behaviour-based scale to measure acute pain in dogs. *Veterinary Record* 148: 525-531, 2001.
67. Hughes T. H., Maffukli N., Green V., Fixsen J. A: Imaging in Bone Lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 308: 50-53, 1994.
68. Hung S. C., Kurokawa T., Nakamura K., Matsushita T., *et al.*: Narrowing of the joint space of the hip after traumatic shortening of the femur. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 78-B (5): 718-721, 1996.
69. Hyodo A., Kotschi H., Kambic H. *et al.*: Bone transport using intramedullary fixation and a single flexible traction cable. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 325: 256-268, 1996.
70. Ilizarov G. A., Pereslytskikh P. F.: Regeneratsiia kostna tkani diafiza pri udlinenii posle zakrytoi napravlennoi kosoi lil vintoo obraznoi osteokazii. *Vestn Khir* 119: 89-93, 1977.
71. Ilizarov G. A.: Personal communication. 1988.
72. Ilizarov G. A.: The Tension-Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues (part I: The Influence of Stability of Fixation and Soft-Tissue Preservation). *Clinical Orthopaedics and Related Research* 23: 249-281, 1989a.
73. Ilizarov G. A.: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues (Part II: the influence of the rate and frequency of distraction. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 239: 263-285, 1989b.

74. Ilizarov G. A.: Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 250: 8-26, 1990.
75. Ilizarov G. A.: Transosseous osteosynthesis. Theoretical and clinical aspects of the regeneration and growth of tissue. Ed Ilizarov G. A, Green S. A, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 1992.
76. Ippolito E., Peretti G., Bellocchi M., Farsetti P., *et al.*: Histology and ultrastructure of arteries, veins, and peripheral nerves during limb lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 308: 54-62, 1994.
77. Johnson A. L., Kneller S. K., Weigel R. M.: Radial and tibial fracture repair with external skeletal fixation. Effects of fracture type, reduction, and complications on healing. *Veterinary Surgery* 18 (5): 367-372, 1989.
78. Karger C., Guille J. T., Bowen J. R.: Lengthening of Congenital Lower Limb Deficiencies. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 291: 236-245, 1993.
79. Kawamura B., Hosono S., Takahashi T. *et al.*: Limb lengthening by means of subcutaneous osteotomy. Experimental and clinical studies. *Journal of Bone and Joint Surgery (Am)* 50-A (5): 851-878, 1968.
80. Kenwright J., White S. H.: A historical review of limb lengthening and bone transport. *Injury* 24 (suppl 2): 9-19, 1993.
81. Kessler P. A., Merten H. A., Neukam F. W., *et al.*: The effects of magnitude and frequency of distraction forces on tissue regeneration in distraction osteogenesis of the mandible. *Plastic and Reconstructive Surgery* 109(1): 171-180, 2002.
82. Knecht C. D., Bloomberg M. S.: Distraction with an external fixation clamp (Charnely apparatus) to maintain length in premature physal closure. *Journal of the American Animal Hospital Association* 16:873-880,1980.
83. Kojimoto H., Yasui N., Goto T., Matsud A. S., *et al.*: Bone Lengthening in Rabbits by Callus Distraction. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 70-B (4): 543-549,1988.
84. Kolbeck S., Bail H., Weiler A. *et al.*: Digital radiography: A predictor of regenerate bone stiffness in distraction osteogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 366: 221-228, 1999.
85. Langley-Hobbs S. J., Carmichael S., Pead M. J. *et al.*: Management of antebrachial deformity and shortening secondary to a synostosis in a dog. *Journal of Small Animal Practice* 37: 359-363, 1996.
86. Lee D. Y., Choi I. H., Chung C. Y., Chung P. H., *et al.*: Effect of tibial lengthening on the gastrocnemius muscle. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 64: 688-692, 1993.
87. Lehman W. B., Grant A. D., Atar D.: Preventing and overcoming equinus contractures during lengthening of the tibia. *Orthopedic Clinics of North America* 22(4): 633-641, 1991.
88. Lengelé B.: Le tissu chondroïde dans le squelette en croissance, Chapitre III: Signification fonctionnelle du tissu chondroïde et des cartilages secondaires. Thesis. Université Catholique de Louvain, 1996.
89. Lesser A. S.: Segmental bone transport for the treatment of bone deficits. *Journal of the American Animal Hospital Association* 30: 322-330, 1994.
90. Lesser A. S.: Ilizarov technique. In: *Current techniques in small animal surgery* Ed Bojrab M. J., Ellison G. W., Slocum B., 4th Ed. Williams & Wilkins, 950-963, Philadelphia: 1998.

91. Lewis D. D., Bronson D. G.: Effect of individual components on the axial stiffness of single ring IMEX. Circular External Skeletal System Constructs. *Veterinary Compendium in Orthopaedics and Traumatology* 10: 80, 1997.
92. Lewis D. D., Bronson D. G., Samchukov M. L., Welch R. D., *et al.*: Biomechanics of circular external skeletal fixation. *Veterinary Surgery* 27: 454-464, 1998.
93. Lewis D. D., Radasch R. M., Beale B. S., Stallings J. T., *et al.*: Initial clinical experience with the IMEX[™] circular external skeletal fixation system (Part II: Use in bone lengthening and correction of angular and rotational deformities). *Veterinary Compendium in Orthopaedics and Traumatology* 12: 118-127, 1999.
94. Lewis D. D., Bronson D. G., Cross A. R., Welch R. D., *et al.*: Axial characteristics of circular external skeletal fixador single ring constructs. *Veterinary Surgery* 30: 386-394, 2001.
95. Lindsey C. A., Makarov M. R., Shoemaker S., *et al.*: The effect of the amount of limb lengthening on skeletal muscle. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 402: 278-287, 2002.
96. Maffulli N., Hughes T., Fixsen J. A.: Ultrasonographic monitoring of limb lengthening. *Journal of Bone and Joint Surgery* 74-B (1): 130-132, 1992.
97. Maffulli N., Cheng J. C. Y., Sher A., *et al.*: Bone mineralization at the callotasis site after completion of lengthening. *Bone* 25(3): 333-338, 1999.
98. Makarov M. R., Kochutina L. N., Samchukov M. L. *et al.*: Effect of rhythm and level of distraction on muscle structure. An animal study. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 384: 250-264, 2001.
99. Manzanares M. C., Goret-Nicaise M., Dhem A.: Metopic sutural closure in the human skull. *Journal of Anatomy* 161: 203-215, 1988.
100. Manzanares M. C., Calero M. I., Franch J., Jimenez M. P., *et al.*: Optimisation of a scheduled study for undecalcified samples. *Microscopy and Analysis* Nov: 31-33, 1997.
101. Marcellin-Little D. J., Ferretti A., Roe S. C., DeYoung J. C.: Hinged Ilizarov external fixation for correction of antebrachial deformities. *Veterinary Surgery* 27: 231-245, 1998.
102. Meffert R. H., Inoue N., Tis J. E., *et al.*: Distraction osteogenesis after acute limb shortening for segmental tibial defects. *Journal of Bone and Joint Surgery* 82-A (6): 799-808, 2000.
103. Minty T., Maffulli N., Hughes T. H., Shaw D. G., Fixsen J. A.: Radiographic Features of Limb Lengthening in Children. *Acta Radiologica* 35: 555-559, 1994.
104. Mizumoto Y., Mizuta H., Nakamura E., Takagi K.: Tibial nerve function during tibial lengthening. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 66: 275-277, 1995.
105. Monticelli G., Spinelli R., Bonucci E.: Distraction epiphysiolysis as a method of limb lengthening. II. Morphologic investigations. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 154: 262-273, 1981.
106. Monticelli G., Spinelli R.: Distraction epiphysiolysis as a method of limb lengthening. III. Clinical applications. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 154: 274-285, 1981.
107. Morton D. B., Griffiths P. H. M.: Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and a hypothesis for assessment. *Veterinary Record* 116: 431-436, 1985.
108. Muhonen A., Muhonen J., Lindholm T. C. *et al.*: Osteodistraction of a previously irradiated mandible with or without adjunctive hiperbaric oxygenation: An experimental study in rabbits. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 31: 519-524, 2002.

109. Muir P., Markel M. D., Bogdanske J. J., *et al.*: Dual-energy X-ray absorptiometry and force-plate analysis of gait in dogs with healed femora after leg-lengthening plate fixation. *Veterinary Surgery* 24: 15-24, 1995.
110. Orbay J. L., Frankel V. H., Finkle J. E., *et al.*: Canine leg lengthening by the Ilizarov technique. A biomechanical, radiologic, and morphologic study. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 278: 265-273, 1992.
111. Pacicca D. M., Moore D. C., Ehrlich M. G.: Physiologic weight-bearing and consolidation of new bone in a rat model of distraction osteogenesis. *Journal of Pediatric Orthopaedics* 22(5): 652-659, 2002.
112. Paley D., Fleming B., Catagni M., *et al.*: Mechanical evaluation of external fixators used in limb lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 250: 50-57, 1990.
113. Paley D.: Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 250: 81-104, 1990.
114. Paley D., Tetsworth K.: Percutaneous osteotomies. Osteotome and Gigli saw techniques. *Orthopedic Clinics of North America* 22 (4): 613-624, 1991.
115. Paley D., Herzenberg J. E., Paremian G., *et al.*: Femoral lengthening over an intramedullary nail, *Journal of Bone and Joint Surgery*. 79-A (10): 1464-1480, 1997.
116. Paterson D.: Leg-Lengthening Procedures. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 250: 27-33, 1990.
117. Pedersen N. C., Morgan J. P., Vasseur P. B.: Joint diseases of dogs and cats. In "Textbook of Veterinary Internal Medicine", 5th Edition. Ed: Ettinger S. J., Feldman E. C.; W. B. Saunders, Philadelphia, 1862-1885, 2000.
118. Piermattei D. L., Flo G. L.: Correction of abnormal bone growth and healing. In "Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair", 3rd Edition. Ed: Brinker, Piermattei D. L., Flo G. L.; W.B. Saunders Company, Philadelphia, 686-712, 1997.
119. Preston C. A.: Distraction osteogenesis to treat premature distal radial growth plate closure in a dog. *Australian Veterinary Journal* 78(6): 387-391, 2000.
120. Price C. T., Mann J. W.: Experience with the Orthofix device for limb lengthening. *Orthopedic Clinics of North America* 22(4): 651-661, 1991.
121. Putti V.: The operative lengthening of the femur. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 250: 4-7, 1990.
122. Rachmiel A., Rozen N., Peled M., *et al.*: Characterization of midface maxillary membranous bone formation during distraction osteogenesis. *Plastic and Reconstructive Surgery* 109 (5): 1611-1620, 2002.
123. Rahal S. C., Volpi R. S., Vulcano L. C. *et al.*: Acute shortening and subsequent lengthening of the radius and ulna for the treatment of an infected nonunion in a dog. *Canadian Veterinary Journal* 42: 724-726, 2001.
124. Rahn B. A.: Bone healing: Histologic and physiologic concepts. In "Bone in Clinical Orthopaedics. A study in comparative osteology" Ed Sumner-Smith G., W.B. Saunders Company, 335-386, 1982.
125. Raschke M., Oedekoven G., Ficke J. *et al.*: The monorail method for segment bone transport. *Injury* 24 (suppl 2): 54-61, 1993.

126. Reichel H., Haunschild M., Krüger T., Hein W.: Tibial lengthening (Epiphyseal and callus distraction compared in 39 patients with 3-14 years follow-up). *Acta Orthopaedica Scandinavica* 67: 355-358, 1996.
127. Rever L. J., Manson P. N., Randolph M. A., Yaremchuck M. J.: The healing of facial bone fractures by the process of secondary union. *Plastic and Reconstructive Surgery* 87(3): 451-458, 1991.
128. Rhinelander F. W., Steward C. L., Wilson J. W.: Bone vascular supply. In "Skeletal Research: An experimental approach". Ed Simmons D. L., Kunin A. S. , Academic Press Inc., New York, 367-395, 1979.
129. Rhinelander F. W., Wilson J. W.: Blood supply to developing mature, and healing bone. In "Bone in Clinical Orthopaedics. A study in comparative osteology". Ed Sumner-Smith G., W.B. Saunders Company, 81-158, 1982.
130. Richards M., Kozloff K. M., Goulet J. A., *et al.*: Increased distraction rates influence precursor tissue composition without affecting bone regeneration. *Journal of Bone and Mineral Research* 15 (5): 982-989, 2000.
131. Robertson J. J.: Application of a modified Kirschner device in the distraction mode as a prevention of antebrachial deformities in early physal closure. *Journal of the American Animal Hospital Association* 19: 345-351, 1983.
132. Samchukov M. L., Cherkashin A. M., Cope J. B.: Distraction osteogenesis: Origins and evolution. In "Distraction osteogenesis and tissue engineering". Ed: McNamara J. A. & Trotman C. A., Center for Human Growth and Development, The University of Michigan, Anna Harbor, 1-35, 1998.
133. Shirai H., Abe M., Nagaoka T., Onomura T.: Appropriate osteotomy site and number in limb lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 336: 308-317, 1997.
134. Simpson A. H. R. W., Williams P. E., Kyberd P., Goldspink G., *et al.*: The Response of Muscle to Leg Lengthening. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 77-B (4): 630-636, 1995.
135. Slätis P., Karaharju E., Holmström T., Ahonen J., Paavolainen P. *et al.*: Structural changes in intact tubular bone after application of rigid plates with and without compression. *Journal of Bone and Joint Surgery* 60-A (4): 516-522, 1978.
136. Stallings J. T., Lewis D. D., Welch R. D., Samchukov M., *et al.*: An introduction to distraction osteogenesis and the principles of the Ilizarov method. *Veterinary Compendium in Orthopaedics and Traumatology* 11: 59-67, 1998.
137. Stanitski D. F.: The effect of limb lengthening on articular cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 301: 68-72, 1994.
138. Steen H., Fjeld T. O.: Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 247: 297-305, 1989.
139. Stefko R. M., Cain J. E., Lauerman W. C., Brann C., *et al.*: Vertebrodiastasis experimental lengthening of the juvenile goat spine. *Spine* 18 (12): 1616-1620, 1993.
140. Stein H., Cordey J., Perren S. M.: Segment transport for the biological reconstruction of bone defects. An overview. *Injury* 24 (suppl 2): 20-28, 1993.
141. Stuart A. J., Smith D. A.: Use of the fluorochromes Xylenol Orange, Calcein Green, and Tetracycline to document bone deposition and remodeling in healing fractures in chickens. *Avian Diseases* 36: 447-449, 1992.

142. Szentimrey D., Fowler D., Johnston G., Wilkinson A.: Transplantation of the canine distal ulna as a free vascularized bone graft. *Veterinary Surgery* 24: 215-225, 1995.
143. Thrall D. E., Widmer W. R.: Radiation physics, radiation protection, and darkroom theory. In "Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology", fourth Edition. Ed Schrefler J., Kersey R., LeMelledo D., W. B. Saunders Company, 1-19, 2002.
144. Trivella P. G., Brigadoi F., Aldegheri R.: Leg lengthening in Turner Dwarfism. *Journal of Bone and Joint Surgery* 78-B (2): 290-293, 1996.
145. Troulis M. J., Coppe C., O'Neill M. J. *et al.*: Ultrasound: Assessment of the distraction osteogenesis wound in patients undergoing mandibular lengthening. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 61: 1144-1149, 2003.
146. Tsuchiya H., Tomita K., Minematsu K. *et al.*: Limb salvage using distraction osteogenesis. A classification of the technique, *Journal of Bone and Joint Surgery* 79-B (3): 403-411, 1997.
147. Vade A., Eissenstat R.: Radiographic features of bone lengthening procedures. *Radiology* 174 (2): 531-537, 1990.
148. Wagner H.: Operative lengthening of the femur. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 136: 125-142, 1978.
149. Walsh W. R., Hamdy R. C., Ehrlich M. G.: Biomechanical and physical properties of lengthened bone in a canine model. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 306: 230-238, 1994.
150. Weigel J. P.: Bone Grafting. In "Disease mechanisms in Small Animal Surgery. 2nd Ed. Ed: Bojrab M. J., Lippincott Williams & Wilkin. Philadelphia, 1993.
151. Welch R. D., Birch J. G., Makarov M. R., Samchukov M. L.: Histomorphometry of distraction osteogenesis in a caprine tibial lengthening model. *Journal of Bone and Mineral Research* 13 (1): 1-9, 1998.
152. Welch R. D., Lewis D. D.: Distraction Osteogenesis. *Veterinary Clinics of North America: Small animal Practice* 29: 1187-1205, 1999.
153. White S. H., Sci B. M., Kenwright J.: The importance of delay in distraction of osteotomies. *Orthopedic Clinics of North America* 22 (4): 569-578, 1991.
154. Wiedemann M.: Callus distraction: A new method? A historical review of limb lengthening. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 327: 291-304, 1996.
155. Williams P., Simpson H., Kenwright J. *et al.*: Muscle fibre damage and regeneration resulting from surgical limb distraction. *Cells Tissues Organs* 169: 395-400, 2001.
156. Witt AN., Jäger M.: Die operative Oberschenkelverlängerung mit einem vollimplantierbaren distaktionsgerät. *Arch Orthop Unfallchir* 92: 291-296, 1978.
157. Yagishita H., Iwatsubo S., Aoba T.: Confocal laser scanning microscopic studies on alveolar bone remodeling with orthodontic tooth movement and retention. *Scanning Microscopy* 9 (3): 781-788, 1995.
158. Yanoff S. R., Hulse D. A., Palmer R. H., Herron M. R.: Distraction osteogenesis using modified external fixation devices in five dogs. *Veterinary Surgery* 22: 480-487, 1992.
159. Yasui N., Kojimoto H., Shimizu H., Shimomura Y.: The effect of distraction upon bone, muscle, and periosteum. *Orthopedic Clinics of North America* 22 (4): 563-567, 1991.
160. Yasui N., Sato M., Ochi T. *et al.*: Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *Journal of Bone and Joint Surgery (Br)* 79 (5): 824-830, 1997.

161. Young J. W. R., Kovelman H., Resnik C. S. *et al.*: Radiologic assessment of bones after Ilizarov procedures. *Radiology* 177 (1): 89-93, 1990.
162. Zembo M. M., Heinrich S. D., Elkins D. *et al.*: Radiographic analysis of regenerate bone formation following tibial distraction osteosynthesis by the method of Ilizarov with a circular external fixator in a canine model. *Proceeding of the 13th International Conference of Hoffmann External Fixation, Mayo Clinic* 21, 1989.