



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



Universitat Autònoma de Barcelona  
Facultat de Medicina  
Departament de Cirurgia

---

# Análisis de la revascularización de injertos estructurales masivos de hueso criopreservado mediante periostio vascularizado en modelo de conejo

---

Memoria presentada por:

DAVID BARASTEGUI FERNÁNDEZ  
para la obtención del grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Tutor y Director:

- Prof. Joan Nardi Vilardaga

Co-Directores:

- Dr. Francisco Soldado Carrera
- Dr. Cesar Galo García Fontecha

Barcelona, Junio 2017



## AGRADECIMIENTOS

- Al **Hospital Universitari Vall d'Hebrón** (HUVH), al **Institut de Recerca Vall d'Hebrón** (VHIR) i a la **Universitat Autònoma de Barcelona** (UAB) por su confianza y colaboración en esta investigación.
- A la **Fundación Mutua Madrileña** por creer en este proyecto y por el apoyo económico en la realización de los trabajos de experimentación.
- Al Prof. **Joan Nardi** por su colaboración, tutorización y soporte en la realización de este trabajo.
- Al Prof. **Enric Cáceres** por su orientación y apoyo a sus alumnos para la investigación.
- Al Dr. **Francisco "Xesco" Soldado**, por muchas cosas, sobretodo por guiarme en el inicio, desarrollo y finalización de este trabajo, por sus ideas, su genialidad, por su motivación, por su amistad.
- Al Dr. **Cesar G<sup>a</sup> Fontecha** por el soporte metodológico, por su control e ideas aportadas al proyecto y por facilitar la realización del proyecto en su grupo de investigación.
- A **Marta Rosal**, a **Marielle Esteves** y a **Carla Fonseca**, por su orientación, por su ayuda en la organización, por todas las mañanas y tardes de cirugías, porque probablemente sin ellas este trabajo no se hubiera realizado.
- A **Anna Server**, por su ayuda en el refinamiento del trabajo, por su interés y su ayuda en la anestesia de los animales.
- A **Sleiman Haddad** y **Gerardo Méndez** por su desinteresada y atenta colaboración y ayuda en las cirugías.



- Al Prof. **Manel Llusá**, por ser un referente, por su dedicación a la docencia y por todo lo que me ha enseñado.
- A la Dra. **Cleofé Romagosa** por su ayuda en la preparación de las muestras y su interés en el proyecto.
- A los chicos del Estabulario, **Ángel** y **Albert**, por su cariño, su dedicación y su ayuda en el cuidado del bienestar de los conejos.
- Al Dr. **Leo Rodríguez**, por su crucial apoyo en el estudio histológico final del trabajo.
- A mis compañeros de residencia, en especial al Dr. **Sergi Barrera**, por su grano de arena en la gestación de este trabajo; a mis adjuntos y aquellos que han jugado un papel fundamental en mi formación como cirujano ortopédico.
- A mis amigos y compañeros del Hospital General de Catalunya, por su apoyo y su comprensión.
- Al Dr. **Ramón Cugat** así como la **Fundación García Cugat** por darme la oportunidad de aprender junto a ellos y por su interés en la investigación biomédica.
- Al Dr. **Xavier Cuscó**, por su interés y dedicación, el artista que ha plasmado los dibujos de este trabajo.
- Al Prof. **Alfonso Blanco**, por mostrarnos su amor por la microscopia electrónica y el estudio celular y por su desinteresada colaboración en las imágenes de microscopia electrónica del trabajo.
- A mis compañeros de trabajo, en especial a la futura Dra. **Eila Rivera**, por su ayuda y motivación para finalizar esta obra.
- A mi familia, pues soy lo que soy gracias a ellos

Para Vane y Olivia, mis niñas

“Vive como si fueras a morir mañana. Aprende como si fueras a vivir para siempre”

Mahatma Gandhi

“Si quieres que sucedan cosas distintas, deja de hacer siempre lo mismo”

Albert Einstein



## FINANCIACIÓN

- BECAS FUNDACION MUTUA MADRILEÑA
  - Año 2012 (2 años periodo 2012-14)
  - Investigador principal: Francisco Soldado Carrera
  - Investigadores asociados:
    - David Barastegui Fernández
    - Cesar Galo García Fontecha
    - Marielle Esteves
  - Dotación: 12.000 €



## COLABORACIONES

HOSPITAL VALL D'HEBRÓN – VHIR (VALL D'HEBRÓN INSTITUT DE RECERCA) - Estabulario



FUNDACIÓN GARCÍA CUGAT



HOSPITAL CLÍNIC I PROVINCIAL DE BARCELONA  
(Servicio de Anatomía Patológica)



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
(Unidad Microscopia Electrónica –  
Facultad de Veterinaria)



### TRABAJOS PUBLICADOS DERIVADOS DE ESTE ESTUDIO:

An ultrasound-guided technique for axillary brachial plexus nerve block in rabbits. Fonseca C, Server A, Esteves M, Barastegui D, Rosal M, Fontecha CG, Soldado F. *Lab Anim (NY)*. 2015 Apr 21; 44(5): 179-84.



# Índice



## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>2.1. Hueso y periostio.....</b>   | <b>22</b> |
| 2.1.1. Recuerdo anatómico, funciones y fisiología ósea.....                          | 22        |
| 2.1.2. Formación y regeneración ósea.....  | 30        |
| 2.1.3. Características y propiedades periostio.....                                  | 35        |
| <b>2.2. Resecciones óseas masivas.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>2.3. Tumores óseos malignos.....</b>  | <b>39</b> |
| 2.3.1. Generalidades, factores de riesgo y epidemiología.....                        | 39        |
| 2.3.2. Aproximación diagnóstica.....   | 45        |
| <b>2.4. Tratamiento de los tumores óseos<br/>        malignos.....</b>               | <b>50</b> |
| 2.4.1. Terapias no quirúrgicas.....  | 50        |
| 2.4.2. Principios generales del tratamiento quirúrgico de los<br>sarcomas óseos..... | 52        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.4.3. Técnicas de reconstrucción.....           | 55        |
| 2.4.3.1. Megaprótesis.....                       | 56        |
| 2.4.3.2. Injertos estructurales.....             | 59        |
| 2.4.3.3. Reconstrucciones biológicas.....        | 62        |
| <br>   |           |
| <b>3. HIPOTESIS DE TRABAJO.....</b>              | <b>67</b> |
| <br>   |           |
| <b>4. OBJETIVOS DE LA TESIS.....</b>             | <b>71</b> |
| <br>   |           |
| <b>5. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>                | <b>75</b> |
| <br>   |           |
| <b>5.1. Material.....</b>                        | <b>76</b> |
| 5.1.1. Animal.....                               | 76        |
| 5.1.2. Instalaciones.....                        | 77        |
| 5.1.3. <i>Instrumental para la cirugía</i> ..... | 78        |
| 5.1.4. <i>Material complementario</i> .....      | 81        |
| <br>   |           |
| <b>5.2. Métodos.....</b>                         | <b>83</b> |
| 5.2.1. Cuidados preoperatorios.....              | 83        |
| 5.2.2. Técnicas de anestesia.....                | 83        |
| 5.2.3. <i>Preparación campo quirúrgico</i> ..... | 85        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.2.4. Técnica quirúrgica.....  | 85         |
| 5.2.5. Cuidados postoperatorios, evaluación y seguimiento.....  | 91         |
| 5.2.6. Protocolo de eutanasia y obtención de muestras.....  | 93         |
| 5.2.7. Anatomía patológica.....   | 95         |
| 5.2.8. Análisis estadístico.....  | 97         |
| 5.2.9. Distribución de los sujetos.....   | 98         |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>   | <b>103</b> |
| 6.1. Estudio piloto.....  | 104        |
| 6.2. Resultados estudio revascularización de<br>aloinjertos criopreservados estructurales con<br>periostio vascularizado..... | 111        |
| 6.2.1. Análisis de resultados Grupo control (GC).....   | 111        |
| 6.2.1.1. Supervivencia/Mortalidad.....  | 116        |
| 6.2.1.2. Análisis radiológico.....  | 119        |
| 6.2.1.3. Análisis macroscópico.....   | 125        |
| 6.2.1.4. Estudio histoanatomopatológico.....  | 133        |

|  |            |
|--|------------|
| 6.2.1.5. Hallazgos Grupo Control.....  | 138        |
| 6.2.2. Análisis resultados Grupo periostio (GP).....   | 141        |
| 6.2.2.1. Supervivencia/Mortalidad.....   | 146        |
| 6.2.2.2. Análisis radiológico.....   | 149        |
| 6.2.2.3. Análisis macroscópico.....  | 156        |
| 6.2.2.4. Estudio histoanatomopatológico.....   | 164        |
| 6.2.2.5. Hallazgos Grupo Periostio.....  | 170        |
| 6.2.3 Comparativa de ambos grupos.....   | 173        |
| 6.2.3.1 Revascularización del injerto criopreservado.....  | 180        |
| <b>7 DISCUSIÓN.....</b>  | <b>189</b> |
| 7.1. Modelo experimental de reconstrucción de grandes defectos óseos y reconstrucción con aloinjertos y periostio vascularizado..... | 190        |
| 7.1.1 Elección del animal a estudio.....   | 195        |

|  |            |
|--|------------|
| 7.1.2. Elección del protocolo de obtención de muestras.....                    | 196        |
| 7.1.3. Evaluación del modelo animal.....                                       | 198        |
| <b>7.2 Viabilidad de la técnica quirúrgica y los resultados obtenidos.....</b> | <b>202</b> |
| 7.2.1. Limitaciones del estudio.....   | 205        |
| 7.2.2. Aplicación clínica de los resultados obtenidos.....                     | 207        |
| <b>8. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>211</b> |
| <b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                      | <b>215</b> |

# 1.- Justificación del trabajo

## 1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La reconstrucción de grandes defectos óseos en huesos largos es un problema quirúrgico complejo<sup>1</sup>. Éstos pueden ocurrir tras traumatismos, osteomielitis o más frecuentemente tras la exéresis de sarcomas óseos.

La sustitución del defecto óseo con injertos masivos de hueso criopreservado (IMHC) es la opción de tratamiento habitual en defectos de huesos largos de las extremidades inferiores tras la resección tumoral<sup>1-3</sup>. El IMHC es una estructura acelular formada por el componente mineral y extracelular del hueso previamente tratado para evitar problemas de rechazo por histocompatibilidad entre huésped y donante.

Debido a su condición de estructura avascular, su uso conlleva un alto porcentaje de complicaciones siendo las más frecuentes: la no unión en la interfase injerto-huésped (15 -34%), la fractura del injerto óseo (27-54%) y la infección (12 al 16%)<sup>4-7</sup>. El 50% de los injertos masivos infectados derivan en una amputación de la extremidad. Por otro lado, estos pacientes requieren el uso de soporte ortopédico externo o muletas de descarga de forma permanente puesto que los IMHC no se integran y no adquieren la resistencia fisiológica del hueso sano. El resultado es una limitación relevante de la calidad de vida y de la capacidad de desarrollo de las actividades diarias.

La asociación de un injerto de peroné vascularizado (IPV) al IMHC, disminuye la tasa de complicaciones <sup>8-11</sup> con un descenso sustancial de la tasa de no unión del injerto estructural en resecciones tumorales (34% al 8,8% de no uniones)<sup>8</sup>. Se ha estimado que en la población pediátrica, el peroné vascularizado consolida en un tiempo medio de 5.4 meses y el aloinjerto se integra a los 19.1 meses <sup>12,13</sup>.

Recientemente en 2012, el equipo del Dr. Soldado ha descrito la asociación de un injerto de periostio vascularizado de peroné al IHMC en la población pediátrica<sup>14</sup>. El periostio en el niño es grueso, facilitando su obtención quirúrgica, y además presenta un gran potencial osteogénico. En

nuestra técnica, la capa osteogénica, rica en células madre mesenquimales), tapiza el injerto y potencia su unión ósea consiguiendo una integración del mismo. En términos de unión ósea, nuestra técnica, ha disminuido sustantivamente los tiempos de integración del IHMC con tiempos medios de 2,8 meses en interfases metafisarias y 7.1 meses en diafisarias<sup>14,15</sup>. Postulamos que el mecanismo por el cual la transferencia de un tejido



Figura 1. Injerto de periostio vascularizado libre. Cortesía del Dr. Soldado (www.cirurgiamanoinfantil.com)

vascularizado rico en células madre consigue la unión e integración de IMHC es la revascularización del mismo.

Se ha descrito un modelo animal que analiza la capacidad del periostio de potenciar la unión de aloinjerto en hueso de osificación endomembranosa (costilla)<sup>16</sup>. Sin embargo, no se ha descrito el estudio de los mecanismos de integración de injertos óseos estructurales por el periostio vascularizado, el análisis de los mecanismos de revascularización y el estudio de colonización y transformación de las células madre en osteocitos.

Este trabajo pues, propone un estudio en modelo de conejo con fisis abiertas (a semejanza de la edad pediátrica humana) para analizar el efecto del aporte de autoinjerto de periostio vascularizado a los mecanismos de consolidación, revascularización y revitalización de injertos masivos de hueso criopreservado (IMHC) en el tratamiento de las reconstrucciones de grandes defectos óseos.





## 2.- Introducción

## 2.- INTRODUCCIÓN

### 2.1. Hueso y periostio

#### 2.1.1. Recuerdo anatómico, funciones y fisiología ósea

El hueso se define como cada uno de los órganos de estructura firme, dura y resistente que forman el esqueleto de los vertebrados. Como todos los órganos esta formado de diferentes tejidos que lo estructuran y le permiten realizar las funciones que tiene designadas<sup>17</sup>.

El principal tejido que forma el hueso estructuralmente es el tejido óseo, un tejido conectivo altamente especializado compuesto por una matriz de colágeno y material extracelular calcificado regulada por el componente celular (osteocitos y osteoclastos)<sup>18</sup>. Este tejido se caracteriza por su rigidez y gran resistencia a las fuerzas mecánicas, tanto de tracción como de compresión.

Otros dos tejidos claves en las funciones del hueso son el tejido condral y el tejido perióstico (del que luego hablaremos en mas detalle), tejidos conectivos que se han especializado en aportar capacidad de amortiguación y protección y fuente de regeneración y regularización del componente óseo respectivamente (figura 2).

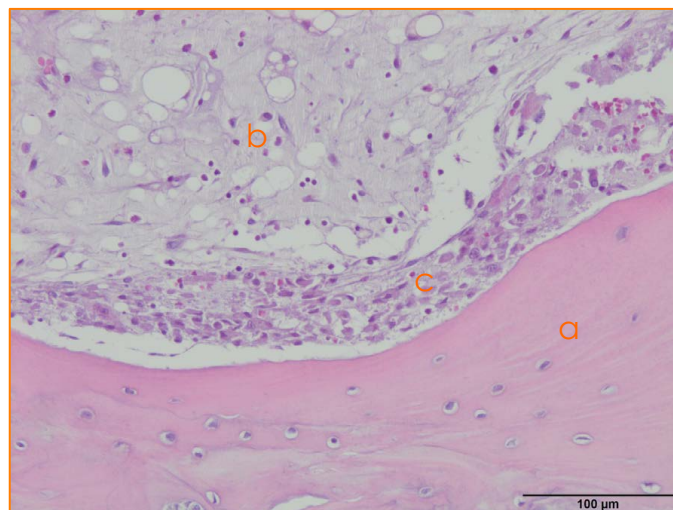


Figura 2. Muestra de tejido óseo cortical (a) y membrana perióstica con sus dos capas diferenciadas: fibrosa externa (b) y capa cambium (interna) (c)

Además de los tejidos conectivos especializados propios del hueso, éste también posee tejidos blandos tanto nervioso, vascular endotelial, adiposo y hematopoyético que cumplen diversas funciones tanto a nivel local en el órgano como a nivel sistémico.

El hueso como órgano cumple con diversas funciones esenciales para el organismo que pueden ser clasificadas según su función mecánica, metabólica o hematopoyética <sup>17-19</sup>:

a) Funciones mecánicas:

- Sustentación y soporte mecánico del organismo debido a su estructura y disposición.
- Protección de órganos, aparatos y sistemas vitales internos como los huesos del cráneo y el tórax.
- Movimiento dinámico del organismo, permitiendo la función de movilización de la musculatura y tendones a través del sistema de palancas que conforman.
- Otras funciones superespecializadas como la transmisión del sonido (cadena de osículos del oído medio)

b) Funciones metabólicas:

- Almacenamiento de minerales: Los huesos actúan como la reserva mineral más cuantiosa, sobretodo de calcio y fosforo del organismo.
- Almacenamiento de factores de crecimiento: La matriz ósea mineralizada contiene y segrega factores de crecimiento como el factor de crecimiento insulínico (IGF), el factor de crecimiento transformante beta TGF- $\beta$ , la proteína morfogenética ósea (BMP) y otros.
- Almacenamiento de energía: La medula ósea amarilla actúa como reservorio de ácidos grasos, importantes para la homeostasis energética.
- Equilibrio ácido-base: La absorción o liberación de sales alcalinas desde los huesos hacia la circulación amortigua los cambios excesivos en el pH sanguíneo.
- Función endocrina.
- Función inmunológica.

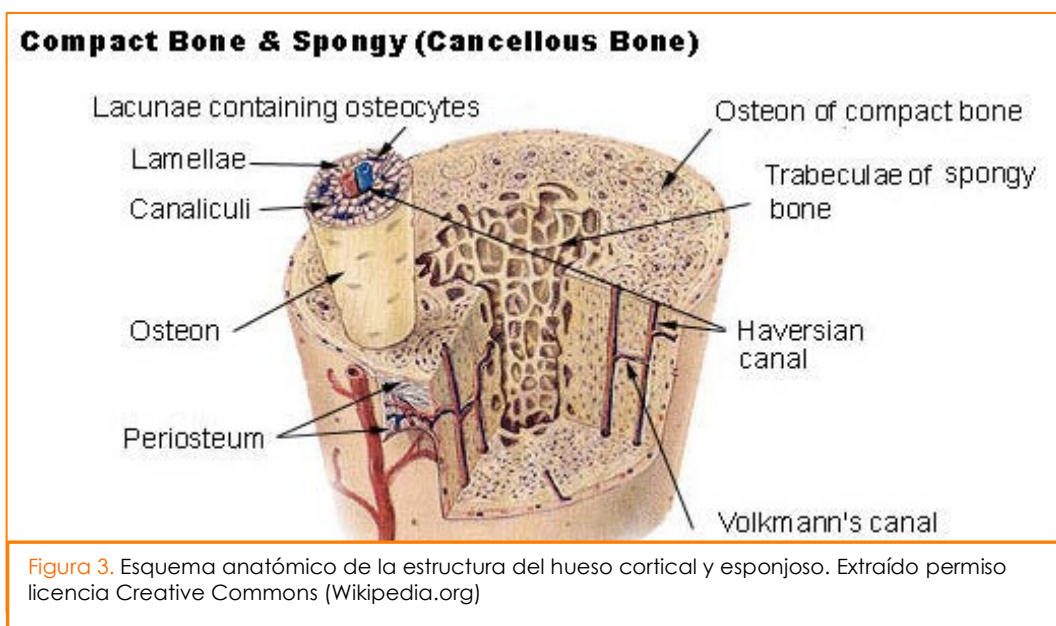
c) Función hematopoyética: A través del conjunto de la medula ósea roja se produce la proliferación y diferenciación de células progenitoras a las diferentes células sanguíneas.

Respecto a la anatomía de los huesos<sup>19-23</sup>, éstos posee zonas con diferente densidad de tejido óseo que se diferencian macroscópicamente y microscópicamente en áreas de hueso compacto y áreas de hueso esponjoso sin existir unos límites marcados entre ambos tipos de hueso, eso sí, existiendo una fase de transición de cada uno de ellos.

### Hueso compacto (cortical)

El hueso compacto o cortical se observa como una masa sólida, densa y continua cuya estructura se observa al microscopio óptico. Forma la cobertura externa del hueso y se diferencia anatómicamente dando las diferentes partes macroscópicas del hueso, la diáfisis central y en menor medida las dos metafisis y epifisis distal y proximal.

Al realizar el estudio microscópico (figura 3), se puede observar como el hueso cortical tiene su matriz ósea mineralizada depositada en laminillas, entre estas laminillas se ubican las lagunas óseas con las células formadoras de hueso (osteocitos). Así mismo desde cada laguna se irradian canalículos ramificados que permiten la comunicación entre lagunas óseas y son cruciales para la nutrición de los osteocitos ya que los osteocitos se encuentran rodeados de matriz mineralizada que no permite la difusión de nutrientes necesarios.



Estas lagunas óseas se reúnen concéntricamente alrededor de un canal longitudinal vascular llamado conducto de Havers, que contiene capilares que permiten la vascularización de las lagunas. La composición de las lagunas óseas situadas alrededor del conducto de Havers, con sus laminillas y el conducto de Havers forman la principal estructura funcional de tejido óseo llamada osteona o sistema haversiano.

Las osteonas se disponen de forma angular alrededor de los conductos de Havers separadas por un tejido intersticial llamado líneas de cemento (capa de matriz ósea pobre en fibras de colágeno sin elementos vasculares no traspasada por canaliculos).

Los canales haversianos comunican entre sí con la superficie o la cavidad medular por canales transversales u oblicuos llamados canales perforantes o de Volkmann que poseen vasos que vienen del periostio y del endostio más grandes que los de las osteonas que comunican entre ellas.

#### Hueso esponjoso (reticulado, trabecular)

El hueso esponjoso o trabecular se encuentra profundo en el interior de la cavidad formada por el hueso cortical. Estructuralmente no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando un entramado óseo que recuerda un andamiaje y reciben el nombre de trabéculas óseas. Este entramado forma una estructura esponjosa a modo de cavidades donde se ubica la medula ósea amarilla como roja. En el interior de las trabéculas del hueso esponjoso se encuentran los osteocitos y a diferencia del hueso cortical, ésta estructura esta mejor vascularizada, sin el compromiso de nutrientes para los osteocitos ya que los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos. El hueso esponjoso es constituyente de las del interior óseo diafisario y en mayor medida de las zonas metafisarias y epifisarias de los mismos.

Histológicamente el hueso posee dos componentes, el componente celular y la matriz, tanto orgánica como inorgánica. La matriz ósea se

encuentra en su mayor parte formada por la sustancia inorgánica y principalmente por fosfato cálcico presente en forma de cristales de hidroxiapatita que aparecen a intervalos regulados de 60 nm a 70 nm a lo largo de las fibras de colágeno. Dentro de la matriz inorgánica de los huesos también se encuentran las principales reservas de bicarbonato, fluoruro, magnesio y citrato y sodio entre otros oligoelementos.

La matriz orgánica es el menor componente de la matriz ósea pero el más importante pues es responsable de la estructura conformacional de la misma. La matriz orgánica está formada en un 90% por colágeno tipo I y el 10% restante lo compone la sustancia fundamental que posee una concentración menor de glucosaminoglucanos (GAG), que el cartílago (ácido hialurónico, condroitín sulfato, queratán sulfato), es una matriz acidófila (también en parte debido al colágeno). Posee proteínas exclusivas del hueso como la osteocalcina unida a la hidroxiapatita. La osteopontina también unida a la hidroxiapatita es similar a la fibronectina (figura 4).

Respecto al componente celular del hueso, se pueden diferenciar 4 tipos de células, las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos. Los tres primeros tipos son estadios funcionales de

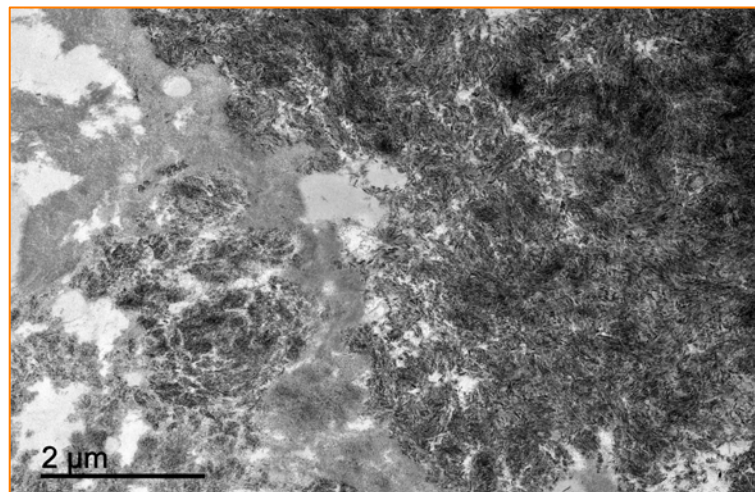


Figura 4. Matriz ósea, detalle en microscopía electrónica

un único tipo celular encargado de la formación de hueso, en cambio, los osteoclastos tienen un origen hematopoyético compartido con el linaje mononuclear-fagocítico siendo macrófagos modificados encargados de la resorción ósea.



Tipos celulares presentes en el tejido óseo<sup>21,24,25</sup>:

1. **Células osteoprogenitoras u osteógenas.** Son células provenientes del mesénquima en el periodo embrionario, llamadas células madre mesenquimales (MSC) . Poseen una forma de huso semejante a los fibroblastos, mostrando un retículo endoplasmático rugoso escaso y un aparato de Golgi poco desarrollado pero con abundantes ribosomas libres. En el adulto, se encuentran en la capa celular interna del periostio y en el endostio. Su diferenciación a los diversos tipos de células depende de las condiciones del medio: Si la tensión parcial de oxígeno es alta, se diferenciarán en osteoblastos; si la tensión parcial de oxígeno es baja, su tendencia será a desarrollar células condrógenas. Son las únicas células del estroma óseo que poseen actividad mitótica y pueden multiplicarse.

2. **Osteoblastos.**<sup>26</sup> (figura 5). Son células inmaduras diferenciadas sin capacidad de dividirse y son las principales responsables de la formación de matriz ósea. Los osteoblastos se encargan de regularizar la actividad ósea. Surgen como diferenciación de las células osteoprogenitoras, bajo la influencia de la familia de la proteína morfogénica ósea (BMP) y

del factor beta transformador de crecimiento TGF- $\beta$ . A diferencia de sus progenitoras, poseen un número elevado de retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi bien desarrollado así como también se

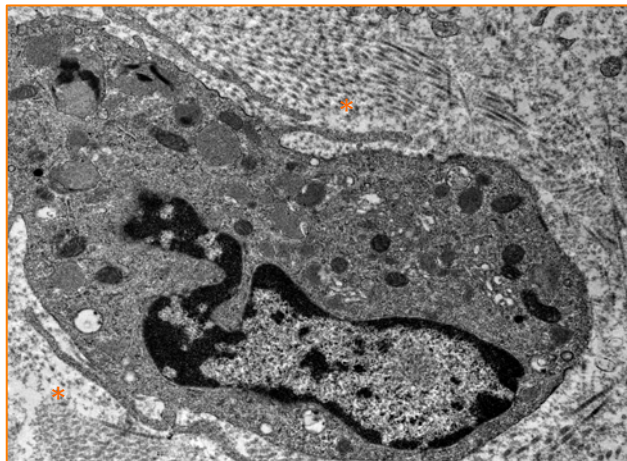


Figura 5 Osteoblasto con sus prolongaciones citoplasmáticas (\*) visto en microscopía electrónica.

observan numerosas vesículas. Se comunican entre ellas por uniones tipo GAP (nexo). Promueven la formación de matriz ósea calcificada así como la síntesis de las proteínas de la sustancia fundamental y el colágeno propio del tejido óseo, una vez que quedan recubiertas por la matriz ósea se transforman en un estadio no activo más diferenciado, el



osteocito. Producen RANKL (receptor para la activación del factor nuclear K-B encargado de la regeneración y remodelación ósea), osteonectina (proteína responsable de la fijación del calcio para la mineralización ósea), osteopontina (encargada entre otras función de sellar la zona donde actúa el osteoclasto), osteocalcina (actúa sobre la homeostasis del calcio y la mineralización ósea), sialoproteína ósea (une osteoblastos y osteocitos a la matriz extracelular) y M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos). Poseen receptores de hormonas, vitaminas y citosinas como la hormona paratiroidea (PTH) que induce al osteoblasto a secretar RANKL y factor estimulante de osteoclastos que promueve la diferenciación de preosteoclastos a osteoclastos activados.

Los osteoblastos también tiene una función dentro de la resorción ósea formando y eliminando el *osteóide* (capa de matriz no mineralizada), exponiendo la matriz ósea para el ataque de los osteoclastos. Cuando los osteoblastos se entierran dentro de la matriz ósea mineralizada se transforman en osteocitos.

3. **Osteocitos.**<sup>27</sup> (figura 6). Es una célula totalmente diferenciada madura derivada del osteoblasto, localizada en el hueso completamente formado ya que residen en lagunas en el interior de la matriz ósea mineralizada. Su forma se adapta al de la laguna y emiten prolongaciones digitiformes largas que se extienden por los canaliculos de la matriz ósea y esto los pone en contacto con otros osteocitos. En esas zonas de contacto las membranas forman un nexo que permite el intercambio de iones, pequeñas moléculas y hormonas. Son células menos activas que los osteoblastos por lo tanto sus orgánulos como el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi están menos desarrollados. Su función principal es la síntesis de los

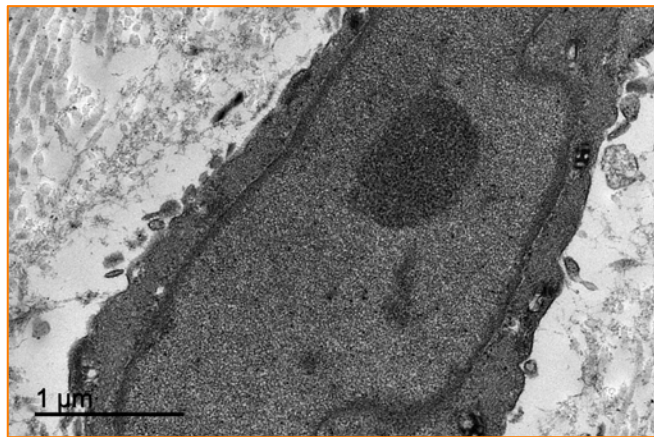


Figura 6. Osteocito viable visto a microscopia electrónica.

componentes necesarios para el mantenimiento de la matriz mineralizada que los rodea.

Están ampliamente relacionados con la mecanotransducción, proceso en el que reaccionan a la tensión ejercida liberando AMPc (monofosfato de adenosina cíclico), osteoclastina y somatomedinas que inducen la adición y activación de osteoblastos para la remodelación ósea.

4. **Osteoclastos.**<sup>28-30</sup> Su principal función es la resorción ósea. Son células de estirpe hematopoyética, derivadas de los fagocitos mononucleares siendo macrófagos superdiferenciados por la acción de citosinas provenientes del estímulo de los osteoblastos. Se encuentran ubicados en las lagunas de Howship, pueden llegar a ser células gigantes (hasta 150  $\mu\text{m}$  de diámetro) polinucleadas que se encuentran polarizados con los núcleos cerca de su superficie lisa mientras que la superficie adyacente al hueso presenta prolongaciones muy apretadas delimitadas por profundos pliegues (*borde en cepillo*). El citoplasma tiene una imagen de textura homogénea espumosa por alto contenido en vacuolas. Presentan abundantes mitocondrias en el borde en cepillo. Alrededor del borde en cepillo, la membrana se une al hueso por filamentos de actina (zona de sellado donde el osteoclasto lleva a cabo su función de reabsorción). En este sitio de sellado el osteoclasto bombea protones a nivel extracelular que resultan en una acidificación del medio y permite disolver el material óseo. El interior ácido del compartimiento favorece la liberación de hidrolasas ácidas

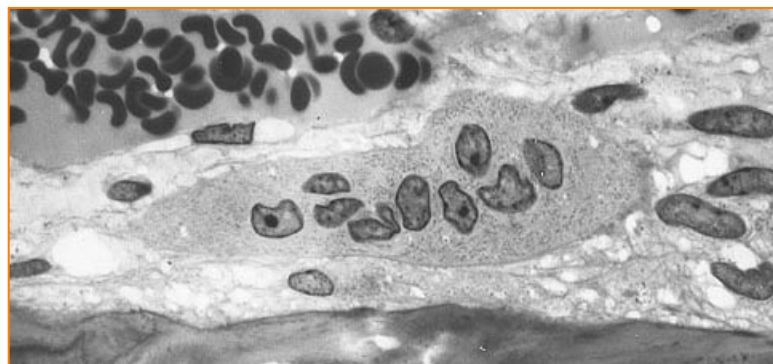


Figura 7. Osteoclasto con características clásicas de multitud de núcleos, citoplasma espumoso y bordes en cepillo. Extraído licencia Creative Commons. (Wikipedia.org)

lisosomales y proteasas como la collagenasa, que eliminan las sales cálcicas y degradan el colágeno y componentes orgánicos de la matriz ósea.

### 2.1.2. Formación y regeneración ósea <sup>31</sup>

La formación ósea es el proceso por el cual un tejido conectivo preexistente, se transforma por la acción de las células óseas en tejido óseo mediante la calcificación del mismo. No obstante, este proceso se divide en dos tipos fundamentales de osificación, la intramembranosa y la endcondral:

La osificación **intramembranosa** <sup>19,20,22,32</sup> o directa tiene lugar directamente en una membrana de tejido conectivo y no mediante tejido condral estructural previo. Los huesos de la bóveda craneal son el ejemplo de formación ósea de este tipo de osificación.

El mesénquima se condensa formando un tejido conjuntivo vascularizado en el cuál las células están unidas por largas prolongaciones y en los espacios intercelulares se depositan haces de colágeno orientados al azar que quedan incluidos en la matriz (gel poco denso). La primera señal de formación ósea es la aparición de bandas de matriz eosinófila más densas que se depositan equidistantemente de los vasos sanguíneos que forman la red. Las células se agrandan y se reúnen sobre las trabéculas, adquieren forma cuboidea o cilíndrica y permanecen unidas por prolongaciones cortas, se hacen más basófilas transformándose en osteoblastos que depositan matriz osteoide no calcificada.

Las trabéculas se hacen más gruesas, se secreta colágeno que forma fibras orientadas al azar formando hueso reticular (colágeno) (figura 8) donde posteriormente se depositan sales de calcio sobre la matriz extracelular formando los complejos minerales de

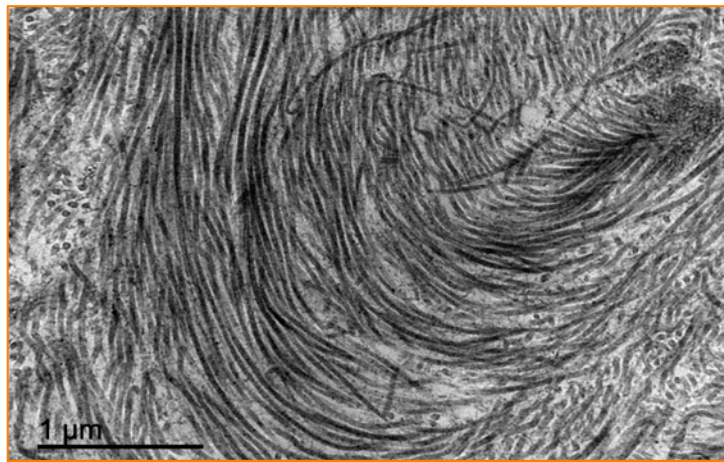


Figura 8. Distribución de las fibras de colágeno en la matriz ósea antes de la osificación. Detalle en M. Electrónica.

hidroxiapatita y calcificando dicha matriz. Debido al engrosamiento trabecular los osteoblastos quedan atrapados en lagunas y se convierten en osteocitos

que se conectan con los osteoblastos de la superficie por medio de los canaliculos.

El número de osteoblastos se mantiene por la diferenciación de células primitivas del tejido conjuntivo laxo (células mesenquimales). En las áreas de hueso esponjoso que debe convertirse en hueso compacto las trabéculas siguen engrosándose hasta que desaparecen los espacios que rodean los vasos sanguíneos. Las fibras de colágeno tipo I se vuelven más ordenadas y llegan a parecerse al hueso laminar.

Donde debe persistir el hueso esponjoso cesa el engrosamiento trabecular progresivo y las células provenientes del tejido vascular interpuesto se diferencian a precursores del tejido hematopoyético dando lugar a la médula ósea roja.

Las células mesenquimales del tejido conjuntivo adyacente que engloba el tejido óseo en formación se transforma en el periostio donde los osteoblastos superficiales se transforman en células de aspecto fibroblástico que persisten como elementos osteoprogenitores en reposo pudiéndose reactivar a osteoblastos si es necesario para la remodelación ósea.

· La osificación **encondral** <sup>33,34</sup> o indirecta requiere la presencia de matriz cartilaginosa que posteriormente será usada como sustrato para formar el tejido óseo definitivo. La gran mayoría de osteoformación en el esqueleto se produce de esta manera aunque el proceso es más claro en los huesos largos, lo que se lleva a cabo de la manera siguiente (figura 9):

*Desarrollo del modelo cartilaginoso:* Las células mesenquimales se agrupan en la región donde se debe formar el hueso futuro iniciando la diferenciación a condroblastos, que por su parte inician el proceso de producción de matriz cartilaginosa semejante al cartílago hialino recubierto por una membrana alrededor del modelo cartilaginoso que recibe el nombre de pericondrio,

*Crecimiento del modelo cartilaginoso:* Tal como sucede con las células de estirpe ósea, cuando los condroblastos quedan ubicados en las capas profundas de la matriz cartilaginosa, reciben el nombre de condrocitos.

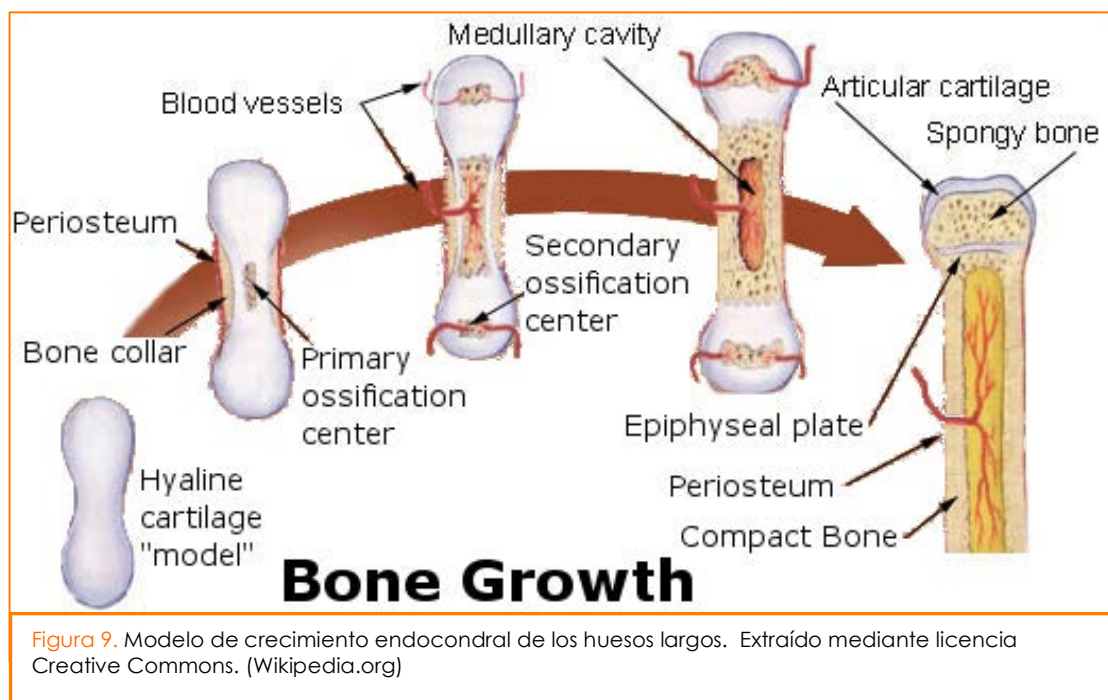
El modelo cartilaginoso crece en sentido longitudinal por división celular continua de los condrocitos, acompañada de secreción adicional de matriz cartilaginosa. Este proceso genera un aumento de longitud que se llama crecimiento intersticial. En contraste, el incremento en el grosor del cartilago se debe principalmente a la adición de matriz en la periferia del modelo por nuevos condroblastos, los cuales evolucionan a partir del pericondrio. A este tipo de desarrollo por depósito de matriz sobre la superficie cartilaginosa se le llama desarrollo por aposición. Al continuar el crecimiento del modelo cartilaginoso, se hipertrofian los condrocitos de su región central, probablemente en virtud de que acumulan glucógeno para la producción de ATP y de que sintetizan enzimas que catalizarán las reacciones químicas. La apoptosis programada de estos condrocitos hipertróficos liberando su contenido modifica el pH de la matriz extracelular activando el proceso de calcificación. Una vez iniciado este proceso, gran parte de los condrocitos presentes en el cartilago en calcificación mueren porque la matriz ya no difunde los nutrientes con rapidez suficiente. Cosa que permite la formación de lagunas que tarde o temprano se fusionan para formar cavidades pequeñas.

*Desarrollo del centro de osificación primario:* Una arteria nutricia penetra en el pericondrio y en el modelo cartilaginoso en calcificación a través de un agujero nutricional en la región central del modelo cartilaginoso, lo cual estimula que las células con capacidad osteógenas del pericondrio se diferencien en osteoblastos. Estas células secretan, bajo el pericondrio, una lámina delgada de hueso compacto, llamada collar de matriz ósea. Cuando el pericondrio empieza el proceso de diferenciación celular a células que derivaran en estirpes óseas (osteoblastos), pasa a ser llamado periostio. Cerca del centro del modelo crecen capilares periósticos en el cartilago calcificado en desintegración. El conjunto de estos vasos y sus correspondientes osteoblastos, osteoclastos y células de la médula ósea roja recibe el nombre de brote o yema perióstica.



Al crecer en el modelo cartilaginoso, los capilares inducen el crecimiento de un centro de osificación primario, región en que el tejido óseo sustituye la mayor parte del cartílago. Luego los osteoblastos comienzan a depositar matriz ósea sobre los residuos del cartílago calcificado, con lo que se forman las trabéculas del hueso esponjoso. A medida que el centro de osificación se alarga hacia los extremos del hueso, los osteoclastos destruyen las trabéculas recién formadas. De este modo se forma la cavidad medular en el centro del modelo, la cual será invadida posteriormente por células hematológicas formando la médula ósea roja. La osificación primaria se inicia en la superficie exterior del hueso y avanza hacia el interior.

*Desarrollo de los centros de osificación secundarios:* La diáfisis, que al principio era una masa sólida de cartílago hialino, es reemplazada por hueso compacto, cuyo centro contiene la cavidad llena de médula ósea roja. Cuando los vasos sanguíneos penetran la epífisis, se forman los centros de osificación secundarios, por lo regular hacia el momento del nacimiento. La formación de hueso es similar a la que tiene lugar en los centros de osificación primarios; sin embargo, se diferencia en que el tejido esponjoso permanece en el interior de la epífisis (no se forma la cavidad medular). La osificación secundaria se inicia en el centro de la epífisis y prosigue hacia el exterior, en dirección a la superficie externa del hueso.



*Formación del cartílago articular y de la placa epifisiaria:* El cartílago hialino que cubre las epífisis se convierte en cartílago articular. durante la niñez y la adolescencia se conserva cartílago hialino entre la diáfisis y las epífisis, el cual se conoce como placa epifisiaria y es la que permite el crecimiento longitudinal de los huesos largos.

### 2.1.3. Características y propiedades del periostio

El periostio es una membrana de tejido conectivo de características fibrosas y resistente que engloba completamente los huesos por su superficie externa excepto en lugares de inserción de ligamentos, tendones y superficies articulares. Esta membrana contiene gran parte de la vascularización del tejido óseo así como la inervación de los mismos, confiriéndole protección del exterior del tejido<sup>35-39</sup>.

Como se ha comentado, el periostio realmente posee las terminaciones nerviosas principales del hueso, sobretodo nociceptivas, haciéndolo muy sensible a la manipulación. Así mismo, debido a la gran vascularización que posee controla y permite la nutrición del tejido óseo colaborando con el sistema de arterias nutricias óseas y la vascularización endóstica. Se encuentra unido al hueso por fuertes fibras de colágeno llamadas fibras de Sharpey<sup>40</sup>, las que se extienden a las laminillas circunferenciales externas e intersticiales.

El periostio está formado por dos capas diferenciadas<sup>41</sup>, la

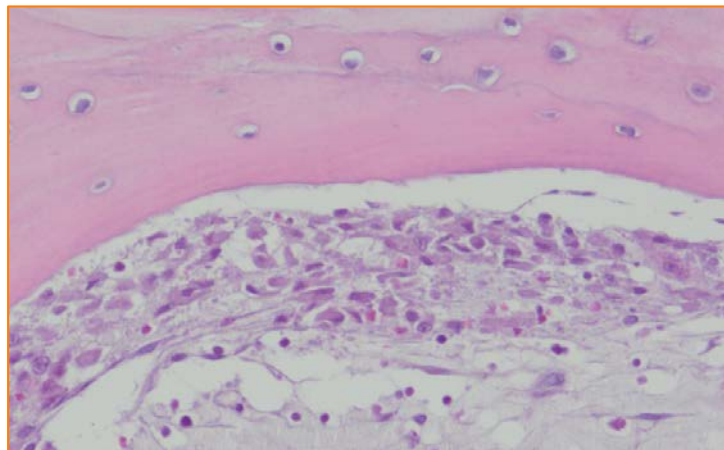


Figura 10. Detalle de la capa fibrosa externa y interna basal del periostio

primera, una capa externa fibrosa (alto contenido en fibroblastos) en contacto con el exterior del órgano y segunda, una capa interna basal que hace las funciones de recambio y regeneración ósea formada por células progenitoras osteogénicas (derivadas de las células madre mesenquimales) que se transforman en osteoblastos cuya función es el crecimiento en grosor del hueso, no obstante, tras una fractura ósea, las células progenitoras se diferencian a osteoblastos y condroblastos que se activan para llevar a cabo el proceso de curación, regeneración y remodelación ósea (figura 10).



El periostio experimenta cambios durante la vida del organismo, siendo mucho más consistente y desarrollado en las edades tempranas de la vida debido a su función de depósito de hueso cortical durante el crecimiento en grosor del hueso en el desarrollo, teniendo un potencial de regeneración ósea importante que disminuye con el pasar de los años y el envejecimiento progresivo va cediendo y disminuyendo en cuanto a grosor y propiedad anatómicas como funcionales de poder de remodelación y neoformación ósea.

En resumen las propiedades esenciales del periostio son:

- Aporte sanguíneo por la circulación perióstica, mejorando la nutrición y el metabolismo óseo.
- Zona de nocicepción e inervación del tejido óseo que no se encuentra inervado.
- Función protectora y aislante del exterior del órgano (hueso) realizada en su mayor parte por la capa externa.
- Reserva de células osteoprogenitoras claves en la regeneración, reparación y remodelación tisular del hueso, tanto de manera habitual como en situaciones patológicas como fracturas proporcionada básicamente por la capa profunda (cambium) o interna del periostio.

Esta última función, pero no menos importante, del periostio proporcionando una reserva de células osteoprogenitoras capaces de diferenciarse a osteoblastos y que resulta crucial para la neoformación, regeneración y remodelación ósea es la base por la cual se realiza este estudio de la capacidad de revascularización del periostio.



Figura 11. Detalle de la disección del periostio del peroné vascularizado. Cortesía Dr. Soldado

## 2.2. Resecciones óseas masivas

Dentro del campo de la patología ortopédica<sup>31,42</sup>, la principal misión a la que se enfrenta el cirujano ortopédico es a la restauración de la función y la anatomía de las lesiones que afectan al aparato locomotor y en especial al hueso. En la práctica habitual, las lesiones óseas permiten una restauración completa de la masa ósea o un defecto mínimo que no compromete la estabilidad ni la función de la extremidad afectada. No obstante, en ocasiones y derivado directamente de la patología que presente el hueso y su pronóstico, la resección ósea puede ser importante y obligar a plantear una reconstrucción del segmento que se ha tenido que sacrificar.

Estas situaciones están a la orden del día en la patología tumoral del aparato locomotor abarcando los sarcomas propios de los tipos de tejidos que lo constituyen así como enfermedades metastásicas secundarias que obligan a un tratamiento agresivo para conseguir unos márgenes de seguridad suficientemente amplios que puede dar lugar a un defecto posterior más o menos importante necesario de reconstrucción para otorgarle funcionalidad.<sup>2,43,44</sup> Otro gran grupo de patología del aparato locomotor susceptible de sufrir grandes resecciones óseas son las lesiones secundarias a procesos sépticos de la extremidad, como osteomielitis o infecciones secundarias a material protético. El gran auge de la implantación de material de osteosíntesis y artroplastias también ha producido el incremento de resecciones óseas en determinadas situaciones, aunque son afortunadamente poco frecuentes.

Respecto al tema central del trabajo, se abordarán las resecciones óseas desde el punto de vista de la patología tumoral, ya que es el tema central para la utilización de aloinjertos masivos en las reconstrucciones, manteniéndose este tipo de tratamientos poco introducidos en la patología séptica por el aumento del riesgo de colonización e infección secundaria.

Una resección ósea masiva se considera aquella que involucra una porción del hueso suficiente para la distorsión o incapacidad de su función local y sistémica en el conjunto del esqueleto<sup>42</sup>. Así pues se pueden considerar

resecciones masivas las amputaciones de parte de los miembros inferiores o superior, aquellas resecciones locales que involucren regiones articulares o bien las que abarquen un tamaño de diáfisis de hueso largo que provoque un intolerable acortamiento o disfunción de la extremidad afecta.

Hoy en día, y debido a la mejoría de las técnicas quirúrgicas y el desarrollo de nuevas tecnologías y experimentación de los cirujanos ortopédicos, el objetivo prioritario delante de una lesión tumoral que afecte una extremidad aboga por el salvamento de la misma evitando de manera regular la amputación<sup>5,7,43</sup> (exceptuando tumores de partes acras en los que la funcionalidad puede ser suplantada y la reconstrucción poco viable) y procediendo al salvamento de la extremidad. Como grandes actuaciones sobre las resecciones masivas secundarias a tumores, existen dos grandes técnicas quirúrgicas combinables que a grandes trazos se dividirían en reconstrucciones con injertos óseos masivos (habitualmente alogénicos y criopreservados (IMHC)<sup>2,3,45</sup>) y en resecciones que involucren las diáfisis y metáfisis de huesos largos y las artroplastias de reconstrucción utilizadas predominantemente en las afectaciones articulares o epifisarias de los huesos (la utilización de aloinjertos osteocondrales también se ha realizado en estos tipos de resecciones pero con resultados pobres respecto a las artroplastias).

## 2.3 Tumores óseos malignos

### 2.3.1. Generalidades, factores de riesgo y epidemiología

Los tumores óseos malignos son un grupo heterogéneo de neoplasias derivadas del tejido mesenquimal y junto a los tumores de partes blandas representan prácticamente la totalidad de neoplasias englobadas en los llamados sarcomas<sup>31,42,46</sup>. Pese a que las partes blandas y los huesos componen prácticamente el 75% del componente celular del organismo, estos tumores son relativamente poco frecuentes siendo la incidencia anual en los estudios poblacionales (principalmente de EEUU) alrededor de los 3000 sarcomas óseos anuales<sup>47</sup>.

Se estima que los sarcomas constituyen el 1% de los tumores en el ser humano<sup>46</sup>, siendo mucho más frecuente la afectación ósea secundaria por metástasis de tumores de estirpe carcinomatosa que la afectación primaria del hueso.

Es debido a esta baja frecuencia y a la complejidad de su tratamiento que este tipo de patología se debe sospechar y derivar a equipos multidisciplinares coordinados en el tratamiento de dichas lesiones incluyendo oncólogos, patólogos, radiólogos y cirujanos ortopédicos especializados.

Característicamente son neoplasias que aparecen en una población joven, siendo entre la segunda y la tercera década de la vida la mayor incidencia de estas lesiones, tumores con características especiales como el sarcoma de Ewing, no obstante, puede aparecer en edades más tempranas. La aparición de neoplasias de estirpe ósea en edades más tardías suele estar relacionada con lesiones secundarias a patologías relacionadas o malignizaciones de lesiones benignas, aunque suelen ser raros.

Se trata de una patología de distribución bastante homogénea en cuanto a razas, con una frecuencia algo más elevada en la raza caucásica (0,9 por cada 100000 habitantes) y algo menor en asiáticos (0,6 por cada 100000

habitantes) y con una incidencia discretamente más elevada en hombres que en mujeres.

Los sarcomas óseos presentan una gran variabilidad de células responsables de la diferenciación y su clasificación depende del tipo de matriz que produce la cepa tumoral<sup>42,48,49</sup>, siendo comúnmente divididos en productores de osteoide con su principal ejemplo el osteosarcoma o productores de matriz condral como el condrosarcoma. Se debe también añadir un tercer grupo de sarcomas óseos que presentan celularidad más primitiva o menos diferenciada como el sarcoma de Ewing o el adamantinoma.

No obstante la variabilidad celular que presenta esta familia de neoplasias, clásicamente su situación en las diferentes regiones del hueso así como la localización del hueso afecto es característica y puede ayudar al diagnóstico primario de la lesión y a la sospecha clínica de la estirpe celular que se desarrolla, como por ejemplo la localización típica del osteosarcoma en la metáfisis de huesos largos, característicamente alrededor de la rodilla (metáfisis distal de fémur o proximal de tibia) o la afectación diafisaria de huesos largos del sarcoma de Ewing<sup>42,50,51</sup>.

Aunque la gran mayoría de tumores óseos malignos no presentan una etiología definida o específica, se han identificado diversos factores de riesgo que pueden aumentar la incidencia de estas patologías como son:

- Irradiación previa de la zona
- Exposición a químicos como el arsénico, el cloretileno, etc.
- Inmunodeficiencias
- Enfermedades asociadas como la enfermedad de Paget
- Síndromes genéticos tumorales o degeneración de lesiones previas como encondromas, osteocondromas o infartos óseos.

Los sarcomas óseos, así como los tumores de partes blandas, presentan patrones de comportamiento biológico similares debido al origen mesenquimal común y la región anatómica donde se encuentran. Éstos patrones confluentes son lo que establecen el diagnóstico, clasificación y estrategias de tratamiento en la actualidad. La gradación histológica es fundamental para la

caracterización de las lesiones, desde el punto de vista histológico los sarcomas se dividen en alto, intermedio o bajo grado<sup>19,46</sup>. Ésta gradación se basa en las características morfológicas del tumor, la extensión del mismo, la presencia de pleomorfismos y atipias y los índices de necrosis y mitosis celular. Éstas características dan una muestra de la agresividad del tumor y se correlacionan con la probabilidad de extensión sistémica o metastatizante.

Otra característica importante de los sarcomas (tanto óseos como de partes blandas es su respeto a las barreras compartimentales donde se hallan ubicados como el periostio, las regiones condrales tanto fisarias como epifisarias, ya que generalmente siguen su crecimiento hacia las zonas que ofrecen menor resistencia, no obstante en fases avanzadas pueden invadir, al igual que los carcinomas, las estructuras adyacentes sin respetar estas barreras.

La diseminación intrarticular de los sarcomas óseos es muy poco frecuente, debido al respeto del cartílago articular y siendo habitualmente secundaria a fracturas del hueso nativo en la zona tumoral que permite la diseminación hacia la articulación.

La facilidad o frecuencia de diseminación a otras zonas del organismo depende del grado histológico, siendo poco frecuente en sarcomas de bajo grado (<15% ratio de diseminación) y con una tasa mayor en lesiones de alto grado. La diseminación a otros tejidos es eminentemente vascular y su localización *princeps* es el parénquima pulmonar en fases iniciales añadiendo diseminación a otros huesos en fases más avanzadas. Las metástasis linfáticas son muy poco frecuentes y ofrecen un pronóstico similar a las metástasis a distancia.

Tal y como Enneking<sup>52,53</sup> y otros autores han publicado<sup>54,47,51</sup>, hoy en día se acepta que la clasificación y estadiaje de las lesiones tumorales óseas es crucial para el tratamiento y el pronóstico así como para la evaluación de los resultados terapéuticos obtenidos. Existen diversas clasificaciones del estadiaje de los sarcomas óseos aunque todas ellas comparten trazos comunes. El Dr. Enneking <sup>52</sup> fue el pionero de la clasificación quirúrgica de los tumores óseos (tabla 1) valorando 3 ítems principales que incorporaba los

factores pronósticos más significativos, el grado histológico del tumor, la localización dentro de un compartimento y la presencia de metástasis a distancia, obteniendo 5 estadios tumorales (IA, IB, IIA, IIB y III) que ofrecen diferentes posibilidades de tratamiento según el estadio.

| ESTADIO     | GRADO      | LOCALIZACIÓN        | METÁSTASIS             |
|-------------|------------|---------------------|------------------------|
| <b>I A</b>  | Bajo       | Intracompartimental | No                     |
| <b>I B</b>  | Alto       | Extracompartimental | No                     |
| <b>II A</b> | Bajo       | Intracompartimental | No                     |
| <b>II B</b> | Alto       | Extracompartimental | No                     |
| <b>III</b>  | Cualquiera | Cualquiera          | Regional o a distancia |

Tabla 1. Clasificación propuesta por Enneking para el estadiaje de los tumores óseos.

No obstante la clasificación de Enneking es una clasificación que todavía hoy día se sigue utilizando<sup>55</sup>, se basa en criterios clínicos y en una época en que la resección compartimental era el tratamiento quirúrgico basal y la quimioterapia neoadyuvante y los tratamientos radioterápicos estaban poco establecidos. Debido a esta situación, muchos cirujanos ortopédicos oncológicos y oncólogos utilizan la clasificación propuesta por el American Joint Committee of Cancer (AJCC) <sup>56</sup> (tabla 2) basada en la clasificación propuesta en los 80 por Enneking incluyendo el tamaño y diferenciación celular y diferenciando entre las metástasis linfáticas y las distantes.

Tabla 2. Estadiaje de los sarcomas óseos por la American Joint of Cancer Committee

| Estadio    | Grado       | Tumor<br>primario   | Metástasis<br>en ganglios<br>linfáticos | Metástasis a<br>distancia |
|------------|-------------|---------------------|---|---------------------------|
| <b>IA</b>  | G1 o G2     | T1                  | N0                                      | M0                        |
| <b>IB</b>  | G1 o G2     | T2                  | N0                                      | M0                        |
| <b>IIA</b> | G3 o G4     | T1                  | N0                                      | M0                        |
| <b>IIB</b> | G3 o G4     | T2                  | N0                                      | M0                        |
| <b>III</b> | Cualquier G | <i>Skip lesions</i> |   |                           |
| <b>IVA</b> | Cualquier G | Cualquier T         | N1                                      | M0                        |
| <b>IVB</b> | Cualquier G | Cualquier T         | Cualquier N                             | M1                        |

G1 = bien diferenciado, G2 =moderadamente diferenciado, G3=poco diferenciado, G4= indiferenciado

T1= Intracompartimental, T2= Extracompartimental. N0= no ganglios, N1 Ganglios regionales positivos.

M0= no metástasis a distancia, M1=metástasis a distancia

Se debe comentar también otra clasificación utilizada para el estadiaje de los sarcomas óseos que es utilizada ampliamente por parte de oncólogos y facultativos especialistas en la patología tumoral (cirujanos, radiólogos, patólogos,...) para la clasificación de la mayor parte de enfermedades oncológicas, la clasificación TNM<sup>57</sup>, que se centra también en la descripción del tumor primario, los ganglios linfáticos y las metástasis a distancia y guarda características similares a la clasificación de la AJCC.

### Estadiaje de los sarcomas óseos según la clasificación TNM (tabla 3)

#### Tumor primario (T)

- TX: Tumor primario no valorable
- T0: no evidencia de tumor primario
- T1: Tumor < 8 cm de diámetro mayor
- T2: Tumor de > 8 cm de diámetro mayor
- T3: Tumores discontinuos en mismo hueso (*skip lesions*)

#### Nódulos linfáticos regionales (N)

- NX: Ganglios no valorables
- N0: No presencia de ganglios metastásicos regionales
- N1: Ganglios positivos regionales

#### Metástasis a distancia (M)

- MX: Metástasis a distancia no valorables
- M0: No metástasis a distancia
- M1: Metástasis a distancia
  - o M1a: Pulmón
  - o M1b: Otras localizaciones

#### Grado histológico

- Bajo grado (G1-G2 AJCC)
- Alto grado (G3-G4 AJCC)



|                    |             |             |             |             |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Estadio IA</b>  | T1          | N0, Nx      | M0          | Bajo grado  |
| <b>Estadio IB</b>  | T2          | N0, Nx      | M0          | Bajo grado  |
| <b>Estadio IIA</b> | T1          | N0, Nx      | M0          | Alto grado  |
| <b>Estadio IIB</b> | T2          | N0, Nx      | M0          | Alto grado  |
| <b>Estadio III</b> | T3          | N0, Nx      | M0          | Cualquier G |
| <b>Estadio IVA</b> | Cualquier T | N0, Nx      | M1a         | Cualquier G |
| <b>Estadio IVB</b> | Cualquier T | N1          | Cualquier M | Cualquier G |
|                    | Cualquier T | Cualquier N | M1b         | Cualquier G |

Tabla 3. Clasificación TNM de los tumores óseos

Como se puede observar estas clasificaciones son más específicas que la clasificación de Enneking de cara a proporcionar un pronóstico de vida tras el diagnóstico de la patología y su estudio de extensión.

Basándose en el estadiaje que proporciona la clasificación de la AJCC <sup>56</sup>, se estima que la supervivencia del paciente a los 5 años del diagnóstico y estadiaje de la enfermedad se estima en un 98% en los tumores en estadio I, un 82% en los pacientes con un estadio II al diagnóstico, un estadio III con lesiones a distancia (skip lesions ) en el momento del diagnóstico, se estima una supervivencia del 52% mientras que un estadio IV con metástasis a distancia en el momento del diagnóstico presenta una supervivencia del 30%.

### 2.3.2. Aproximación diagnóstica

El síntoma principal que presentan los pacientes es dolor, que puede ser agudo en caso de producirse una fractura patológica aunque normalmente suele ser insidioso, progresivo y suele ser de características inflamatorias, aumentando en reposo y ocasionalmente nocturno. No es inhabitual la aparición o el hallazgo de la lesión tras un traumatismo banal con un dolor exacerbado respecto del mecanismo contuso.

Otros síntomas que ocasionalmente aparecen relacionados es la tumefacción regional (cuando aparece normalmente hay una extensión extracompartimental del tumor), la aparición de una masa en extremidades o la limitación funcional de una articulación. Al diagnóstico también pueden estar presentes síntomas constitucionales como pérdida de peso, astenia y fiebre <sup>48,58</sup>.

#### **Estudio de imagen y extensión**<sup>42,46,48,59-63</sup>

En todo paciente con sospecha de tener una posible lesión ósea se debe practicar una radiografía simple de la zona afecta ya que puede orientar hacia el diagnóstico de presunción de una lesión benigna o maligna según la localización, el tamaño, la reacción perióstica y el tipo de matriz formada, demostrando características de agresividad más o menos importantes. Una vez hallada la imagen ósea se establece una sospecha diagnóstica que debe ser evaluada en profundidad, siendo de elección la realización de un estudio de TC, tanto a nivel local lesional como dentro del estudio de extensión en caso de sospecha de proceso maligno con un TC pulmonar.

La inclusión de la resonancia magnética (RM) dentro del estudio local es clave para la identificación primaria del tumor, su agresividad y su grado de extensión local y afectación de partes blandas. Dentro del estudio de extensión se incluye de manera habitual la realización de gammagrafías óseas para evaluar la diseminación sistémica.

Así como la realización de estudios complementarios de imagen para la caracterización de las lesiones y el estudio de extensión son piezas claves en el enfoque terapéutico que va a realizar el equipo multidisciplinar, la estirpe tumoral se debe clasificar y estudiar obteniendo tejido propio del tumor, así pues, el diagnóstico definitivo de la lesión y el estudio histológico y genético del tumor están supeditados a la realización de una biopsia del tumor. El siguiente diagrama muestra el algoritmo del estudio de los tumores óseos (figura 12).

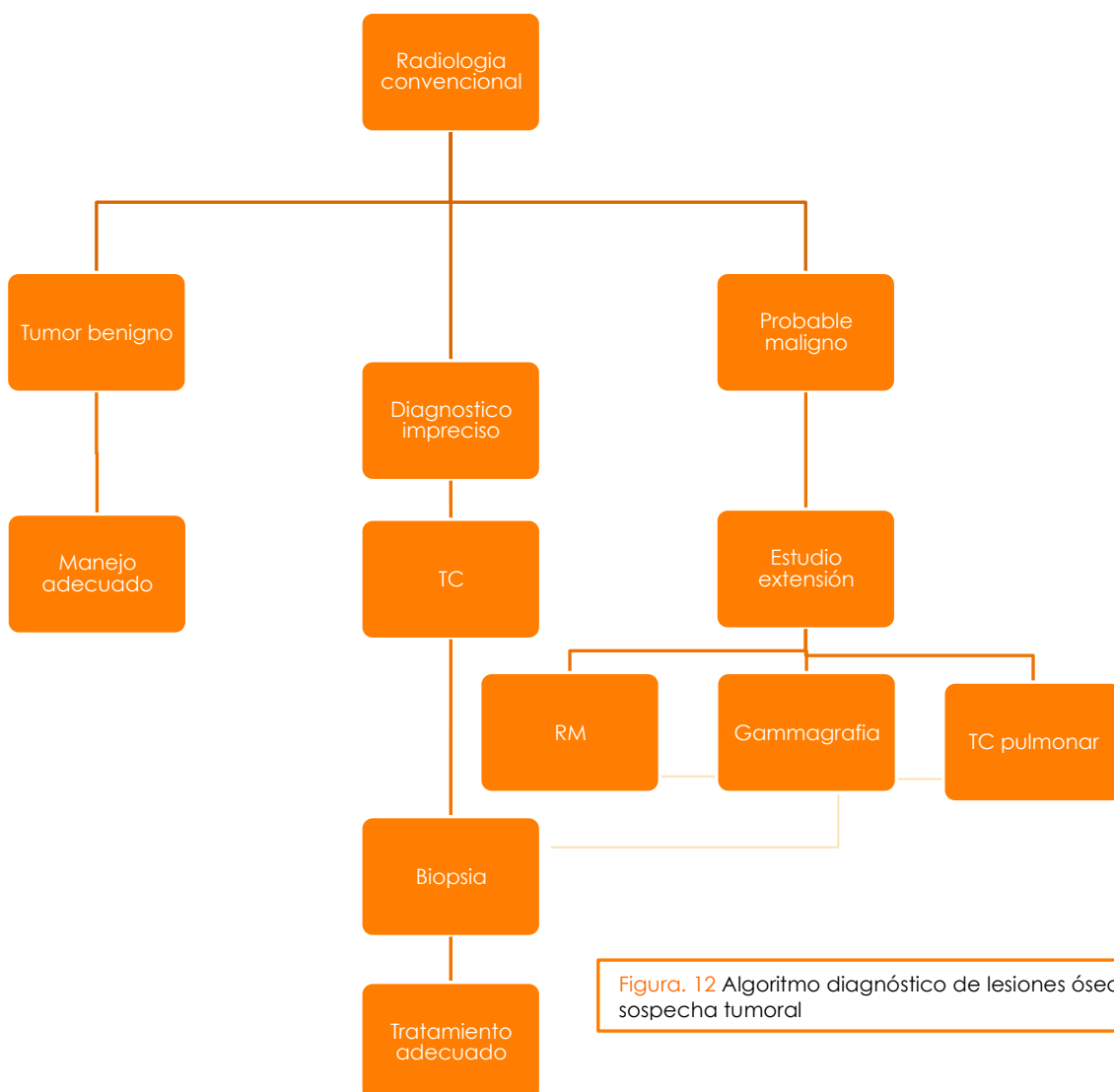


Figura. 12 Algoritmo diagnóstico de lesiones óseas con sospecha tumoral

**Biopsia** 64-66

La biopsia del tejido tumoral es el método *gold standard* para la adquisición de tejido tumoral y concretar y especificar un diagnóstico de la estirpe tumoral. La planificación y ejecución de la biopsia debe seguir un protocolo riguroso. Debe realizarse por el cirujano o por el equipo multidisciplinar que llevará a cabo la cirugía de conservación ya que presenta unos criterios de realización estrictos para su realización de modo que la diseminación tumoral sea mínima

La realización de una biopsia no planificada por facultativos sin experiencia en oncología músculo-esquelética puede comprometer la tasa de supervivencia y las posibilidades de realizar cirugía conservadora. En caso de recibir a un paciente al que se ha realizado una biopsia por un cirujano no especializado en cirugía oncológica o una resección parcial no planificada se deberá realizar una RM del tumor que nos mostrará la extensión del hematoma y la contaminación tumoral de los tejidos previamente sanos periféricos: se deberá realizar entonces cirugía con criterios oncológicos al tumor y a todos los tejidos potencialmente contaminados por la biopsia, el hematoma, la cicatriz, el trayecto del drenaje, etc.

La biopsia puede ser incisional o percutánea. La biopsia incisional se debe realizar en quirófano y bajo control mediante fluoroscopia de la lesión. La exanguinación no se debe realizar por expresión ya que puede favorecer la diseminación tumoral proximal. Se debe planificar cuidadosamente la vía de abordaje que se utilizará posteriormente para la extirpación del tumor teniendo en cuenta que se debe extirpar tanto la cicatriz de la biopsia como los extremos de la sutura y el trayecto de salida del drenaje en bloque junto con la pieza tumoral.

El acceso al tumor debe realizarse en un solo plano procurando no contaminar compartimentos adyacentes y se debe realizar una hemostasia cuidadosa: un hematoma postquirúrgico es una vía de contaminación tumoral en los tejidos adyacentes potencialmente salvables que obligaría, en caso de tumoraciones malignas de alto grado, a realizar una amputación o una resección compartimental. La orientación de la incisión deberá ajustarse a la vía de abordaje posterior y tener en cuenta las posibles necesidades de

ampliación para el control de vasos y nervios: una incisión transversal en una extremidad puede crear un serio problema a la hora de la resección tumoral definitiva.

Cada vez más se aconseja la biopsia con aguja gruesa guiada por imagen (figura 13). En tumores de tejidos blandos se puede realizar guiada por ecografía pero en los tumores óseos se realizará guiada por TC o guiada por RM. En la biopsia con aguja gruesa guiada por TC el radiólogo intervencionista estará en estrecha comunicación con el cirujano. Deberá tatuar el lugar de la punción para poder ser localizada cuando llegue el momento de la cirugía definitiva. Se consultará la vía de abordaje quirúrgica posterior y se valorarán cuidadosamente las imágenes de RM para dirigir la biopsia a la región tumoral de patología más significativa pues zona con necrosis tumoral no ofrecen una buena muestra de las características neoplásicas.

La gradación histológica debe evaluarse muy cuidadosamente en combinación con la clínica y las pruebas de imagen ya que hay

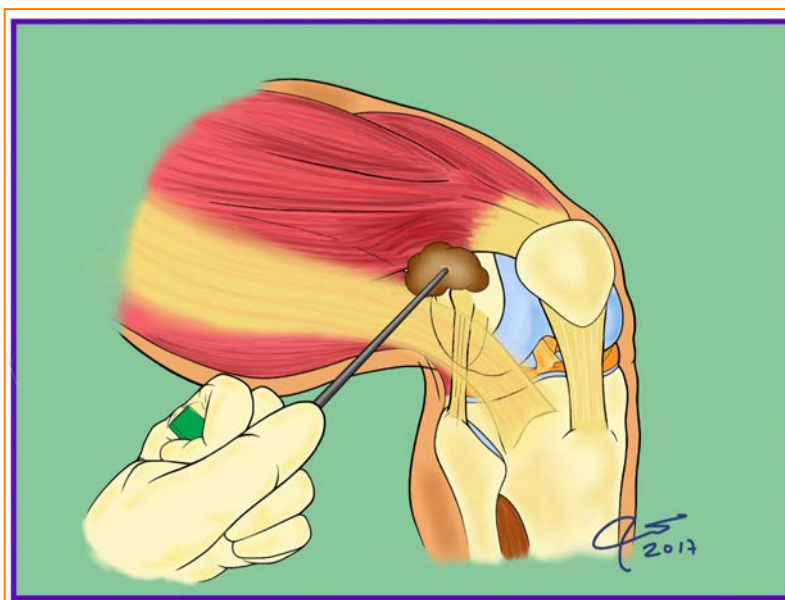


Figura 13. Esquema de punción biopsia con aguja gruesa. Cortesía del Dr. Cuscó.

tumores óseos malignos con una gran variabilidad de zonas tumorales más o menos desdiferenciadas y el estudio sesgado de los islotes celulares menos agresivos puede condicionar el resultado final de la biopsia y el grado histológico y posteriormente el tratamiento ulterior de la neoplasia.

Como recomendación final, se debería evitar la realización de punciones finas guiadas (PAAF) tanto en tumores de partes blandas como en tumores óseos. Su rentabilidad es muy baja y las posibilidades de establecer el grado de malignidad son menores, así pues la técnica de elección para la biopsia de

una lesión sospechosa de tumor óseo maligno debe ser aquella que nos aporte tejido suficiente para evaluar las zonas de lesión y su grado histológico con una menor agresión local y menor probabilidad de complicaciones, cosa que resulta en el aumento progresivo de las punciones guiadas con aguja gruesa como medida más adecuada para la obtención de tejido histológico de las neoplasias óseas.

## 2.4. Tratamiento de los tumores óseos malignos

### 2.4.1. Terapias no quirúrgicas – Tratamiento adyuvante y coadyuvante.

El objetivo de tratamiento de un paciente afecto de una neoplasia ósea es librar al paciente de la enfermedad, siendo el objetivo de tratamiento en el caso de una enfermedad neoplásica diseminada el control del dolor, la conservación de la función y mantener o mejorar la calidad de vida de los pacientes. Para llevar a cabo estos objetivos las herramientas de las que se dispone son además de la cirugía, el tratamiento combinado con quimioterapia y radioterapia <sup>56,58,67-69</sup>.

El tratamiento clásico de los tumores óseos y en especial el osteosarcoma era la amputación radical o inmediata de la extremidad afecta en el momento del diagnóstico cosa que conseguía un buen control local de la enfermedad pero la tasa de mortalidad llegaba a cotas del 80% por diseminación metastásica aunque en el momento del diagnóstico no presentaran afectación sistémica<sup>48,70-72</sup>. Delante de esta situación se podía concluir que la enfermedad estaba diseminada frecuentemente en el momento del diagnóstico. Al introducir los protocolos de quimioterapia asociada esta tasa de mortalidad disminuyó considerablemente ofreciendo una tasa de supervivencia a los 5 años de un 70% aproximadamente en el osteosarcoma y tasas de descenso similar en el sarcoma de Ewing<sup>73</sup>. No obstante estos resultados y la asociación del tratamiento quimioterápico de base en el tratamiento de los tumores óseos de alto grado, la respuesta a la quimioterapia de los tumores de estirpe condral no es útil para la reducción tumoral y es poco efectiva también en los de bajo grado.

Actualmente la asociación de los tratamientos sistémicos quimioterápicos forman parte esencial del tratamiento de los tumores óseos malignos, tanto a nivel neoadyuvante (tratamiento quimioterápico administrado previamente a la cirugía tumoral, en ciclos normalmente de 8-12 semanas para producir una regresión tumoral y favorecer la presencia de

márgenes libres y una cirugía de preservación de la extremidad) como coadyuvante (perioperatorio).

La asociación de la quimioterapia coadyuvante también es útil previa a la cirugía para valorar la respuesta del tratamiento por parte de la masa tumoral a nivel histológico y valorar el grado de necrosis tumoral. Esta respuesta al tratamiento quimioterápico realizada en la pieza de resección es uno de los mejores indicadores de la efectividad del tratamiento y del pronóstico de supervivencia a largo plazo de la enfermedad. No obstante, la asociación de la quimioterapia tiene efectos secundarios respecto a la cirugía tumoral por lo que la administración de la misma debe tener un periodo de seguridad previo y posterior a la cirugía para evitar complicaciones como infecciones y problemas de cicatrización de la herida quirúrgica <sup>48</sup>.

La radioterapia es otro de los pilares de tratamiento de la patología neoplásica, teniendo como objetivo la aplicación de altas dosis de radiación a nivel de la masa tumoral, minimizando la exposición del tejido sano circundante para provocar la muerte celular. Las dosis de radiación se aplican en intervalos para conseguir que las células tumorales se encuentren en el momento del ciclo adecuado para su muerte así como dar tiempo al tejido sano a su reparación <sup>42,69</sup>.

Así como su utilización en los sarcomas de partes blandas obtiene buenos resultados tanto preoperatorios como postoperatorios<sup>74</sup>, por lo que respeta a su aplicación en los tumores óseos primarios, cabe decir que son relativamente radiorresistentes por lo que su uso se confina a los tumores de alto grado con gran recambio celular como el sarcoma de Ewing, tumores derivados de la médula ósea como el mieloma múltiple o el linfoma o el tratamiento de las metástasis de carcinomas, así pues el uso de la radioterapia de manera habitual en el tratamiento tanto neoadyuvante como coadyuvante que limitada a los tumores radiosensibles, no siendo aplicada de manera rutinaria en la mayoría de tratamientos de los tumores óseos primarios.

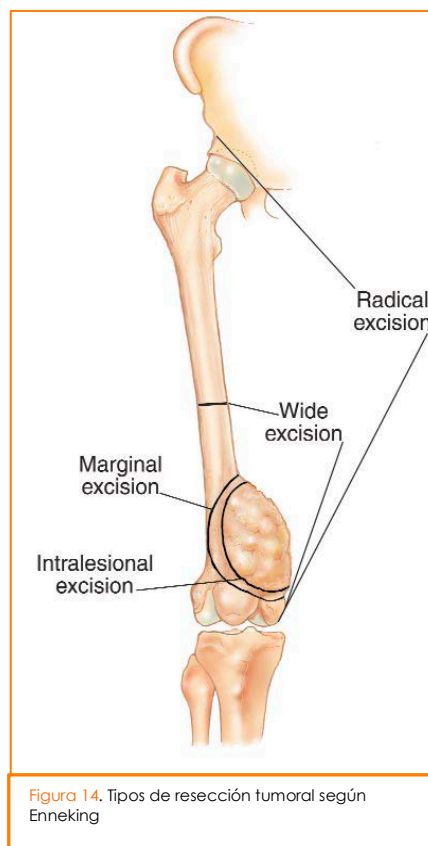


## 2.4.2. Principios generales del tratamiento quirúrgico de los sarcomas óseos

Cabe recordar que el objetivo del tratamiento quirúrgico de los sarcomas óseos es eminentemente con intención curativa, no obstante y dependiendo del estadiaje del tumor y de la extensión del mismo, esta indicación puede ser modificada y tener como objetivo la disminución de masa tumoral<sup>42,46,48</sup>. En los casos en que la cirugía de resección tumoral esté indicada, cabe pensar y organizar cual será la técnica que se utilizará de cara a la reconstrucción en el caso que ésta sea viable, que como veremos, es la indicación estándar hoy en día en cuanto al tratamiento quirúrgico de los sarcomas óseos.

Así pues, la cirugía conservadora de la extremidad afecta en tumores malignos músculo esqueléticos se desarrolla a partir de la década de los ochenta con la aparición de la resonancia nuclear magnética. Antes de 1970 sólo se contemplaba la amputación como método válido de tratamiento de los sarcomas de las extremidades con tasas de supervivencia bajas, especialmente en el caso del osteosarcoma como se ha comentado<sup>43</sup>.

En 1982 se publicó un estudio prospectivo y aleatorizado<sup>74</sup>, promovido por el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos en el que se comparaba la amputación comparada con la cirugía conservadora de la extremidad más radioterapia en sarcomas de tejidos blandos y se comprobó que, pese a las recidivas locales en el grupo de cirugía conservadora, la supervivencia global no ofrecía diferencias significativas.



Enneking y colaboradores <sup>75,76</sup> publicaron en 1980 un estudio que definía las clases de resección tumoral basándose en los márgenes quirúrgicos obtenidos (figura 14). Estos márgenes podían aplicarse por igual a la amputación que a la cirugía conservadora. Así representaban una clasificación con los siguientes ítems:

- *Resección intralesional*: Se aplica a la cavidad tumoral, como un legrado, pueden quedar células tumorales incluso macroscópicamente.
- *Resección marginal*: Se extirpa el tumor a través de la pseudocápsula, inflamatoria, de tejido peritumoral asumiendo que este tejido inflamatorio puede estar colonizado microscópicamente.
- *Resección amplia*: Consiste en la extirpación del tumor, la pseudocápsula y un manguito de tejido sano peritumoral exento de edema o signos inflamatorios.
- *Resección radical o compartimental*: Aquella que extirpa el tumor y el compartimento anatómico que lo contiene con sus barreras anatómicas.

No obstante es una clasificación sencilla de interpretar y que puede otorgar un valor pronóstico y una correcta caracterización de la cirugía realizada, existe una variabilidad importante entre observadores al aplicar estos términos ya que la cantidad de tejido sano que debe rodear al tumor para considerar una extirpación amplia no es unánime, pues la resección incluyendo fascia puede otorgar más seguridad que varios centímetros de espesor de tejido muscular o adiposo.

En la actualidad la clasificación de Enneking de los márgenes quirúrgicos se está sustituyendo progresivamente por la adoptada por la UICC en tres clases:

- R0: Se considera la resección tumoral con márgenes libres tanto macro como microscópicamente.
- R1: Resección con márgenes libres macroscópicamente pero se ha detectado márgenes afectos en microscopio en el examen anatomopatológico postoperatorio
- R2: Resección con residuo macroscópico, dentro de las que se englobarían las llamadas también cirugías de citorreducción.

No obstante la clasificación de las resecciones quirúrgicas proporcionadas por Enneking actualmente está siendo sustituida, cabe destacar la gran

contribución que las definiciones de márgenes quirúrgicos descritas han supuesto para el desarrollo de abordajes, planificaciones preoperatorias, técnicas quirúrgicas de resección tumoral y por supuesto, técnicas quirúrgicas cada vez más sofisticadas y técnicamente complejas para la reconstrucción posterior a la exéresis tumoral y para el *limb-sparing* o conservación de la extremidad:

- Reconstrucciones vasculares
- Injertos nerviosos
- Técnicas microquirúrgicas de cobertura plástica o injertos vascularizados.
- Megaprótesis prefabricadas y las prótesis *custom-made*

que hicieron que hoy en día más del 90% de los pacientes afectos de sarcomas óseos de las extremidades sean en un principio, candidatos a cirugía conservadora.

### 2.4.3. Técnicas de reconstrucción

El primer objetivo del tratamiento quirúrgico de los tumores músculo-esqueléticos es la resección completa del tumor. Dependiendo de la localización anatómica, de la extensión del tumor y de la agresividad histológica se diseñará una planificación preoperatoria y una estrategia de resección acorde a la complejidad de la patología, además, estos paciente presentan un problema añadido pues al tratarse de un paciente oncológico, el estado general influye en la toma de decisiones preoperatoria, teniendo en cuenta la inmunosupresión secundaria a tratamiento preoperatorio con quimioterapia o a la irradiación locorregional mediante tratamiento de radioterapia externa preoperatoria en casos seleccionados<sup>42,46,77</sup>.

En la planificación prequirúrgica de una resección ósea se deben valorar la localización tumoral y sus relaciones anatómicas, la agresividad de la neoplasia, su pronóstico vital, su estadiaje inicial, las repercusiones funcionales y estéticas de la resección, las estrategias de reconstrucción del defecto causado por la resección y las soluciones a posibles complicaciones del tratamiento, tanto de la resección como de la reconstrucción puesto que las complicaciones postoperatorias en estos paciente son relativamente comunes y frecuentes y deben ser evitadas en la medida de lo posible por el pronóstico posterior en caso de problemas graves (infecciones, lesiones vasculares, fracturas, ruptura de componentes metálicos, aflojamiento protésico, etc.) o incluso demorar tratamientos adyuvantes de quimioterapia.

Comentar que dependiendo de la localización, hay resecciones medianamente complejas que afectan huesos prescindibles como falanges, peroné, clavícula o costillas en los que la resección no requiere reconstrucción por la poca afectación funcional postoperatoria.

### **TÉCNICAS DE RECONSTRUCCIÓN**

La cirugía reconstructiva debe contemplarse desde un principio en la cirugía de los sarcomas óseos.

Los objetivos de la reconstrucción se basan en garantizar unos márgenes oncológicos negativos de seguridad y proporcionar la mayor calidad de vida posible para el paciente, teniendo en cuenta el salvaguardar la función y mantener la mejor apariencia física posible así como favorecer las terapias adyuvantes posteriores.

Las opciones de reconstrucción para el defecto óseo creado tras la resección tumoral son varias y dependen de la región resecada y de la afectación articular o no, puesto que la necesidad de la reconstrucción articular nos comprometerá la técnica a utilizar. La mayoría de los sarcomas óseos asientan en la zona metafisaria, de cara a lograr márgenes suficientes, no es raro que la resección implique la afectación de la articulación.

Las dos alternativas más habituales en la cirugía de reconstrucción de las resecciones tumorales (*limb salvage surgery*) son las llamadas megaprótesis y los aloinjertos estructurales aunque otras opciones menos frecuentes son válidas a día de hoy en casos especiales como las artrodesis, las distracciones fisarias o los transportes óseos.

La historia de la cirugía oncológica está claramente influenciada por el grupo de trabajo de Enneking, que planteó de manera pionera la resección y artrodesis, posteriormente se popularizó el uso de aloinjertos osteocondrales y más tarde la combinación de aloinjerto estructural y prótesis para minimizar las complicaciones relacionadas con el uso del aloinjerto aislado.

En la actualidad, la tendencia es el aumento progresivo del uso de prótesis tumorales o megaprótesis en la cirugía de reconstrucción así como el uso de reconstrucciones o métodos biológicos utilizando combinaciones de aloinjertos y autoinjertos vascularizados.

#### **2.4.3.1. Megaprótesis** <sup>78-85</sup>

Aunque no es el tema principal del cual trata esta tesis, cabe decir que las prótesis tumorales tienen un papel muy importante en la terapia de elección para la reconstrucción tras una resección tumoral.

Las megaprótesis ofrecen una opción válida y efectiva para la reconstrucción de un segmento articular (figura 15), además de proporcionar estabilidad inmediata y carga precoz, a diferencia de los aloinjertos y no se ven afectadas por la quimioterapia y radioterapia adyuvante. No obstante, también posee ciertas desventajas como un riesgo no menospreciable de fallo por fatiga del material y aflojamiento de los componentes a largo plazo. Otro punto a tener en cuenta son las complicaciones peroperatorias y sobretodo, el riesgo de infección ya que puede comprometer la reconstrucción realizada y requerir retiradas de implantes o incluso la amputación como solución.

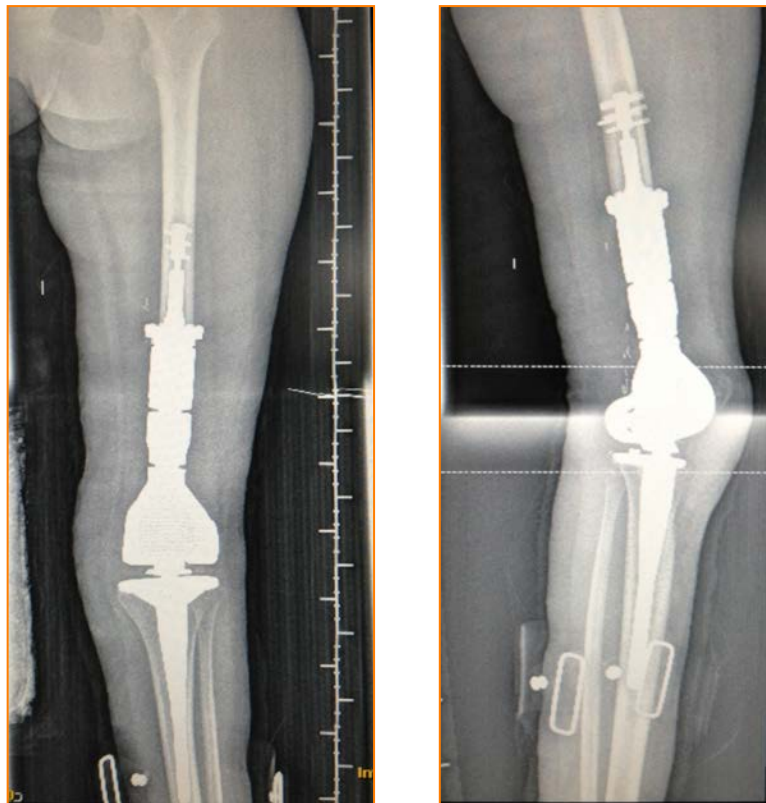


Figura 15. Reconstrucción femorotibial con megaprótesis modular de reconstrucción tumoral tras resección en bloque de osteosarcoma de metáfisis distal fémur con afectación epifisaria

Los avances en biomecánica y las mejoras en materiales (uso de collares de hidroxiapatita en interfase prótesis-hueso, bisagras articulares, prótesis expandibles, etc.), han demostrado una mejora en la supervivencia de estas megaprótesis a nivel mecánico. También a nivel de complicaciones infecciosas (como el uso de manera profiláctica de prótesis recubiertas de plata) se ha disminuido la incidencia en pacientes de riesgo.

Actualmente estos avances y las posibilidades tanto de megaprótesis *custom-made* como las prótesis elongables para edad pediátrica como la construcción de implantes con piezas modulares que pueden llegar a ofrecer la reconstrucción ósea completa de un segmento (habitualmente fémur o humero) ofrecen una mayor versatilidad para la reconstrucción con este tipo de implantes, cosa que hace que sea el método preferido por muchos cirujanos ortopédicos oncológicos.

Las prótesis expandibles son megaprótesis desarrolladas para la reconstrucción en niños en edad de crecimiento significativo, siendo dispositivos que permiten una ampliación progresiva de la longitud total de la prótesis, las más recientes se pueden alargar sin necesidad de cirugía invasiva, mediante un resorte que se activa utilizando campos magnéticos.

Referente a la cirugía reconstructiva protésica, cabe decir que, en las próximas décadas, el desarrollo de los sistemas de impresión 3D, los materiales de reconstrucción y el desarrollo del “*custom-made* protésico” serán vitales para dar un paso de gigante en el desarrollo y la evolución de estos implantes en los pacientes oncológicos, mejorando su calidad de vida y sus resultados a largo plazo.

## **OTRAS TÉCNICAS DE RECONSTRUCCIÓN**

- **Resección-Artrodesis**<sup>86-89</sup>: La fusión de la articulación es frecuentemente utilizada en tumores que afectan a la columna vertebral utilizándose injerto óseo autólogo procedente de la cresta iliaca. La artrodesis también puede considerarse en lesiones de extremidades, en pacientes y tumores seleccionados en los que dejar una articulación fija a pesar de la limitación puede ser duradera y funcional. Las articulaciones más comunes que se consideran para la artrodesis son la cadera, la rodilla y el hombro. Esta técnica no está exenta de complicaciones como la falta de unión, fractura por fatiga o infección, además de también ser un proceso largo en su rehabilitación.
- **Transporte Óseo**: El transporte óseo secuencial propuesto por Ilizarov es un método que puede ser utilizado para la reconstrucción<sup>90,91</sup>. No

obstante su uso es bastante limitado porque los grandes defectos creados tras la resección suponen unas desventajas claras:

- Tiempo prolongado de regeneración ósea,
  - Riesgo de infección por la presencia de material de fijación externa en un grupo de pacientes que pueden estar inmunodeprimidos a causa de la quimioterapia.
  - El tiempo de regeneración y la calidad del tejido regenerado pueden ser alterados por las terapias adyuvantes.
- **Distracción fisaria:** En tumores localización a nivel metafisario, la distracción fisaria propuesta por Cañadell, permite conservar la epífisis y obtener un margen seguro de resección en pacientes pediátricos con huesos largos inmaduros<sup>92,93</sup>.
  - **Esterilización del tumor**<sup>94-96</sup>: En los últimos tiempos ha habido avances en el uso del propio tumor del paciente una vez esterilizado, los métodos descritos han sido el uso de la autoclave, pasteurización, microondas, nitrógeno líquido y radioterapia. Una vez resecados todos los tejidos afectados por el tumor y siempre que el hueso no este muy dañado y tras ser esterilizado puede ser utilizado como autoinjerto estructural (similar a un aloinjerto) con la ventaja de mantener un tamaño adecuado para el espacio a reconstruir, cosa que facilita la técnica de reconstrucción, evitando la transmisión de enfermedades y teniendo un menor coste.

#### 2.4.3.2. Aloinjertos estructurales

En la actualidad la reconstrucción con megaprótesis es una de las técnicas preferidas para la reconstrucción quirúrgica tras la resección tumoral en muchos centros ortopédicos oncológicos, no obstante, el uso de aloinjertos óseos masivos congelados (IMHC), descrito por Bauer en 1910, ha sido un recurso comúnmente utilizado en la reconstrucción articular durante el último siglo (figura 17)<sup>1-3,97,98</sup>.



La sustitución del defecto óseo con injertos masivos de hueso criopreservados (IMHC) es la opción de tratamiento habitual en defectos de huesos largos de las extremidades inferiores tras la resección tumoral<sup>7,13,46,99</sup>.

Los usos principales del hueso alogénico para la reconstrucción ortopédica tras resecciones tumorales dependerán del espacio anatómico a reconstruir y se dividen básicamente en aloinjerto osteoarticular, el injerto óseo intercalar y el compuesto aloinjerto-prótesis (figura 16).

La disponibilidad de los IMHC está supeditada a la disponibilidad de los bancos de tejidos y a la adecuación de los mismos para adecuar el aloinjerto al defecto creado de hueso resecaado.

Las principales ventajas de los aloinjertos con respecto a las megaprótesis es la capacidad de restaurar el stock óseo, permitiendo ahorrar en algunos casos el sacrificio de la articulación y además proporcionar un sitio de unión-anclaje para los tejidos blandos



Figura 16. Reconstrucción ósea con injerto intercala + enclavado endomedular tras resección sarcoma Ewina diafisario

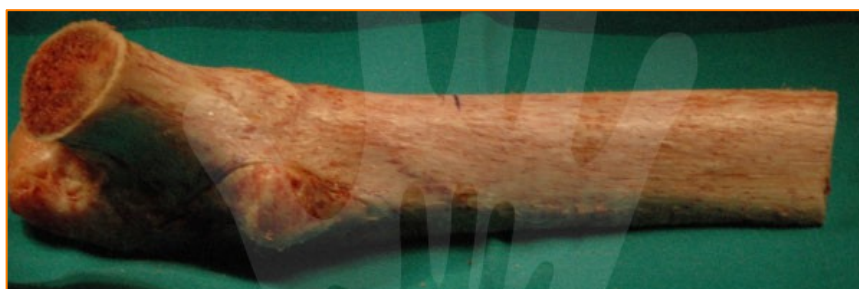


Figura 17. Aloinjerto estructural metafisodiafisario de fémur proximal. Cortesía Dr. Soldado

Sus desventaja principal es la necesidad de largos periodos de tiempo para su consolidación con el hueso huésped, cosa que provoca una minimización de la carga y la movilidad para evitar complicaciones como pseudoartrosis o fracturas del injerto. Respecto la infección postoperatoria, al igual que con la reconstrucción con megaprótesis, es una grave complicación que puede llevar a la amputación<sup>1,85</sup>. Como complicaciones tardías se presenta la artrosis degenerativa y la inestabilidad articular.

Debido a su condición de estructura avascular, su uso conlleva un alto porcentaje de complicaciones siendo las más frecuentes<sup>4,6,98</sup>:

- No unión o pseudoartrosis en la interfase injerto-huésped (15 -34%)
- Fractura del injerto óseo (27-54%)
- La infección (12 al 16%). El 50% de los injertos masivos infectados derivan en una amputación de la extremidad.

Por otro lado, como se ha comentado, estos pacientes pueden requerir el uso de soporte ortopédico externo o muletas de descarga de forma permanente puesto que los IMHC no se integran y no adquieren la resistencia fisiológica del hueso sano. El resultado es una limitación relevante de la calidad de vida y de la capacidad de desarrollo de las actividades diarias.

La combinación de aloinjerto y prótesis tiene la ventaja de unir la estabilidad que proporciona la prótesis a la posibilidad de reinserción de partes blandas de cara a mejorar la función articular<sup>100,101</sup>.

Hoy día el uso de aloinjerto sigue siendo una técnica de reconstrucción eficiente para preservar el stock óseo y la superficie articular.

En los últimos años el desarrollo y mejora de técnicas de reconstrucción microquirúrgicas <sup>8,102-104</sup> ha supuesto un enorme desarrollo en el proceso de reconstrucción de grandes defectos mediante los colgajos microvasculares pediculados, libres y las transferencias musculares, éstas técnicas han sido desarrolladas en la reconstrucción ósea de cara a mejorar los resultados y pronósticos quirúrgicos, tanto de manera aislada<sup>105</sup> como asociado técnicas microquirúrgicas a los IMHC <sup>11,12,106</sup> para mejorar su evolución postoperatoria

y su supervivencia. El conocimiento de la biología y el desarrollo de estas técnicas han abierto las puertas a las llamadas reconstrucciones biológicas.

#### **2.4.3.3. Reconstrucciones biológicas**

El inicio de las técnicas biológicas de reconstrucción deriva de la viabilidad y reproducibilidad de los colgajos microquirúrgicos y su supervivencia tras la anastomosis microquirúrgica.

Östrup y Fredrickson en 1974<sup>107</sup> describen la transferencia de injerto óseo vascularizado reportando una excelente capacidad osteogénica de los mismo, poco después Doi K et al. en 1977<sup>108</sup> confirman el uso de estos injertos de modo experimental en perros y su viabilidad.

Aunque es una técnica compleja que debe ser realizada por cirujanos experimentados en las técnicas microquirúrgicas, durante los últimos años se ha popularizado el uso de injertos vascularizados para las reconstrucciones de defectos óseos<sup>102,109-112</sup> de diversas procedencias de huesos “prescindibles” como costillas, escapula, etc. aunque sin duda el más utilizado es el injerto de peroné vascularizado (IPV) que permite obtener un injerto vascular de gran tamaño (alrededor de los 20 cm) con consistencia y un gran potencial de regeneración ósea y potencial de consolidación<sup>11,106</sup>.

No obstante las complicaciones en la zona dadora de peroné son poco frecuentes, existe una comorbilidad asociada tras la utilización de colgajos libres de peroné que pueden condicionar posteriormente el pronóstico de la zona dadora, siendo una de las más frecuentes la deformidad en valgo del tobillo post-extracción del injerto, y que han sido descritas en casos en la literatura<sup>113-116</sup>. Además, el peroné vascularizado a menudo no es lo suficientemente fuerte para soportar la carga después de la reconstrucción de grandes defectos en especial en las extremidades inferiores por lo que las fracturas no son infrecuentes.

En un intento de mejorar la incorporación e integración de los IMHC, el grupo de Capanna describieron la técnica para combinar el injerto vascularizado de peroné (IPV) introducido a nivel de la medular de los aloinjertos estructurales para combinar el aporte biológico del IPV y proporcionar estabilidad estructural adicional a la ofrecida por los IMHC en la reconstrucción de defectos masivos (figura 18) <sup>8,117</sup>.

Según diversos estudios en la literatura, la asociación de un injerto de peroné vascularizado (IPV) al IMHC, disminuye la tasa de complicaciones con un descenso sustancial de la tasa <sup>8,11</sup> de no unión del injerto estructural en resecciones tumorales (34% al 8,8% de no uniones). Se ha estimado que en la población pediátrica, el peroné vascularizado consolida en un tiempo medio de 5.4 meses y el aloinjerto se integra a los 19.1 meses<sup>12</sup>.

La obtención del injerto vascularizado de peroné hoy día tiene una gran importancia en la reconstrucción biológica de grandes defectos y resecciones masivas, pero debido a la potencial morbilidad en la zona dadora junto con el mejor conocimiento de la biología, la anatomía y la gran capacidad osteogénica del periostio ha dado lugar a la descripción de injertos vascularizados corticoperiosticos como el descrito por Sakai et al. a nivel del cóndilo femoral <sup>109,110</sup>, que permite la asociación del periostio circundante con una capa cortical fina que no afecta la capa profunda (cambium) del periostio y permite cubrir defectos con un mínimo componente estructural en adultos, pues también permite obtener mejor funcionalidad del periostio en adultos, donde su capacidad osteogénica es más limitada y si disección más compleja.



**Figura 18.** Reconstrucción biológica tras resección tumoral de sarcoma de Ewing diafisario según técnica descrita por Capanna asociando IPV + aloinjerto estructural. Cortesía Dr. Soldado

En la búsqueda del refinamiento de la técnica quirúrgica y el descenso de la morbilidad quirúrgica, Soldado et al <sup>14,15</sup> describieron el injerto libre de periostio peroneal realizando una disección fina de la unión perióstico-ósea conservando la capa de *cambium* en el injerto vascularizado sin la necesidad de extirpar el componente óseo del peroné.

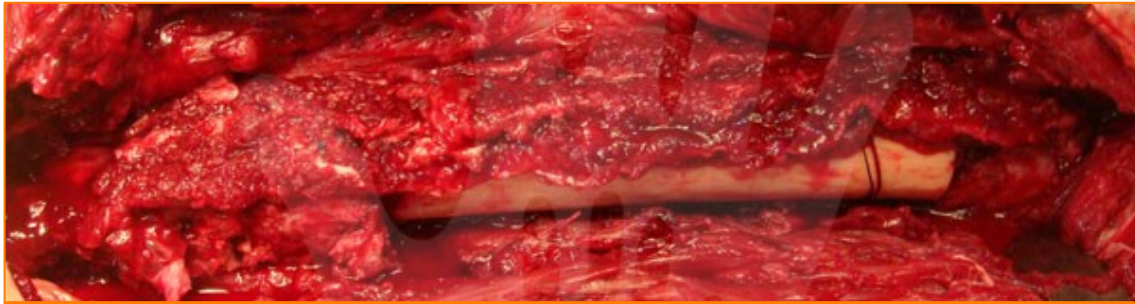


Figura 19. Asociación de aloinjerto estructural con injerto vascularizado de perióstico fibular según técnica descrita por Soldado et al.

Debido a las características necesarias para la disección y obtención de un injerto vascularizado perióstico, esta técnica esta descrita para realizarse de manera óptima en la edad infantil, donde también se reúne gran parte de la patología oncológica ósea. Obviamente, al tratarse de un injerto de partes blandas, no ofrece un soporte estructural para la reconstrucción de defectos óseos por lo que su indicación para la reconstrucción de éstos defectos es obtener un gran aporte osteogénico y mejorar la consolidación e integración de aloinjertos masivos (IMHC) que ofrecería el soporte estructural necesario (figura 19).

En resumen de las reconstrucciones biológicas se podría hablar de tres posibilidades técnicas para la reparación de grandes defectos óseos tras resecciones masivas:

- El uso del peroné vascularizado (IPV), la técnica con más experiencia y seguimiento y que permite dar soporte y función biológica (asociado o no a IMHC)
- Los injertos corticoperiásticos que ofrecen menor morbilidad que la exéresis del peroné integro, ofreciendo un mínimo soporte estructural y que para las grandes resecciones tumorales debe ir asociado a aloinjertos estructurales.



- Por último, la técnica más innovadora de colgajo de periostio libre que ofrece un potencial osteogénico importante, una mayor área de cobertura tisular por el tamaño viable de obtención del colgajo pero que debe utilizarse asociado a un IMHC que le proporcione soporte estructural a la reconstrucción ósea (figura 20).



Figura 20. Combinación de aloinjerto estructural y perióstico vascularizado. Medición de tamaño para su implantación en la reconstrucción post-resección tumoral.

Esta evolución nos lleva pues al propósito de estudio de esta tesis, donde se intentará hallar evidencia científica de los cambios que pueden derivarse de la asociación de un injerto estructural avascular como es un IMHC junto con el aporte de un colgajo de periostio libre en la reconstrucción de un defecto masivo a nivel experimental en un modelo animal <sup>118</sup> para su aplicación clínica en pacientes afectos de sarcomas óseos.



# 3.- Hipótesis de trabajo





### 3.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

*“ La asociación de la membrana perióstica vascularizada a los injertos masivos de hueso criopreservado en el tratamiento de grandes defectos óseos contribuye a la consolidación y revascularización del injerto óseo y su asimilación por el huésped.”*



# 4.- Objetivos de la tesis



#### 4.- OBJETIVOS DE LA TESIS

1. Refinar un modelo animal superior de defecto masivo óseo y reconstrucción con aloinjerto masivo y aporte de periostio vascularizado para el estudio de la revascularización de injertos criopreservados (IHMC).
2. Analizar la capacidad del periostio vascularizado de consolidar y revascularizar los IHMC.
3. Generar elementos de evidencia experimental en los mecanismos de integración de injertos óseos masivos tras la asociación con periostio vascularizado.



## 5.- Material y métodos



## 5.- MATERIAL Y METODOS

### 5.1. MATERIAL

#### 5.1.1. Animal

Para realizar este estudio se han utilizado 46 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza New Zealand White (figura 21) tanto machos como hembras con unas edades comprendidas entre las 8 y 10 semanas de edad en el momento de la cirugía con un peso corporal alrededor de unos 1,80 – 2kg de la Granja San Bernardo (Tulebras, Navarra).



Figura 21. Conejo Raza New Zealand White.

Aún teniendo todos los prerequisites de higiene y sanidad por parte de la granja (figura 22), los especímenes de conejo se estabularon en jaulas separadas con un solo animal en cada una procediéndose a una cuarentena de los mismos durante 15 días (los conejos fueron estabulados entre la 6 y 8 semana de vida).

Ningún animal se había utilizado previamente en la realización de ningún estudio y ningún espécimen fue excluido del estudio.

Los animales fueron alimentados con pienso específico para conejos y agua *ad libitum* en cada una de las jaulas. Así mismo se realizó control cualitativo de excreciones (tanto



Figura 22. Caja de transporte animal previa estabulación

deposiciones como micciones) para cada conejo. La estabulación se realizó en el mismo habitáculo (figura 23) con una temperatura constante de 22° y con un horario de luz/oscuridad de 12 horas alternas siguiendo el ritmo circadiano diario con periodos de anochecer/amanecer de 30 minutos.

Todos los procedimientos experimentales se adhirieron a las recomendaciones de las leyes tanto locales como nacionales y europeas (el Decret 214/1997, el Real Decreto 233/1988 y la Directiva Europea 86/609/1986 respectivamente) y a los estándares de atención establecidos por la *National Institutes of Health (Guide for Care and Use*



Figura 23. Puerta entrada de zona estabulación Conejos en VHIR

*for Laboratory Animals*, publication n. 80-23, revised 1985). El proyecto al que hace referencia esta tesis también fue aprobado en 2012 por el *Comité de Ètica i Experimentació Animal (CEEA)* con número de registro 11/12 CEEA del *Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebrón (IR-HUVH)*. El proyecto obtuvo la concesión de una beca por la Fundación Mutua Madrileña a cargo del Dr. Francisco Soldado Carrera, siendo éste el principal investigador (IP) y responsable máximo de la propiedad intelectual del proyecto.

### 5.1.2. Instalaciones (figura 24)

Los animales pertenecientes al estudio se estabularon como se ha mencionado en la misma habitación en jaulas individuales con 1 conejo cada una en el Estabulario del *Institut de Recerca Vall d'Hebrón (IR-HUVH)* durante todo el procedimiento (IR-HUVH-Número de Registro DMAH (Departament de Medi Ambient i Habitatge): B9900062), siendo también los quirófanos de grandes animales del estabulario dónde se realizaron las intervenciones quirúrgicas tanto para el procedimiento experimental como la obtención de los injertos estructurales.

El seguimiento posterior de los conejos hasta el punto final del estudio fue realizado en las mismas instalaciones con el conejo estabulado en la misma caja durante todo el estudio. Los injertos estructurales se preservaron congelados a -70°C en el congelador del estabulario (Sala de frío del *Institut de Recerca IR-HUVH*)

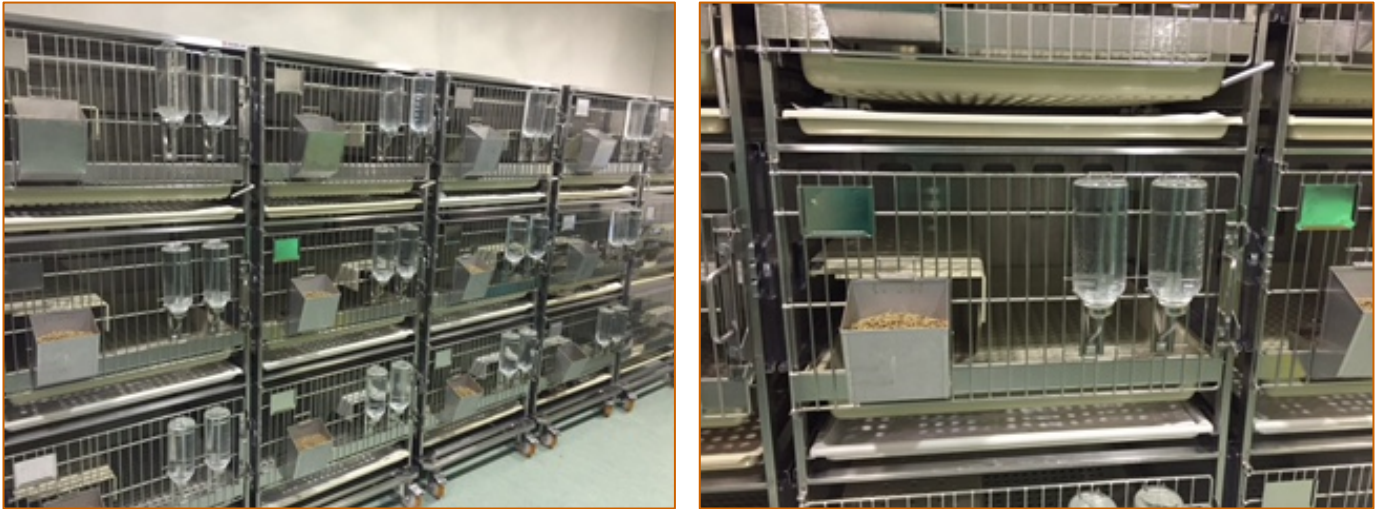


Figura 24. Jaulas de estabulación de los conejos de experimentación.

### 5.1.3. Instrumental para la cirugía

Para llevar a cabo las intervenciones quirúrgicas y la toma de muestras se requirió instrumental quirúrgico debidamente esterilizado previamente del cual se detallan los componentes a continuación.

1. Caja base de instrumental quirúrgico (figura 25)
  - Mango de bisturí n° 11 y n° 23
  - Tijeras de Mayo
  - Tijeras de Metzembraun
  - Pinzas fina tipo Adson
  - Pinza anatómica
  - Pinzas tipo Mosquito y Kocher.
  - Porta-agujas
  - Pinza gubia
  - Periosteotomo tipo McDonald
  - Disector neurótomo
  - Pinzas y porta-agujas microcirugía
  - Separadores ortostáticos pequeños
  - Separador tipo Pincet para campos quirúrgicos
  - Aguja Kirschner 0,8mm
  - Sutura absorbible Johnson & Johnson Ethicon™ Vicryl® plus 4-0 70cm Aguja RB-1 plus

- Sutura absorbible Johnson & Johnson Ethicon™ Vicryl® 3-0 40cm
- Aguja intramuscular 20/22 G
- Gasas
- Tallas estériles



Figura 25. Ejemplo de Mesa de instrumentación quirúrgica

## 2. Lupas Aumento 2,5x Keeler® (figura 26)



Figura 26

3. Fresa a motor de mano de cabezal intercambiable Dremel® Series 200 (figura 27)



Figura 27

4. Spray de polvo micronizado Aluminio (Aluspray® Vêtoquinol) para aislamiento y antisepsia de herida (figura 28)



Figura 28



#### 5.1.4. Material complementario

1. Aparato de radiofluoroscopia portátil GE Medical Systems GE OEC Fluorostar. (GE OEC Medical Systems Inc. USA-Salt Lake City-UTAH 84116) (figura 29)



2. Ultrasonógrafo portátil MindRay M7 (senzhen Mindray Biomedical Electronics Co. Ltd. Nanshan, Shenzhen, China)



3. Sonda transductor lineal L14-6Ns 8-12mHz (schezhen Mindray Biomedical Electronics Co. Ltd. Nanshan, Shenzhen, China)
4. Aguja de estimulación nerviosa ecogénica 22G x50mm (Echoplex® , Vygon, Ecouen, Francia)
5. Neuroestimulador Stimuplex® HNS 12 (B.Braun, Melsungen, Alemania).
6. Pulsioxímetro
7. Respirador para control de constantes

## 5.2. MÉTODOS

### 5.2.1. Cuidados preoperatorios

El conejo se transportaba directamente de la granja donde se criaba hasta el estabulario del *Institut de Recerca* en un vehículo debidamente acondicionado a tal efecto. Una vez al llegar al estabulario, el espécimen era colocado en su jaula correspondiente durante 10 días para la aclimatación y pasar la cuarentena. Una vez realizada la cuarentena y verificado el correcto estado de salud del animal, se pesaba y se introducía dentro del protocolo del estudio.

El día previo a la cirugía se rasuraba la región occipitocervical colocándose parche de Fentanest® (fentanilo) (dosis) para inicio de control analgésico durante la cirugía y en el postoperatorio inmediato.

El día de la programación quirúrgica, el conejo era trasladado de la jaula en la sección de lagomorfos al quirófano de grandes animales. Cabe decir que en el periodo preoperatorio y debido a las características de los animales, éstos no se encontraban en ayunas a diferencia de otros animales de experimentación.

### 5.2.2. Técnicas de anestesia

Al inicio del proyecto de investigación se decidió realizar la cirugía bajo anestesia general e intubación orotraqueal de los animales, no obstante, es una técnica difícil por las características anatómicas de las vías respiratorias del conejo y por su difícil control, necesitando una atención constante por parte del equipo de veterinaria. Tras observar las dificultades que suponía en la realización de las primeras cirugías en los conejos del estudio piloto, se valoró la posibilidad de asociar una sedación con un bloqueo locoregional axilar ecoguiado para llevar a cabo la anestesia intraoperatoria. Este refinamiento de la técnica empleada



Figura 31. Dra. Anna Server realizando el bloqueo axilar al conejo previa intervención quirúrgica



en la anestesia de lagomorfos no estaba descrito en la literatura por lo que basándose en la experiencia en humanos, el equipo de veterinarios junto con la Dra. Anna Server de anestesiología realizamos la anestesia locorregional ecoguiada del plexo axilar (figura 31 - 32) en especímenes de conejos<sup>119</sup> tanto del estudio al cual se refiere esta tesis como en otros especímenes estabulados comprobando que era una técnica segura, factible y reproducible para llevar a cabo la anestesia regional del conejo, por lo que se decidió cambiar el protocolo de anestesia del proyecto restando así:

- Día previo:
  - Parche fentanilo (Fentanest®) ½ parche 25 µg.
- Día Cirugía:
  - Sedación con Ketamina 35-50mg/kg + Midazolam 2mg/kg vía subcutánea en la misma jeringa
  - Fluidoterapia 10mL/kg/h.
  - Bloqueo axilar ecoguiado con Ropivacaína 10mg/mL (0,4%) 3-4mL según peso del animal.
- Día 1-2 postoperatorio
  - Analgesia postoperatoria añadiendo Metamizol 0,4mL im/8h.
  - Ceftriaxona 0,25mL im cada 24 horas.

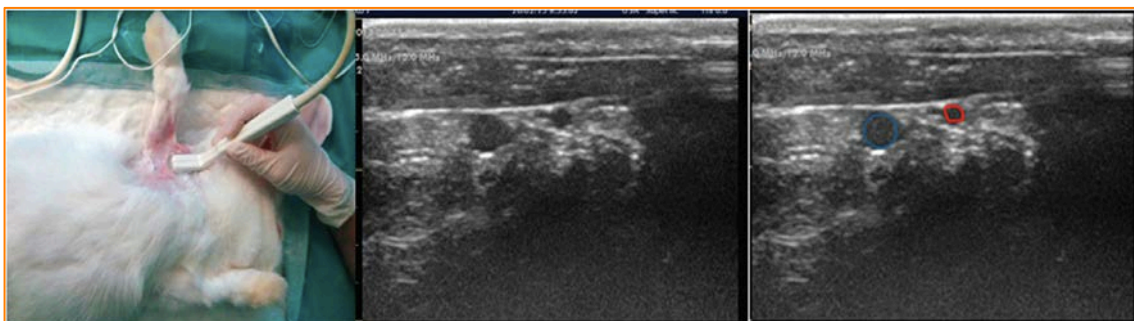


Figura 32. Detalle de la técnica del bloqueo axilar ecoguiado en el conejo. Detalle en azul vena axilar y en rojo arteria axilar

### 5.2.3.Preparación campo quirúrgico

Tras el traslado de la jaula al quirófano, se procedía al rasurado de la extremidad a intervenir (pata delantera derecha) del animal tras el inicio de la sedación. Una vez dentro del quirófano, el animal se colocaba en decúbito lateral monitorizando la frecuencia cardiaca, respiratoria y la temperatura.

Una vez colocado el animal y comprobada la correcta función del bloqueo sensitivomotor de la extremidad a intervenir, se realizaba la desinfección y asepsia de la extremidad con povidona alcohólica de la extremidad hasta la axila iniciando el entallado quirúrgico estéril con tallas de tela realizando un cierre completo de la extremidad aislándola del resto del cuerpo del animal.

Tras el entallado se procedía a una nueva tintura con povidona alcohólica y al lavado quirúrgico de los cirujanos así como la preparación de la mesa quirúrgica de instrumental para el inicio de la cirugía. Dentro de la preparación de la mesa quirúrgica también se procedía al descongelamiento en suero fisiológico del injerto óseo estructural.

### 5.2.4.Técnica quirúrgica



Figura 33. Incisión longitudinal sobre el antebrazo derecho del animal

Previo al inicio de la cirugía y como prevención del sangrado se realizaba expresión retrógrada de la extremidad y isquemia de la misma con un torniquete elástico.

El abordaje quirúrgico del radio se realizaba con la pata del animal en supinación de 90° realizando una incisión longitudinal al eje del radio de unos 35mm de longitud a nivel cutáneo (figura 33), una vez realizada la incisión cutánea se procedía a identificar las diferentes ramas venosas superficiales. Tras la apertura de la fascia superficial

se identificaba la decusación del músculo abductor largo del primer dedo (*abductor digiti I longus*) a nivel distal y el espacio entre el *extensor carpi radialis* y el *flexor carpi radialis*, una vez identificado se realizaba una disección cuidadosa de los mismos asegurando la integridad del periostio dorsal del radio. La disección se proseguía hasta proximal hasta la inserción distal del músculo *pronator teres* ampliando unos milímetros a proximal entre el *flexor carpi radialis* y el *pronator teres* para dejar una correcta visualización del radio tanto a nivel proximal como distal (figura 34 y 35).

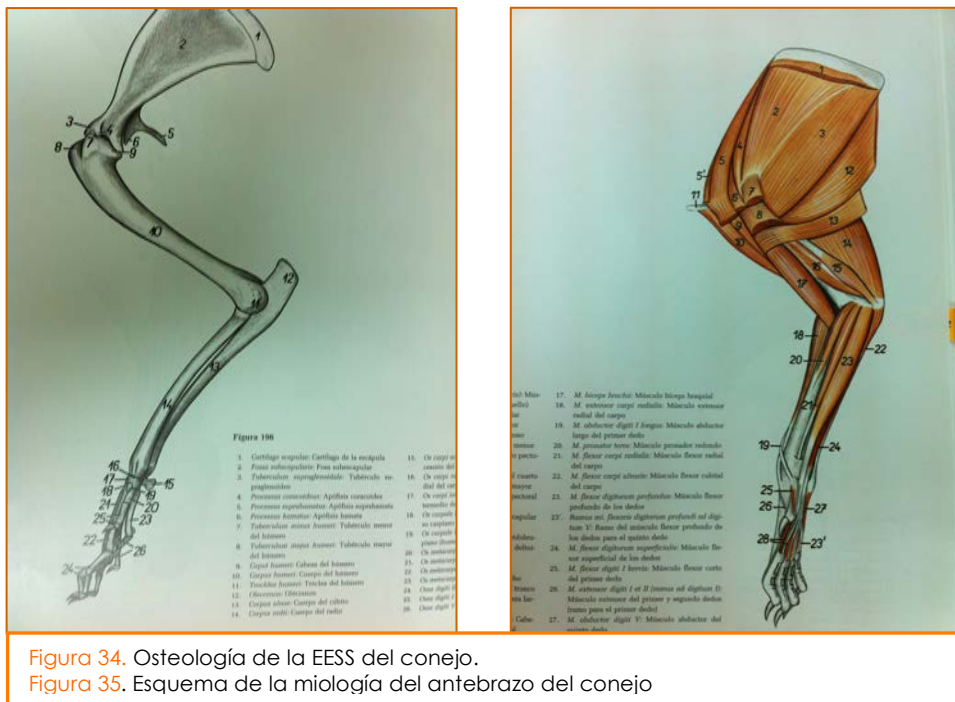


Figura 34. Osteología de la EESS del conejo.  
 Figura 35. Esquema de la miología del antebrazo del conejo

Una vez expuesto el radio se procedía a planificar la osteotomía en la diáfisis radial midiendo una longitud de 10-12mm para la resección ósea (figura 36). Una vez planificada la osteotomía se procedía a la apertura longitudinal del periostio radial ampliando con una incisión transversal (en libro abierto) manteniendo un margen de 5 mm tanto proximal como distal respecto a la medida planificada del defecto óseo radial para impedir la confluencia del periostio seccionado con el margen de la osteotomía y el injerto estructural en los grupos de control.



Figura 36. Exposición del subcutáneo con el radio expuesto en el lecho (incluyendo el perióstico)

Según el grupo al que pertenecía el espécimen, en este punto de la cirugía se realizaban dos pasos diferentes que se detallan a continuación:

- **Grupos experimentales (GP5, GP10, GP20):**

Una vez aislado el periostio y realizada la apertura del mismo se procedía a la disección meticulosa del mismo, tanto a nivel dorsal como la zona proximal y distal de las incisiones transversales. A nivel ventral en la confluencia del periostio y la membrana interósea, se realizaba una disección roma con periosteotomo, separando el mismo para proceder posteriormente a la osteotomía radial y creación del defecto, manteniendo la integridad del tejido perióstico circunferencial.



Figura 37. Osteotomía de radio con detalle del injerto estructural para cubrir el defecto

- **Grupo control (GC5, GC10, GC20):**

Tras el marcaje y la apertura longitudinal del periostio, éste no se disecaba sino que se procedía directamente a la osteotomía y creación del defecto en un intento de extirpar conjuntamente el hueso nativo con su periostio respectivo. Una vez realizado el defecto, a nivel de los márgenes proximal y distal y en la zona fijada previamente para los márgenes de seguridad de periostio se reseca el tejido perióstico circundante.

Tal como se ha comentado previamente en el material, el motor utilizado era un motor de fresa oscilante con un cabezal de punta estrecha de 1mm, este ancho de la fresa se ha tenido en consideración, realizándose la osteotomía con un margen marcado hacia el hueso a reseca para homogeneizar los tamaños de los defectos creados.

Una vez realizada la osteotomía radial y el defecto óseo (figura 37), se realizaba la preparación del aloinjerto estructural previamente descongelado



para su adaptación al defecto óseo existente, estableciendo un contacto correcto entre las interfases huésped-injerto.

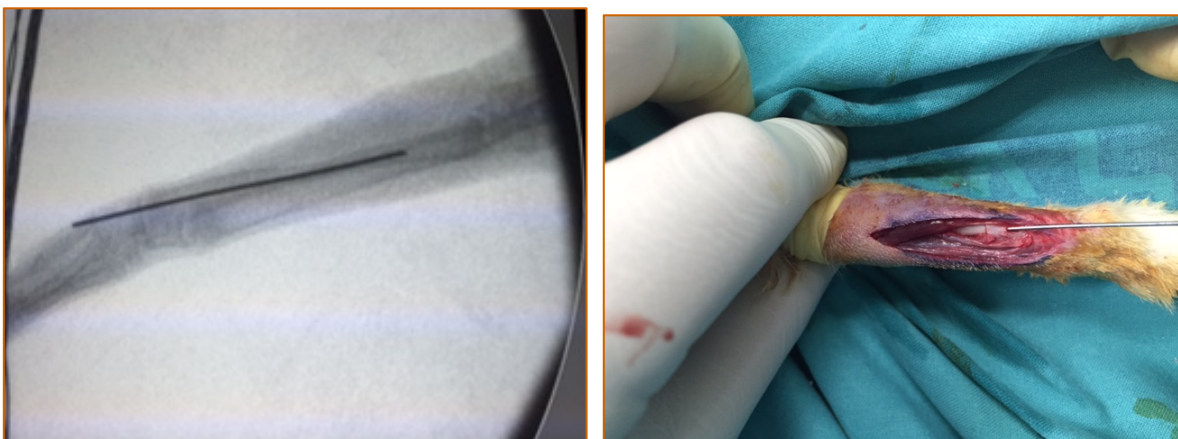
Posteriormente a la implantación del aloinjerto estructural en la zona receptora, se realizaba la estabilización primaria del injerto mediante osteosíntesis endomedular con una aguja de Kirschner de 0,6mm de diámetro bajo control escópico intraoperatorio a través de un túnel fresado proximal a la zona de osteotomía (figura 38).



Figura 38. Imagen de la síntesis con AK de la reconstrucción hueso huésped-injerto estructural.

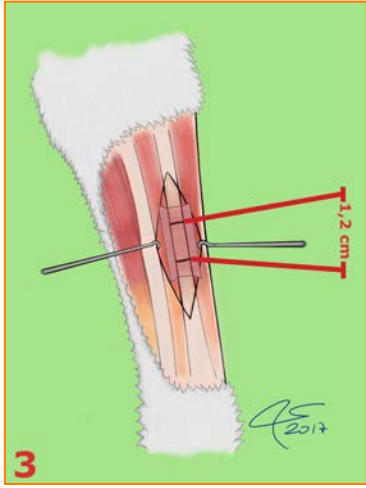
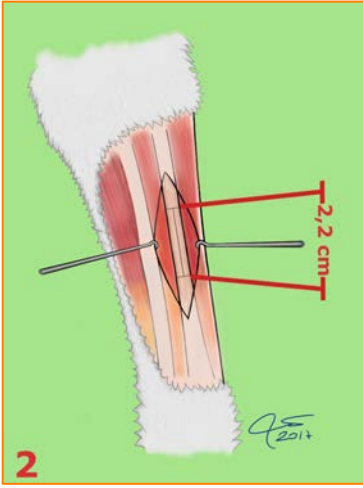
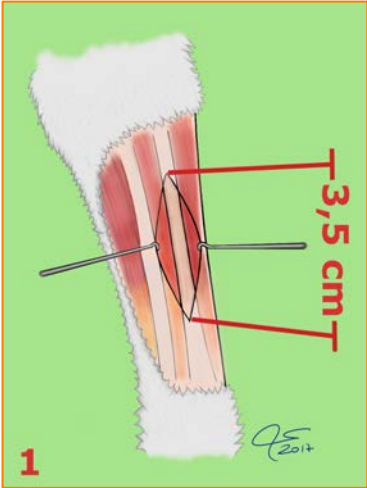
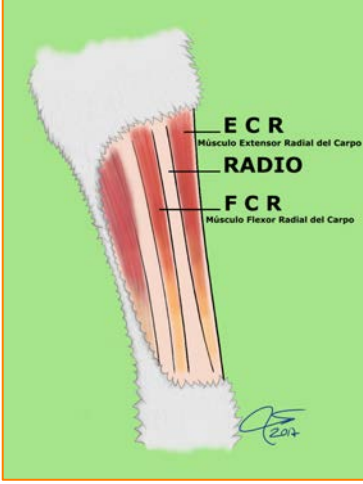
Tras la comprobación de la estabilidad de la síntesis y la correcta posición intramedular en dos proyecciones (anteroposterior y perfil) (figuras 39 y 40) se procedía al cierre del periostio nativo (en los grupos con periostio vascularizado) con hilo reabsorbible trenzado Vicryl® de 4-0 y tras la retirada del torniquete y la hemostasia primaria de puntos de sangrado, se realizaba el cierre por planos de fascia y piel en todos los especímenes con hilo reabsorbible Vicryl® 3-0 mediante sutura intradérmica.

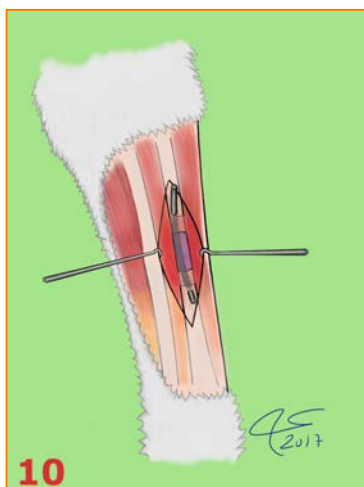
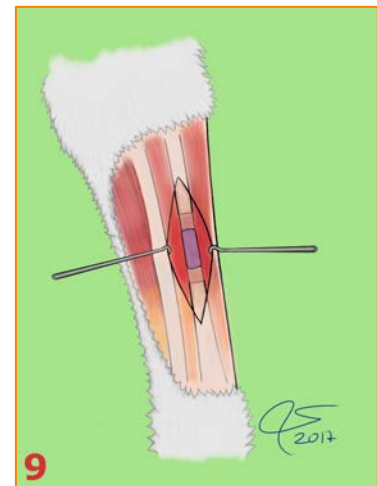
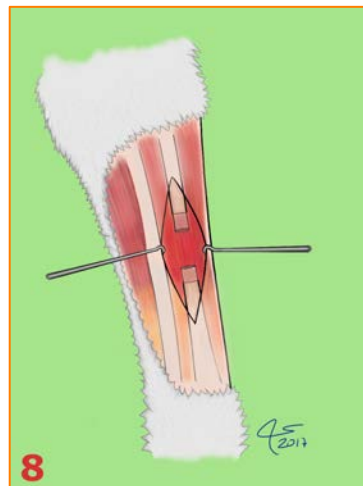
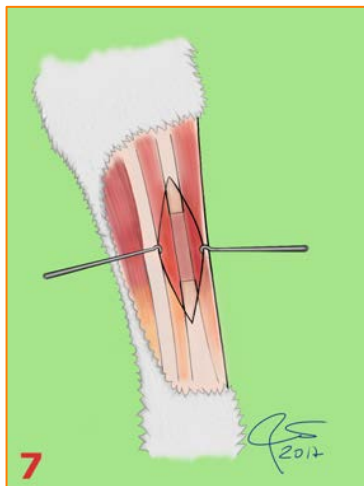
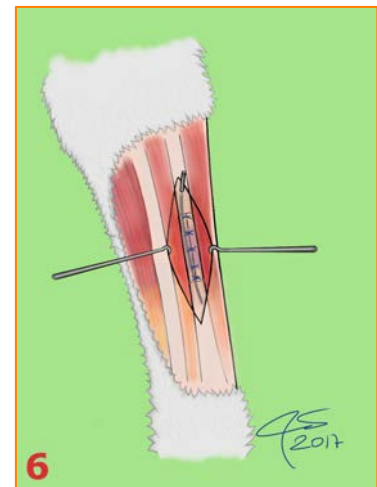
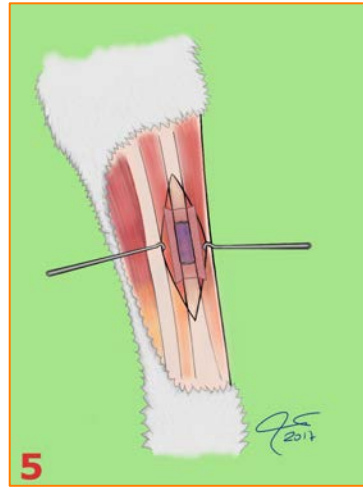
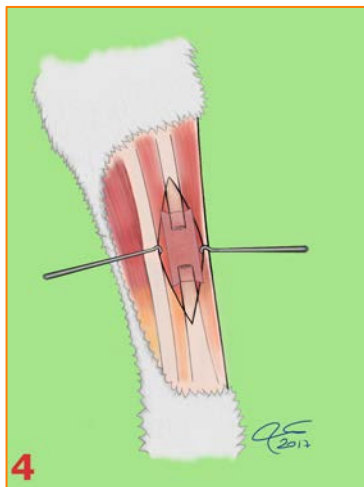
Una vez realizado el cierre de la herida sin sangrado activo se realizaba una limpieza de la piel con peróxido de hidrogeno y la pulverización de aluminio en suspensión para distraer la atención del animal a la herida quirúrgica y mantener una correcta antisepsia.



Figuras 39 y 40. Comprobación clínica y escópica de la correcta colocación de la AK para mantener la estabilidad de la reconstrucción.

# Técnica Quirúrgica





**Figura 41.**  
 Representación de la técnica quirúrgica de resección y reconstrucción de defecto en radio en el modelo animal.  
 Cortesía del Dr. Xavier Cuscó

Dibujos 4-5-6 Reconstrucción con IMHC grupo perióstico (GP)  
 Dibujos 7-10 Reconstrucción con IMHC grupo control (GC)

### 5.2.5. Cuidados postoperatorios, evolución y seguimiento

Una vez terminada la intervención y realizado el cierre de la herida quirúrgica, se realizaba una segunda comprobación escópica de la correcta situación de la aguja de Kirschner y la estabilidad del injerto.

Durante el estudio piloto se había decidido colocar un vendaje funcional en la pata intervenida para aislamiento de la misma aunque debido a los problemas que generaba por la limitación de movilidad y por la ansiedad que creaba a los conejos, se decidió retirar cualquier tipo de vendaje, aislando únicamente la herida con la pulverización de aluminio, sin haber observado un aumento de la tasa de infección postoperatoria.

Se mantenía al conejo en observación dentro del quirófano hasta la reversión de la sedación y el inicio de la deambulación autónoma. Una vez realizaba pasos por el quirófano, aun persistiendo el bloqueo locorregional axilar de la pata delantera derecha, se trasladaba al animal a su jaula para que prosiguiera su estabulación y el inicio de la tolerancia de comida y agua.

Previo al despertar del conejo de la sedación se administraba la primera dosis de analgesia postoperatoria para control del dolor y se administraba la primera dosis de antibiótico.

El seguimiento y la administración del tratamiento postoperatorio de los conejos se realizaba por el doctorando y el personal veterinario del estabulario. El seguimiento se realizaba diariamente durante la primera semana para posteriormente durante todo el proceso de estabulación realizar controles más espaciados en el tiempo de manera semanal si la evolución que presentaban era la correcta durante los primeros días.


Se evaluaron la condición corporal, la apariencia física, los comportamientos (tanto provocados como espontáneos) y la herida quirúrgica. También se realizó la medición del peso los 3 primeros días y posteriormente semanalmente hasta el final del estudio así como el control de entradas y salidas y el control de la temperatura. En caso de alguna alteración en algún parámetro se consensuaba con el equipo para valorar la actitud a seguir con el espécimen en cuestión.



A continuación se muestran las hojas de seguimiento consensuadas por el personal perteneciente al estudio (doctorando, investigador principal, colaboradores y personal de veterinaria) tanto de la condición de los conejos como del control del seguimiento postoperatorio (figuras 42 y 43):

SEGUIMIENTO DIARIO CONEJO

Identificación animal: *R5 20*  
 Peso día cirugía: *3,97g*



| PARAMETRO / FECHA / INICIALES   |  |                      |   |   |   |   |   |   |   |
|---|--|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Control peso  | Normal   | 0                    | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|   | +10% pérdida peso  | 1                    | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|   | +20% pérdida peso  | 2                    | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
|   | +25% pérdida peso  | 3                    | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Condición corporal  | Buena, vellónes, hules pelicos o equal no presentats                         | 0                    | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|   | Regular: evidencia de segregación de sudores ventral, Puntos débils catalats | 1                    | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|   | Disminución: equitido adherido a la mancha, pelo e irregular sobre pelo adms | 2                    | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
|   | Anormal: pelo escudo y hules, que brillants                                  | 3                    | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Apariencia física   | Normal: pelo sano y brillante, que brillants                                 | 0                    | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|   | Discrepancia: entubamiento, pelo de brillo                                   | 1                    | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|   | Pelo en mal estado: hules resaca y entubats                                  | 2                    | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
|   | Pelo en muy mal estado: alopecias, pagles, dilaats                           | 3                    | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Comportamiento no provocado   | Normal: actua e interactua en su ambiente                                    | 0                    | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|   | Signo discrepancia en la actividad y movs. intencionales                     | 1                    | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|   | Anormal: gran movilidad discrepancia en la actividad                         | 2                    | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
|   | Anormal: hules e hiperactividad, posturas anormales y posturas autolesivas   | 3                    | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Comportamiento provocado  | Normal: escape espontaneo  | 0                    | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|   | Estancamiento de la respuesta  | 1                    | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|   | Anormal: escape después de un corto periodo de tiempo                        | 2                    | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
|   | Anormal: no se movien e reaccionan con respuesta exagerada                   | 3                    | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Herida quirúrgica   | Buen estado  | 0                    | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|   | Regular  | 1                    | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|   | Mal estado   | 2                    | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Estabilidad de la fijación y osteotomía: comprobación clínica.              | Estable  | 0                    | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|   | Desplazamiento a la movilidad, estructura inestable                          | 1                    | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|   | Instabilidad excesiva, deformidad, exposición material implantado            | 2                    | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Estabilización de la osteotomía: comportamiento del conejo en campo abierto | Prosp  | no evaluado en el D1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|   | Temple   | 1                    | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|   | No se ve   | 2                    | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Estabilidad de la fijación y osteotomía:                                    | No movilidad fragmentos. Signos complicación                                 | no evaluado en el D1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|   | Instabilidad: inest. fragmentos  | 1                    | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|   | Fractura, movilidad excesiva, reacción fuerte                                | 2                    | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Observaciones   |  |                      |   |   |   |   |   |   |   |


SEGUIMIENTO DIARIO CONEJO

PROYECTO: *Implantación de aloinjerto + peristio vascularizado en radio de conejo*

CEEA: 11.12

Identificación animal: *R5 20*      Fecha cirugía: *30/10/2013*

Peso día cirugía: *3,97g*      Grupo experimental: *aloinjerto / aloinjerto con peristio vascularizado*



| PARAMETRO / FECHA / INICIALES     |                        |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----------------------------------|------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Antibiótico                       | <i>31/10/13 AL</i>     |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Analgésico                        |                        |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Comer/ Bebe                       |                        |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Premio/ Enriquecimiento ambiental |                        |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Heces/Uriña                       |                        |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Apoyo extremidad operada          |                        |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Sedación (farmaco, hora)          |                        |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Cambio vendaje/ tipo vendaje      |                        |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Escopía                           |                        |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Temperatura rectal (°C)           |                        |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Observaciones                     | <i>CHETRADO MUERTO</i> |  |  |  |  |  |  |  |  |

Figuras 42 y 43. Tablas de seguimiento postoperatorio de los conejos intervenidos

### 5.2.6. Protocolo de eutanasia y obtención de muestras

Durante la realización del estudio se han producido la pérdida de especímenes viables en el postoperatorio inmediato por diversas razones, siendo la principal causa el sangrado masivo con desestabilización del sujeto y fallo multiorgánico. Estas pérdidas estaban contempladas dentro del proyecto del estudio sin variar el numero de especímenes a intervenir.

No se han observado exitus de los animales a causa de infección postoperatoria grave, no obstante, en la memoria previa realizada se establecieron los criterios de punto final del estudio mediante la evaluación de los ítems de la hoja de seguimiento postoperatorio.

Los criterios de punto final establecidos fueron:

- Cuando cumple la fecha prevista para estudio morfológico
- Cuando se observe un fracaso de la estabilidad o viabilidad del procedimiento quirúrgico
- Cuando se establezca un proceso séptico que no responda al desbridamiento quirúrgico o antibioticoterapia.
- Cuando, según los criterios de seguimiento expuestos previamente se observe que el animal padece sufrimiento o dolor que no responda a los métodos disponibles en ese momento.

Dependiendo del grupo de estudio al que pertenecía el conejo, una vez finalizado el periodo de experimentación y estabulación, se preparaba el animal para su eutanasia , realizando en primer lugar una sedación con la misma preparación de ketamina y midazolam para posteriormente mediante la inyección de pentobarbital sódico ocasionar la muerte del animal.

Una vez realizada la eutanasia del animal se inicia el proceso de obtención de muestras, realizando un ultimo estudio radiológico mediante el fluoroscopio para valorar la integración radiológica del injerto y su evolución hasta el punto final del estudio. Posteriormente se procedía a la disección de la extremidad delantera derecha para la obtención de la pieza de resección que incluía ambos huesos del antebrazo (cúbito y radio) disecados y aislados de la

musculatura periférica. Una vez realizada la disección de los tejidos adyacentes se procedía al estudio macroscópico de la muestra tomando fotos de la pieza para su posterior evaluación y obtención de resultados.

Una vez realizado el estudio macroscópico, se realizaba una limpieza de la muestra con suero fisiológico (solución salina) para eliminar detritus, restos de pelaje y demás desechos, incluyendo posteriormente la pieza en una solución de formaldehído/ formalina tamponada para su fijación y posteriormente se remitieron a anatomía patológica.

Respecto a la obtención de los injertos estructurales criopreservados, para la realización del estudio se obtuvieron de dos fuentes diferentes en cuanto al estudio piloto previo y el posterior estudio de experimentación posterior aunque se procesaron de exacta manera siendo únicamente la fuente diferente. En el estudio piloto se obtuvieron las muestras de aloinjertos de conejos pertenecientes a un estudio independiente no relacionado sin repercusión en cuanto a la zona dadora ni a nivel sistémico. Por otro lado, las muestras de aloinjertos incluidos en el estudio experimental posteriormente se fueron obteniendo y procesando de manera prospectiva con las resecciones que se practicaban a los conejos intervenidos, creando un banco de tejido óseo estructural dependiente del propio estudio y sin intervención de animales foráneos al estudio.

El procesado para la obtención del injerto a implantar se realizó en ambiente estéril, desvitalizando todos los restos de partes blandas que pudiesen quedar, realizando posteriormente 3 lavados con suero fisiológico salino + solución de clorhexidina no diluida. Posteriormente se realiza una descontaminación de restos hemáticos y grasos del tejido, sumergiendo el injerto en peróxido de hidrógeno primero, en etanol al 70 % durante 30 minutos y por último se procederá a la congelación del mismo en seco en congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  manteniendo esta congelación al menos 7 días, hasta su utilización en el espécimen siguiente.

Además del estudio en microscopia óptica, se valoró la realización de microscopia electrónica para estudio celular en 3 muestras de cada grupo (control y experimental), cada una de ellas perteneciente a un subgrupo (5, 10

y 20 semanas). La preparación de las muestras y el estudio posterior se realizó en la facultad de veterinaria de la Universidad de Córdoba por parte del Profesor Alfonso Blanco (experto en microscopia electrónica) que valoró sus impresiones sobre la interfase hueso-huésped, el periostio vascularizado periférico al aloinjerto y el estudio de osteonas y vasos del injerto con el objetivo de evaluar la colonización celular de las osteonas del injerto y dar muestra de revitalización-revascularización del injerto criopreservado (IMHC). Las muestras se procesaron según la técnica habitual de obtención de muestras para microscopia electrónica con recubrimiento de carbono grafito y inclusión de aluminio para mejorar su conductividad eléctrica en el microscopio de barrido.

### 5.2.7. Anatomía patológica

La preparación de las muestras de anatomía patológica se realizó en la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebrón por los técnicos y bajo la supervisión de la Dra. C. Romagosa, no obstante, la valoración y estudio posterior de las muestras se realizó en la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona por el patólogo Dr. L. Rodríguez Carunchio.

Tras la inmersión en formaldehído, la muestra era dirigida al servicio de AP donde después de la fijación de la muestra durante 48-72 horas se procedía a su preparación en solución decalcificante para permitir los cortes de estudio.

Una vez la muestra se encontraba decalcificada se realizaba el corte de la misma en bloque incluyendo las interfaces proximal y distal injerto-huésped y la parte correspondiente del cúbito para un mejor reconocimiento de las estructuras. Tras el corte principal y la inclusión del mismo se realizaban cortes en el eje longitudinal del injerto, posteriormente se realizaba su inclusión en parafina para realizar cortes de 4 micras de grosor mediante un micrótomo electrónico. Estos cortes se colocaban en portas y se realizaban

una tinción con hematoxilina-eosina. Las muestras se observaron y estudiaron al microscopio óptico.

El mismo patólogo, el Dr. L. Rodríguez Carunchio, investigador independiente del proyecto, realizó la valoración de las muestras obtenidas a nivel macroscópico como microscópico. Esta parte del estudio fue ciego por su parte ya que desconocía el grupo al que pertenecía las muestras remitidas.

Así mismo, el estudio radiológico y macroscópico también fue valorado por el doctorando y por uno de los investigadores principales del estudio y codirector de esta tesis, el Dr. Francisco Soldado Carrera, evaluando los hallazgos de manera independiente aunque en este caso sólo el doctorando sabía el grupo de estudio al que pertenecía la muestra, no así el segundo evaluador ya que se ocultó la identificación del animal.

Las variables estudiadas se subdividen en tres grupos como muestran las tablas, el primero de los cuales son las variables dependientes del estudio radiológico, el segundo del análisis macroscópico y el tercero del análisis histológico (tabla 4).

Tabla 4. Variables de estudio analizadas

| <b>Variables Estudio Radiológico</b>             |         |
|--|---------|
| <b>Diástasis foco postop (proximal y distal)</b> | mm      |
| <b>Callo óseo final</b>                          | mm      |
| <b>Consolidación injerto final</b>               | SI / NO |
| <b>Sinostosis radio cubital final</b>            | Si / NO |

| <b>Variables Estudio Macroscópico</b> |                                 |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Visualización margen proximal</b>  | mm                              |
| <b>Visualización margen distal</b>    | mm                              |
| <b>Callo óseo final</b>               | mm                              |
| <b>Longitud aloinjerto máxima</b>     | mm                              |
| <b>Sinostosis radio cubital final</b> | Si / NO                         |
| <b>Color Injerto</b>                  | Blanco – Ocre – Amarillo - Otro |

| <b>Variables Estudio Microscópico</b>          |                 |
|--|-----------------|
| <b>Callo óseo maduro</b>                       | Si / NO         |
| <b>Longitud aloinjerto máxima</b>              | mm              |
| <b>Hueso inmaduro-cartilago<br/>neoformado</b> | mm <sup>2</sup> |
| <b>Periostio zona media</b>                    | SI / NO         |
| <b>Periostio margen cortical</b>               | micras          |
| <b>Grosor Periostio margen cortical</b>        | micras          |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>Variables M. Electrónico</b> | Proporción osteocitos y celularidad.<br>Vasos viables y neovasos formados |
|---------------------------------|---|

### 5.2.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el análisis de variables del estudio se ha realizado mediante el paquete estadístico SPSS 21.0 para Mac® (IBM Corp., Armonk, NY 10504-1722 US).

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y se analizaron mediante análisis de la varianza de Kruskal-Wallis. El análisis estadístico para el estudio comparativo de normalidad entre ambos grupos se ha realizado mediante el test Shapiro-Wilk por el tamaño muestral, utilizando los test t-student o U de Mann Whitney para la comparación con variables continuas y el test de Chi-cuadrado para el análisis de variables categóricas.

El cálculo estadístico se ha realizado primero en el estudio intragrupos de los grupos control y periostio según el tiempo de evolución y posteriormente se ha realizado el estudio comparativo inferencial intergrupos de estudio.

### 5.2.9. Distribución de los sujetos

Debido a que la utilización de periostio vascularizado es una técnica innovadora y reciente, en la literatura no existen artículos donde describan exactamente el mismo modelo animal sobre el cual nosotros trabajaremos, se ha realizado este modelo con base al propuesto por Zhao L et al en 2010, pero con modificaciones mayores por lo que consideramos que el proyecto debía constar de dos fases, una preliminar cuyo objetivo es establecer el modelo animal propio y su viabilidad y posteriormente, una segunda fase donde se llevará a cabo el estudio experimental.

El estudio incluye 46 especímenes en total distribuidos en diferentes grupos de manera aleatorizada en un proyecto que consta de dos fases, la primera fase de diseño del modelo experimental con 2 conejos y posteriormente la fase experimental con el resto de conejos que se incluyen en el estudio, tanto los viables como las pérdidas que se obtuvieron en el transcurso del estudio.

Se aceptó un error tipo I o falsos positivos del 5% y un error tipo II o falsos negativos de un 20% (potencia del estudio del 80%).

#### 1ª Fase. Diseño de modelo:

Antes del inicio del proyecto experimental, se estudió la viabilidad del modelo a describir y la respuesta del animal a la cirugía, realizando una primera intervención en dos especímenes realizándose la técnica quirúrgica descrita para los conejos incluidos en el grupo control (abordaje quirúrgico con osteotomía de radio, desbridamiento de tejido perióstico circundante del injerto y fijación endomedular con aguja Kirchner). Posteriormente se observó con especial hincapié el postoperatorio inmediato del animal y la evolución en días posteriores, siendo éste sacrificado a las 3 semanas postoperatorias una vez valorados el dolor postoperatorio, la actitud del animal y su evolución clínica postoperatoria.

## 2ª Fase. Diseño estudio experimental:

Una vez comprobada la viabilidad de la técnica quirúrgica y la evolución de los especímenes en el periodo crítico postoperatorio se realizó el reparto aleatorizado en grupo de los conejos destinados al estudio.

Se han realizado dos grandes grupos, el grupo control (GC) en el cual se realizó la ablación del periostio radial y el grupo de estudio con permanencia del periostio vascularizado o grupo periostio (GP). Dentro del grupo GC se incluyeron 24 conejos mientras que en el grupo GP se incluyeron 20. Una vez realizadas las cirugías se observaron 5 pérdidas tras la muerte de los animales (4 en el grupo GC y 1 en el grupo GP) por lo que los especímenes viables en cada grupo quedaron finalmente en 20 animales en el grupo GC y 19 en el grupo GP)

Dentro de cada gran grupo de estudio se subdividieron los animales en 3 subgrupos con la única diferencia del tiempo de seguimiento postoperatorio de los animales, constituyendo grupos diferenciados con eutanasia programada a las 5, 10 y 20 semanas postoperatorias siendo denominados grupos GC5, GC10 y GC20 para los pertenecientes al grupo control y GP5, GP10 y GP20 para los del grupo GP respectivamente (tabla 5).

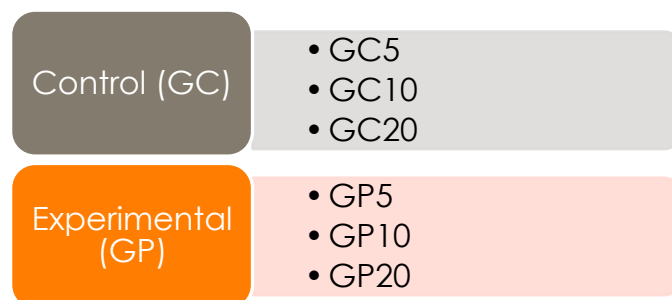


Tabla 5. Distribución de grupos de los conejos

Así pues, tras el reparto aleatorizado de los animales de experimentación en los diferentes grupos, contabilizando las pérdidas y los



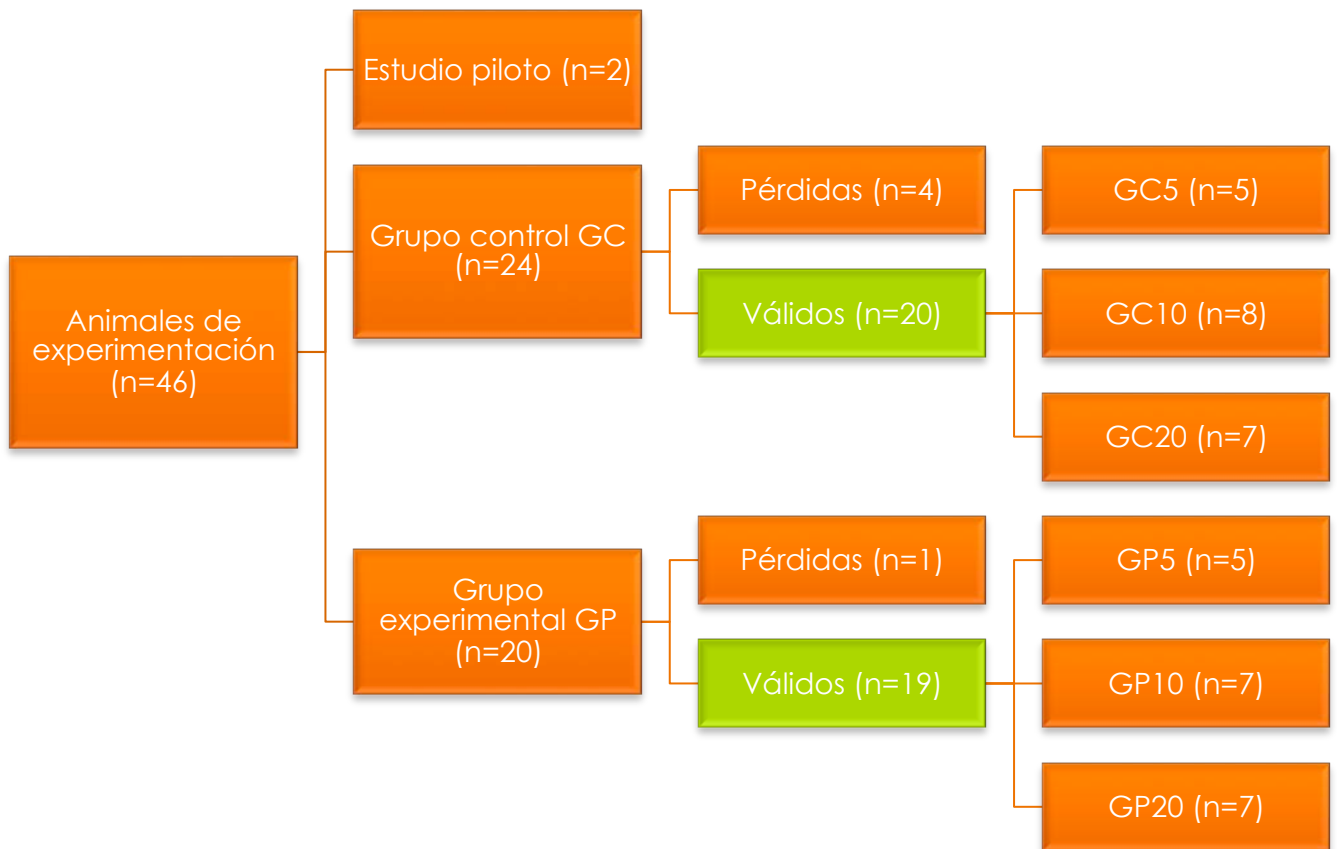
sujetos estudiados (tabla 6), a continuación se muestra la distribución de los mismos y el *flowchart* del estudio (figura 44).

Tabla 6. Listado de los animales utilizados en el estudio y su distribución por grupos y supervivencia.

| ID ANIMAL | SEXO   | EDAD    | GRUPO     | GRUPO FINAL |
|-----------|--------|---------|-----------|-------------|
|           |        | CIRUGÍA |           |             |
| Rb 01     | Hembra | 9 SEM   | PILOTO    | PILOTO      |
| Rb 02     | Hembra | 10 SEM  | PILOTO    | PILOTO      |
| Rb 03     | Macho  | 10 SEM  | CONTROL   | EXITUS      |
| Rb 04     | Macho  | 11 SEM  | CONTROL   | GC10        |
| Rb 05     | Hembra | 10 SEM  | CONTROL   | EXITUS      |
| Rb 06     | Hembra | 11 SEM  | CONTROL   | GC10        |
| Rb 07     | Hembra | 9 SEM   | CONTROL   | EXITUS      |
| Rb 08     | Macho  | 11 SEM  | CONTROL   | EXITUS      |
| Rb 09     | Macho  | 10 SEM  | CONTROL   | GC10        |
| Rb 10     | Macho  | 9 SEM   | CONTROL   | GC10        |
| Rb 11     | Macho  | 11 SEM  | CONTROL   | GC10        |
| Rb 12     | Macho  | 10 SEM  | PERIOSTIO | GP10        |
| Rb 13     | Macho  | 10 SEM  | PERIOSTIO | GP10        |
| Rb 14     | Macho  | 10 SEM  | CONTROL   | GC20        |
| Rb 15     | Macho  | 10 SEM  | CONTROL   | GC20        |
| Rb 16     | Hembra | 9 SEM   | CONTROL   | GC20        |
| Rb 17     | Hembra | 10 SEM  | CONTROL   | GC10        |
| Rb 18     | Hembra | 10 SEM  | CONTROL   | GC20        |
| Rb 19     | Hembra | 11 SEM  | CONTROL   | GC10        |
| Rb 20     | Hembra | 11 SEM  | PERIOSTIO | EXITUS      |
| Rb 21     | Macho  | 10 SEM  | CONTROL   | GC10        |
| Rb 22     | Macho  | 10 sem  | PERIOSTIO | GP10        |
| Rb 23     | Macho  | 10 SEM  | PERIOSTIO | GP20        |
| Rb 24     | Macho  | 10 SEM  | PERIOSTIO | GP20        |
| Rb 25     | Macho  | 10 sem  | PERIOSTIO | GP20        |
| Rb 26     | Macho  | 10 SEM  | PERIOSTIO | GP20        |
| Rb 27     | Macho  | 10 sem  | CONTROL   | GC20        |
| Rb 28     | Hembra | 10 SEM  | CONTROL   | GC20        |

|              |        |        |           |      |
|--------------|--------|--------|-----------|------|
| <b>Rb 29</b> | Hembra | 9 SEM  | CONTROL   | GC20 |
| <b>Rb 30</b> | Hembra | 9 sem  | PERIOSTIO | GP20 |
| <b>Rb 31</b> | Hembra | 11 sem | PERIOSTIO | GP20 |
| <b>Rb 32</b> | Macho  | 9 sem  | PERIOSTIO | GP20 |
| <b>Rb 33</b> | Hembra | 9 sem  | PERIOSTIO | GP10 |
| <b>Rb 34</b> | Macho  | 10 SEM | PERIOSTIO | GP10 |
| <b>Rb 35</b> | Hembra | 10 SEM | PERIOSTIO | GP10 |
| <b>RB 36</b> | Hembra | 10 sem | PERIOSTIO | GP10 |
| <b>Rb 37</b> | Macho  | 9 sem  | PERIOSTIO | GP5  |
| <b>Rb 38</b> | Hembra | 10 sem | PERIOSTIO | GP5  |
| <b>Rb 39</b> | Hembra | 10 sem | PERIOSTIO | GP5  |
| <b>Rb 40</b> | Macho  | 10 sem | PERIOSTIO | GP5  |
| <b>Rb 41</b> | Macho  | 9 sem  | PERIOSTIO | GP5  |
| <b>Rb 42</b> | Macho  | 10 sem | CONTROL   | GC5  |
| <b>Rb 43</b> | Macho  | 10 sem | CONTROL   | GC5  |
| <b>Rb 44</b> | Hembra | 10 sem | CONTROL   | GC5  |
| <b>Rb 45</b> | Macho  | 10 sem | CONTROL   | GC5  |
| <b>Rb 46</b> | Macho  | 10 sem | CONTROL   | GC5  |

Figura 44. Flowchart del estudio



## 6.- Resultados

## 6.- RESULTADOS

### 6.1. ESTUDIO PILOTO

Como paso previo para evaluar la viabilidad de la cirugía de reconstrucción propuesta y valorar tanto el régimen de analgesia-anestesia intraoperatoria y la respuesta postoperatoria de los animales de experimentación, se decidió realizar un primer test con 2 conejos a modo de estudio piloto y evaluar diferentes ítems en relación a la curva de aprendizaje propia de la cirugía que se debía llevar a cabo en el estudio experimental.

Aunque el modelo de creación de defecto y implantación de aloinjerto estructural utilizado en el estudio había sido basado en el descrito por Zhao L et al<sup>118</sup> y en el estudio de Kaya A et al<sup>120</sup>, ambos publicados en 2010, debido a la presencia de cambios mayores en cuanto a la técnica quirúrgica y el manejo pre y postoperatorio del animal, se decidió realizar una prueba previa de la cirugía a realizar en el modelo animal para estudiar y corroborar la viabilidad de la técnica quirúrgica en nuestro ambiente, con un método propio tanto de anestesia como medidas de confort de los animales y para objetivar la viabilidad de las mediciones de variables que se pretendían estudiar en los grupos de estudio posteriormente.

Los conejos 1 y 2 formaron parte del estudio piloto en el que se decidió realizar la cirugía descrita en la metodología para el grupo control, realizando un defecto óseo masivo en el radio asociando una resección completa del periostio circundante al defecto creado y reconstruyéndolo con aloinjerto congelado de conejo de manera aislada.

Las características principales de los dos especímenes incluidos en el piloto se pueden observar en la siguiente tabla (tabla 7):

|                        | Conejo Rb1 | Conejo Rb2 |
|------------------------|------------|------------|
| <b>Sexo</b>            | Hembra     | Hembra     |
| <b>Edad al ingreso</b> | 8 sem      | 8 sem      |
| <b>Peso al ingreso</b> | 2,01 kg    | 2,1 kg     |
| <b>Edad cirugía</b>    | 10 sem     | 10 sem     |
| <b>Peso cirugía</b>    | 2,15 kg    | 2,36 kg    |
| <b>Seguimiento</b>     | 4 sem      | 4 sem      |
| <b>Peso final</b>      | 2,78 kg    | 2,8 kg     |

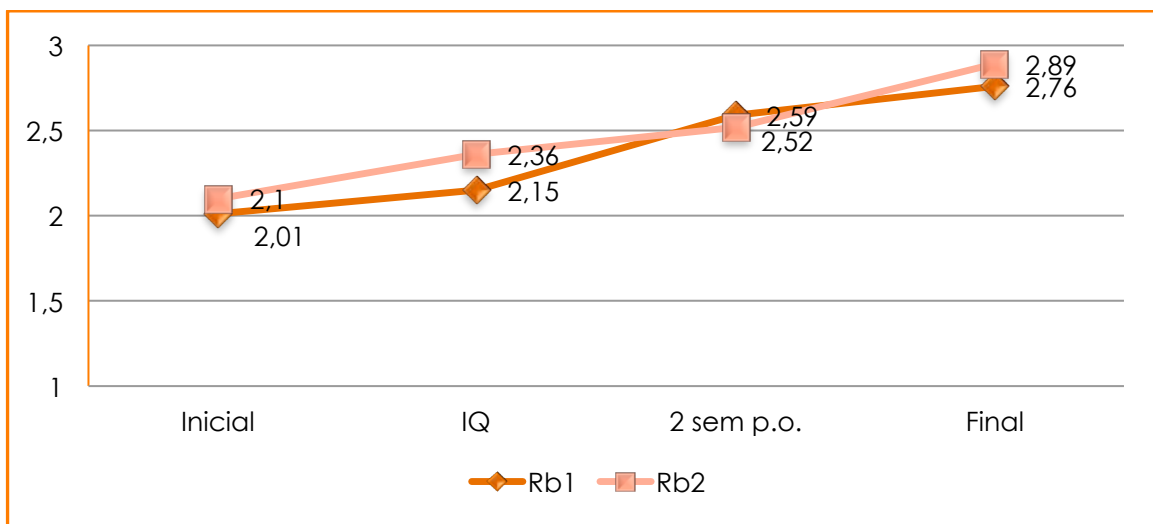
Tabla 7. Características de los conejos pertenecientes al grupo piloto

#### Evaluación clínica de ambos conejos:

- Presentaron una correcta evolución intraoperatoria con buena tolerancia a la medicación
- No se observaron complicaciones agudas tras la cirugía como sangrado.
- Aunque las primeras 72 horas la ingesta sólida se encontraba disminuida, posteriormente se normalizó, situación similar ocurrió aunque menos pronunciada con la ingesta hídrica.
- En todo momento del postoperatorio se observó un ritmo de excrementos constante y un aumento progresivo del peso corporal como se observa en la grafica posterior (grafica 1)
- La temperatura corporal de ambos conejos se mantuvo constante alrededor de los 39-39,4°C, condición habitual en estos animales, tampoco se observaron alteraciones a nivel cutáneo en la zona de incisión que pudieran indicar una infección aguda-subaguda de la cirugía.
- No se observaron alteraciones en el pelaje de los animales ni alteraciones en la condición corporal
- En cuanto al comportamiento de los animales, tanto el provocado como el espontáneo se encontraban disminuidos en las primeras 24 horas tras la cirugía, recuperando posteriormente

- Ambos animales realizaron una descarga espontánea de la extremidad intervenida las primeras 24 horas postoperatorias, iniciando carga progresiva aunque con cojera durante los días siguientes en el postoperatorio, normalizada a los 4 (Rb2) y 5 días (Rb1).

Delante de este proceso evolutivo, podemos confirmar que la técnica quirúrgica, si bien supuso una agresión importante para los animales, éstos tuvieron una pronta recuperación sin influir en un descenso del peso o en la valoración de punto final del estudio por sufrimiento en ningún momento de la prueba piloto.



**Grafica 1.** Distribución de la evolución del peso de los conejos incluidos en la prueba piloto.

Los controles postoperatorios radiográficos fueron correctos (figuras 45 y 46), sin verse cambios en cuanto al material de osteosíntesis. El callo óseo del defecto fue evolucionando como se puede ver en la radiología con imagen radiológica de consolidación.

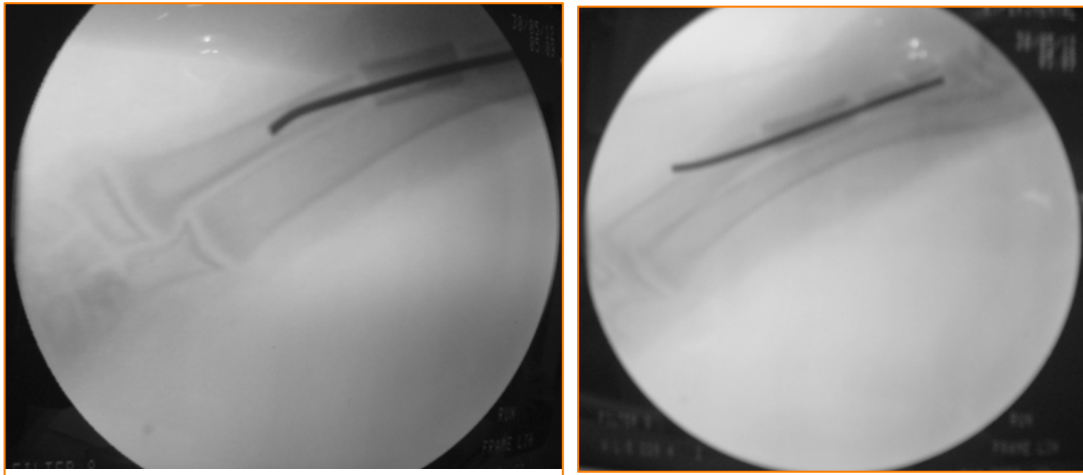


Figura 45. Control radiográfico AP + perfil postoperatorio conejo Rb1. Obsérvese el tamaño del injerto (IMHC), la colocación de la síntesis y las diástasis en las interfase hueso-injerto.

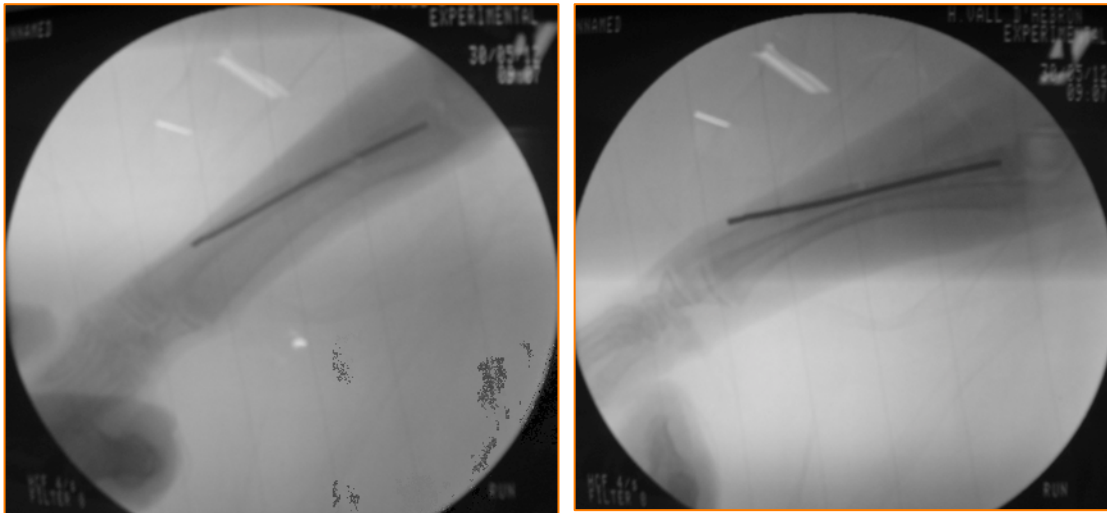


Figura 46. Control radiográfico AP + perfil postoperatorio conejo Rb2.

A las 4 semanas, tras la eutanasia de los animales se realizó la disección de las muestras, preparación y fijación en formol y su envío posterior al laboratorio de Anatomía Patológica para su decalcificación y

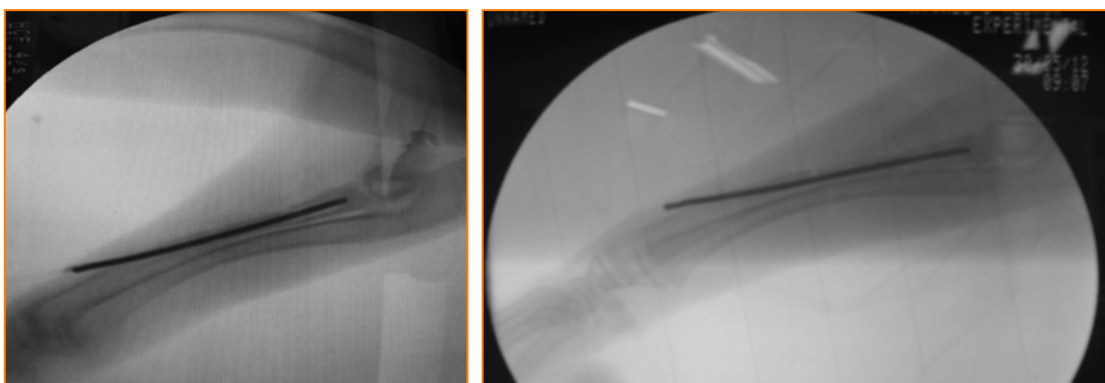


Figura 47. Control radiográfico AP el día de la eutanasia de los especímenes para evaluación radiológica (Imagen Izquierda Rb1, imagen de la derecha Rb 2 respectivamente).



preparación de las muestras histológicas (figuras 47, 48 y 49)

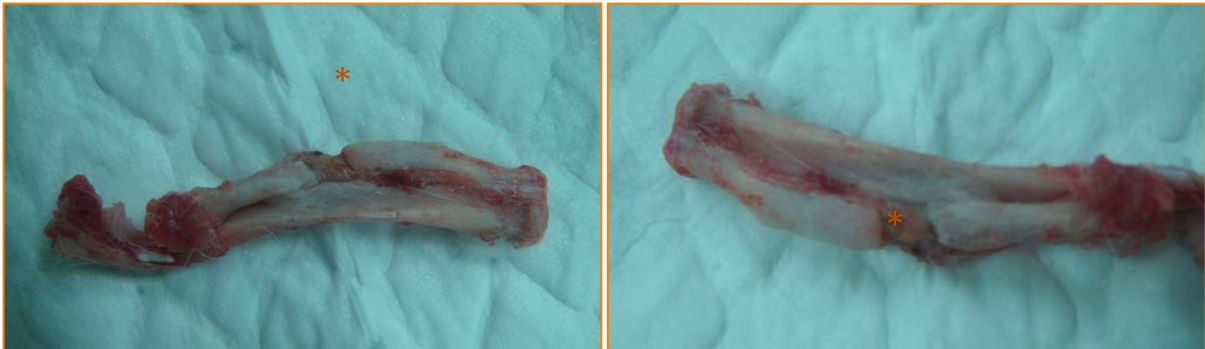


Figura 48. Muestra macroscópica en fresco de necropsia del espécimen Rb1 del segmento intervenido mostrando zona de aloinjerto estructural y interfase hueso huésped-injerto. \* indica resto de aloinjerto.

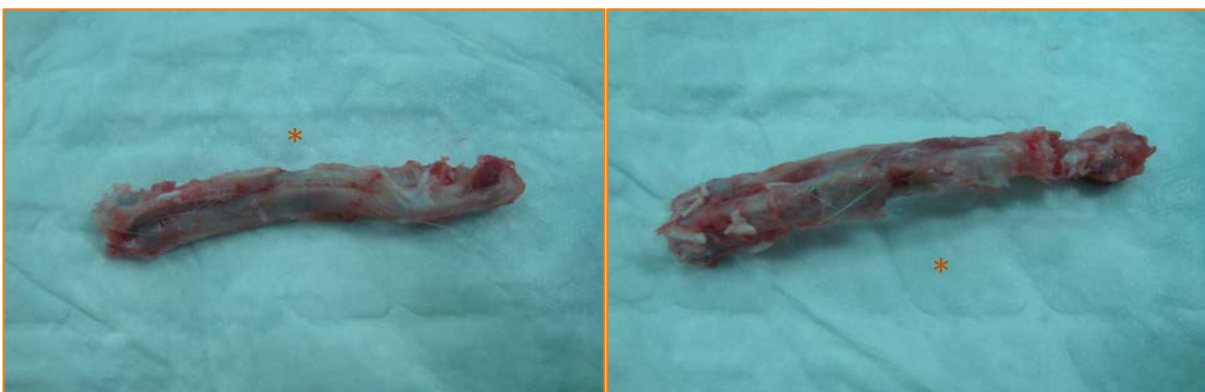


Figura 49. Muestra macroscópica en fresco de necropsia del espécimen Rb2 del segmento intervenido mostrando zona de aloinjerto estructural y interfase hueso huésped-injerto. \* indica resto de aloinjerto.

Durante el proceso de obtención de las muestras se realizó la recogida de datos de la variables de estudio (tabla 8) para objetivar que su medición era viable y las muestras del estudio podían ofrecer unos resultados valorables para su estudio estadístico posterior, en las tablas siguientes se muestran los resultados obtenidos por parte del equipo investigador en cuanto a las variables a estudio en tres grupos según la modalidad de obtención de la variable:

| Conejo     | Estudio radiológico     |                       |            |                       |               |
|------------|-------------------------|-----------------------|------------|-----------------------|---------------|
|            | Diástasis proximal (mm) | Diástasis distal (mm) | Callo óseo | Consolidación injerto | Sinostosis RC |
| <b>Rb1</b> | 2                       | 1                     | NO         | SI                    | NO            |
| <b>Rb2</b> | 2                       | 0                     | NO         | SI                    | NO            |

| Conejo     | Estudio macroscópico |                    |            |                       |               |
|------------|----------------------|--------------------|------------|-----------------------|---------------|
|            | Margen proximal (mm) | Margen distal (mm) | Callo óseo | Longitud injerto (mm) | Color injerto |
| <b>Rb1</b> | 0                    | 0                  | NO         | 85                    | NACAR         |
| <b>Rb2</b> | 0                    | 0                  | NO         | 100                   | BLANCO        |

| Conejo     | Estudio micro |                  |                                  |                      |   |
|------------|---------------|------------------|----------------------------------|----------------------|---|
|            | Callo oseos   | Longitud injerto | Hueso-cartílago neoformado (MM2) | Periostio zona media | Grosor periostio margen cortical (micras) |
| <b>Rb1</b> | SI            | 83               | 64,8                             |                      | NO  |
| <b>Rb2</b> | SI            | 100              | 57                               |                      | NO  |

Tabla 8. Resultados obtenidos de las variables estudiadas en el grupo piloto

Las variables de estudio radiológico mostraron que si bien no se observó en ninguno de los dos casos un callo óseo prominente, se observaba la consolidación del injerto respecto a la radiología previa. Así mismo no se objetivó una Sinostosis postquirúrgica de ambos segmentos óseos tras la cruentación del periostio radial.

Respecto a las variables macroscópicas, la más llamativa fue la diferencia de color de ambos injertos, siendo el injerto del Rb2 un injerto con un aspecto más vital y una coloración más acorde al hueso vivo que la muestra del Rb1, en cambio, la medición de la longitud del aloinjerto mostraba un mayor tejido clasificable como injerto del Rb2 respecto del Rb1, cosa que también se observó en el análisis microscópico de las dos muestras, con una correlación entre el tamaño macro y microscópico.

A nivel microscópico destacar que el callo óseo era visible, respecto a la valoración macroscópica y radiológica que no ofrecían esa seguridad de consolidación. Como medida de calidad de la técnica realizada, a nivel microscópico en ambas muestras no se observó periostio a nivel de zona media del injerto.

Así pues, a la vista de la viabilidad de la técnica quirúrgica, de la correcta evolución postoperatoria de los animales tanto en ganancia de peso, mantenimiento de funciones básicas y de comportamiento, de la aplicabilidad de las variables a estudio y los resultados obtenidos en el estudio piloto, se prosiguió con el estudio según la metodología descrita anteriormente.

## 6.2. REVASCULARIZACIÓN DE ALOINJERTOS ESTRUCTURALES CRIOPRESERVADOS CON PERIOSTIO VASCULARIZADO

Tras comprobar los resultados del estudio piloto se inició el estudio objeto de este trabajo para valorar la revascularización de los injertos masivos (IMHC) asociando periostio vascularizado (grupo experimental) versus la resección completa del mismo (grupo control). Los resultados del trabajo se muestran en tres fases, las dos primeras realizando el análisis de las variables obtenidas intragrupos en tiempo de evolución del grupo de animales control en primer lugar y en segundo del grupo experimental con periostio. Finalmente, en la tercera fase se realizará el estudio comparativo de ambos grupos, tanto en tiempo de evolución de los grupos como intergrupos control-experimental.

### 6.2.1 Análisis de resultados grupo control (GC)

El grupo control constaba de 24 especímenes seleccionados de la muestra y divididos en 3 subgrupos según el tiempo de evolución postoperatorio que se realizó, tras la pérdida de 4 sujetos (las causas serán evaluadas más adelante en el apartado 6.2.1.5) de este grupo, la composición final de los grupos fue de 5 conejos en el subgrupo GC5 a las 5 semanas de evolución, 8 conejos en el grupo de 10 semanas de evolución (GC10) y por último, 7 conejos destinados al grupo de control de 20 semanas de evolución postoperatoria (GC20).

Una vez divididos los conejos en los subgrupos de estudio y dado la distribución no simétrica y aleatorizada de los mismos, se realizó un estudio de la homogeneidad de grupos dentro de las variables demográficas como el sexo del animal, el peso inicial al iniciar la estabulación (peso de entrada) y el peso en el mismo día de la cirugía.

De la muestra de 20 conejos del grupo control, se incluyeron 11 machos (55%) y 9 hembras (45%), repartidos según las siguientes proporciones en los diferentes subgrupos (grafico 2):

- Grupo GP5 (3:2)
- Grupo GP10 (5:3)
- Grupo GP20 (3:4)

| Tabla de contingencia SEXO * TIEMPO SEGUIMIENTO |        |                                |            |            |        |        |
|---|--------|--------------------------------|------------|------------|--------|--------|
|   |        | TIEMPO SEGUIMIENTO             |            |            | Total  |        |
|   |        | 5 SEMANAS                      | 10 SEMANAS | 20 SEMANAS |        |        |
| SEXO  | MACHO  | Recuento                       | 3          | 5          | 3      | 11     |
|   |        | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 60,0%      | 62,5%      | 42,9%  | 55,0%  |
|   | HEMBRA | Recuento                       | 2          | 3          | 4      | 9      |
|   |        | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 40,0%      | 37,5%      | 57,1%  | 45,0%  |
| Total   |        | Recuento                       | 5          | 8          | 7      | 20     |
|   |        | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%     | 100,0%     | 100,0% | 100,0% |

| Pruebas de chi-cuadrado      |                   |    |                             |
|------------------------------|-------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor             | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | ,649 <sup>a</sup> | 2  | ,723                        |
| Razón de verosimilitudes     | ,650              | 2  | ,723                        |
| Asociación lineal por lineal | ,394              | 1  | ,530                        |
| N de casos válidos           | 20                |    |                             |

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,25.

Figura 50. Tablas de contingencia del estudio de la variable sexo, sin mostrar diferencias significativas respecto a la variable sexo.

Se comparó el sexo de los animales respecto los diferentes subgrupos (tiempo de seguimiento) mediante una tabla de contingencia y posterior estudio estadístico mediante el test de chi-cuadrado ( $X^2$ ) con una  $p = 0,723$ , no observando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto a la variable del sexo del animal (figura 50).

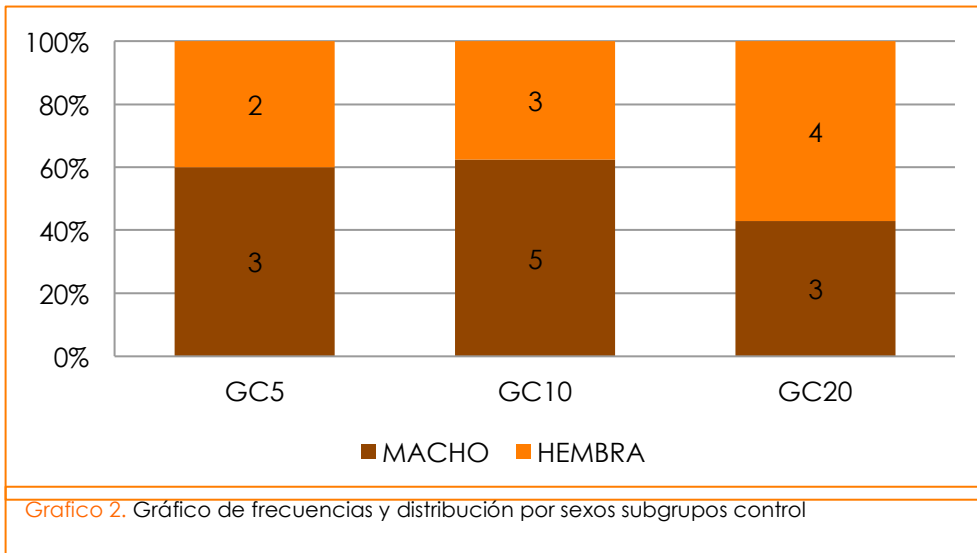


Grafico 2. Gráfico de frecuencias y distribución por sexos subgrupos control

Respecto al peso inicial, la media de todos los grupos se situó en un  $1,75 \pm 0,7$  kg al inicio del estudio, no realizándose la media dentro de los diferentes grupos pues no se había introducido ningún factor modificador y el peso era del que partían los especímenes a su entrada a estabulación. En el estudio estadístico se observó una homogeneidad de varianzas tras el análisis de ANOVA de un factor con una  $p = 0,308$ . En este caso se utilizó una prueba no paramétrica como el test de Tukey para observar que no existieron diferencias significativas en entre los tres grupos de seguimiento respecto del peso inicial de los conejos ( $p=0,388$ ) (figura 51).

| Comparaciones múltiples                 |                        |                            |              |      |                               | PESO ENTRADA (Kg)           |   |                              |
|---|------------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|-----------------------------|---|------------------------------|
| Variable dependiente: PESO ENTRADA (Kg) |                        |                            |              |      |                               | HSD de Tukey <sup>a,b</sup> |   |                              |
| HSD de Tukey                            |                        |                            |              |      |                               |                             |   | Subconjunto para alfa = 0.05 |
| (I) TIEMPO SEGUIMIENTO                  | (J) TIEMPO SEGUIMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                             | N | 1                            |
|   |                        |                            |              |      | Límite inferior               | Límite superior             |   |                              |
| 5 SEMANAS                               | 10 SEMANAS             | -,00525                    | ,13707       | ,999 | -,3569                        | ,3464                       | 7 | 1,6300                       |
|   | 20 SEMANAS             | ,17600                     | ,14079       | ,441 | -,1852                        | ,5372                       | 5 | 1,8060                       |
| 10 SEMANAS                              | 5 SEMANAS              | ,00525                     | ,13707       | ,999 | -,3464                        | ,3569                       | 8 | 1,8113                       |
|   | 20 SEMANAS             | ,18125                     | ,12444       | ,336 | -,1380                        | ,5005                       |   | ,388                         |
| 20 SEMANAS                              | 5 SEMANAS              | -,17600                    | ,14079       | ,441 | -,5372                        | ,1852                       |   |                              |
|   | 10 SEMANAS             | -,18125                    | ,12444       | ,336 | -,5005                        | ,1380                       |   |                              |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,412.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 51. Análisis estadístico post-hoc del estudio del peso inicial de los animales en el estudio sin mostrar diferencias significativas en ninguno de los 3 grupos.

Previa a la cirugía (tras los 15 días de estabulación por cuarentena) y debido a la importancia de la ganancia de peso en estos animales para su correcta viabilidad, se realizó un pesaje de todos los sujetos, donde se obtuvo una media de peso de  $2,57 \pm 1,01$  kg. Así mismo, se realizó el análisis de la varianza obteniendo una homogeneidad de las mismas (Levene  $p=0,349$ ) pero

presentando un test de ANOVA con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el peso previo a cirugía del grupo control de 5 semanas respecto los otros dos grupos (sin diferencias entre ellos) (figura 52).

| Comparaciones múltiples            |                        |                            |              |      |                               |                 |
|------------------------------------|------------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: PESO IQ (Kg) |                        |                            |              |      |                               |                 |
| HSD de Tukey                       |                        |                            |              |      |                               |                 |
| (I) TIEMPO SEGUIMIENTO             | (J) TIEMPO SEGUIMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|                                    |                        |                            |              |      | Límite inferior               | Límite superior |
| 5 SEMANAS                          | 10 SEMANAS             | -,37200                    | ,13617       | ,036 | -,7213                        | -,0227          |
|                                    | 20 SEMANAS             | -,35343                    | ,13987       | ,054 | -,7122                        | ,0054           |
| 10 SEMANAS                         | 5 SEMANAS              | ,37200                     | ,13617       | ,036 | ,0227                         | ,7213           |
|                                    | 20 SEMANAS             | ,01857                     | ,12362       | ,988 | -,2986                        | ,3357           |
| 20 SEMANAS                         | 5 SEMANAS              | ,35343                     | ,13987       | ,054 | -,0054                        | ,7122           |
|                                    | 10 SEMANAS             | -,01857                    | ,12362       | ,988 | -,3357                        | ,2986           |

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

| PESO IQ (Kg)                |   |                              |        |
|-----------------------------|---|------------------------------|--------|
| HSD de Tukey <sup>a,b</sup> |   |                              |        |
| TIEMPO SEGUIMIENTO          | N | Subconjunto para alfa = 0.05 |        |
|                             |   | 1                            | 2      |
| 5 SEMANAS                   | 5 | 2,2980                       |        |
| 20 SEMANAS                  | 7 |                              | 2,6514 |
| 10 SEMANAS                  | 8 |                              | 2,6700 |
| Sig.                        |   | 1,000                        | ,989   |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,412.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 52. Tabla de análisis estadístico post-hoc de la variable peso previo IQ mostrando diferencias significativas estadísticamente en el peso del grupo GC respecto los otros dos grupos control (GC10 y GC20)

Tras el proceso postoperatorio y la correcta evolución de los conejos, una vez normalizada la tendencia a la ganancia de peso se realizó una nueva medida de peso a los 15 días postoperatorios, realizándose el mismo análisis estadístico que con los pesos previos y no se hallaron diferencias significativas en el peso entre los 3 grupos (figura 53).

| ANOVA de un factor  |                   |    |                  |       |      |
|---------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| PESO 2 SEMANAS (Kg) |                   |    |                  |       |      |
|                     | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F     | Sig. |
| Inter-grupos        | ,709              | 2  | ,354             | 3,014 | ,076 |
| Intra-grupos        | 1,998             | 17 | ,118             |       |      |
| Total               | 2,707             | 19 |                  |       |      |

Figura 53. Test de ANOVA que no muestra diferencias significativas en el estudio del peso a los 15 días postoperatorios entre grupos.

Tras el seguimiento definitivo y el día de la eutanasia programada de los conejos se realizó una última medida de peso que tras el estudio estadístico y debido evidentemente al diferente seguimiento y a la tendencia natural del crecimiento y aumento de la ingesta de los animales, mostraron diferencias significativas en el peso final de los sujetos comparando los 3 subgrupos (gráfico 3).

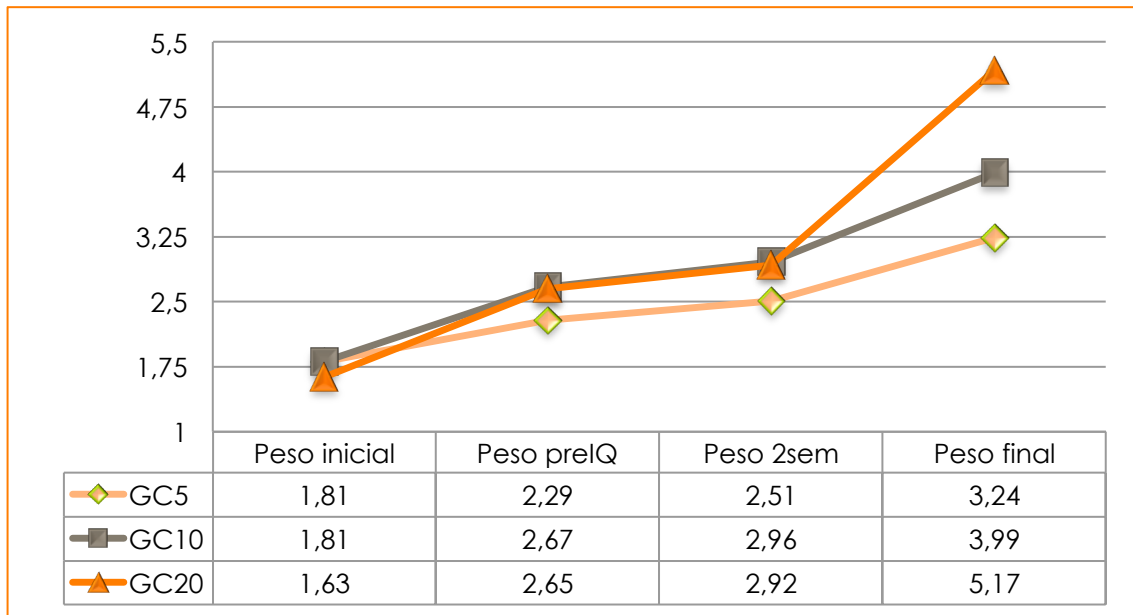


Grafico 3. Desarrollo y evolutivo de la media de peso animales grupo control

Cabe concluir que, si bien apareció una diferencia significativa en la fase de control de peso previa IQ en el grupo GC5 respecto de los otros dos grupos control, las características demográficas de los grupos de estudio se mantenían homogéneos, sin diferencias en cuanto a la composición por sexo de los grupos, como la evolución del peso, tanto inicial, como durante el seguimiento de los conejos. Se ha considerado innecesario realizar un estudio comparativo de los resultados del peso final de los animales puesto que difiere en el punto final de los mismos y no aportaba datos de interés a la comparación de los grupos dentro del grupo control.

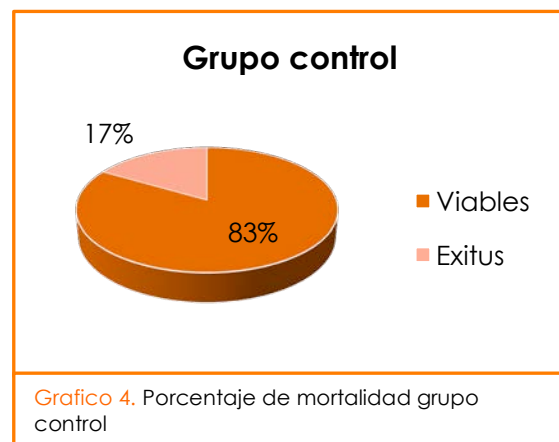


### 6.2.1.1 Supervivencia / Mortalidad

El seguimiento postoperatorio de los animales en el postoperatorio fue crucial para el desarrollo del proyecto. A continuación se exponen los detalles más relevantes de la evolución de los conejos pertenecientes al grupo control.

- Se introdujeron en el grupo control en principio 24 especímenes de conejo, de los cuales se validaron para el estudio 20 ya que se perdieron en el postoperatorio 4 animales:

- El Rb3 se intervino con éxito pero a las 48 horas presentaba un hematoma importante a nivel de la extremidad intervenida y realizó



una sobreinfección de la misma, debiéndose poner punto final al sujeto mediante eutanasia.

- El sujeto Rb5 presentó a las 24 horas postoperatorias un cuadro de diarrea con posterior deshidratación que no pudo ser solventada con sueroterapia endovenosa, debiendo ser sacrificado.
- El conejo Rb7 se encontró *exitus* en su jaula a las 36 horas postoperatorias, tras realizar la necropsia no se observó alteración a nivel de zona quirúrgica que explicase el *exitus*, siendo una muerte no esperada y no catalogada.
- Por último, el Rb8 también tuvo que ser sacrificado por presentar condicionantes de control clínico de criterio de punto final, con un aspecto de pelo sin brillo, no apoyo de la extremidad intervenida y sin respuesta a estímulos no provocados ni provocados. Se realizó sedación del sujeto y en estudio de necropsia se observó hematoma leve, con fractura del aloinjerto y movilización de la aguja

Kirschner, debido probablemente a mecanismo traumático en la jaula.

- Excepto el conejo Rb11 (GC10) que presentó en el momento de la inducción anestésica una parada cardiorrespiratoria que fue remontada por el equipo de veterinaria (sin presentar secuelas posteriormente), el resto de animales del grupo control presentaron una correcta evolución intraoperatoria con buena tolerancia a la medicación y sin otras complicaciones.
- Los conejos Rb 27 (GC20) y Rb43 (GC5) presentaron un hematoma postoperatorio en la extremidad intervenida que no requirió revisión ni presentó complicaciones posteriores (figura 54).



Figura 54. Rb27, obsérvese el edema postoperatorio por hematoma en extremidad intervenida

- Al igual que sucedió en el grupo piloto, en las primeras 72 horas la ingesta sólida se encontraba disminuida, posteriormente se normalizó, situación similar ocurrió aunque menos pronunciada con la ingesta hídrica. No obstante, 2 conejos de este grupo, el Rb9 y el Rb21 requirieron el aporte de pienso especializado de cuidados críticos (Oxbow® Critical Care) por no ingesta en las primeras 36 horas.

- En todo momento del postoperatorio se observó un ritmo de excrementos constante y un aumento progresivo del peso corporal
- No se observó un aumento patológico de la temperatura corporal de los conejos, ésta se mantuvo constante alrededor de los 39-39,4°C, condición habitual en estos animales, tampoco se observaron alteraciones a nivel cutáneo en la zona de incisión que pudieran indicar una infección aguda-subaguda de la cirugía en los conejos viables.
- El conejo Rb21 presentó una dermatitis a nivel de los dedos de la pata intervenida que se controló posteriormente sin consecuencias.
- No se observaron alteraciones en el pelaje de los animales ni alteraciones en la condición corporal en los animales viables durante el periodo de seguimiento.
- En cuanto al comportamiento de los animales, tanto el provocado como el espontáneo se encontraban disminuidos en las primeras 24 horas tras la cirugía, recuperando posteriormente un nivel adecuado.
- Se observó una carga parcial - descarga de la extremidad en los animales intervenidos entre las 6 y las 24 horas postoperatorias, iniciando carga completa aunque con cojera durante los días siguientes en el postoperatorio.



Figura 55. Pienso de cuidados intensivos Critical Care

### 6.2.1.2 Análisis radiológico

Los conejos fueron sometidos a fluoroscopia en el momento de la cirugía para control de la zona fisaria previa IQ y posteriormente de nuevo se evaluó al finalizar la cirugía para comprobación de correcta situación del injerto y la fijación y en ese momento se obtenían los datos de diástasis distal y proximal para obtener una muestra de calidad de la síntesis realizada. A los 15 días postoperatorios se realizó una nueva fluoroscopia rutinaria para control de complicaciones a nivel de la síntesis o del aloinjerto. Por último, un nuevo control mediante radiología se realizaba tras la eutanasia del animal observando la estructura del aloinjerto, la presencia de callo óseo y la presencia de sinostosis radiocubital (tabla 9).

**Tabla 9.** Tablas de resultados de las variables radiológicas grupo control

| Conejo      | Estudio radiológico     |                       |            |                       |            |
|-------------|-------------------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|
|             | Diástasis proximal (mm) | Diástasis distal (mm) | Callo óseo | Consolidación injerto | Sinost. RC |
| <b>GC5</b>  |                         |                       |            |                       |            |
| <b>Rb42</b> | 1                       | 0                     | SI         | SI                    | NO         |
| <b>Rb43</b> | 1                       | 1                     | SI         | SI                    | NO         |
| <b>Rb44</b> | 1                       | 1                     | SI         | NO                    | NO         |
| <b>Rb45</b> | 1                       | 1                     | SI         | SI                    | NO         |
| <b>Rb46</b> | 1                       | 0                     | SI         | NO                    | NO         |

| Conejo      | Estudio radiológico     |                       |            |                       |            |
|-------------|-------------------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|
|             | Diástasis proximal (mm) | Diástasis distal (mm) | Callo óseo | Consolidación injerto | Sinost. RC |
| <b>GC10</b> |                         |                       |            |                       |            |
| <b>Rb4</b>  | 1                       | 1                     | NO         | SI                    | NO         |
| <b>Rb6</b>  | 3                       | 1                     | NO         | NO                    | NO         |
| <b>Rb9</b>  | 0                       | 0                     | NO         | SI                    | SI         |
| <b>Rb10</b> | 0                       | 0                     | NO         | SI                    | NO         |
| <b>Rb11</b> | 0                       | 0                     | NO         | SI                    | SI         |
| <b>Rb17</b> | 1                       | 0                     | NO         | NO                    | NO         |
| <b>Rb19</b> | 2                       | 1                     | NO         | SI                    | SI         |
| <b>Rb21</b> | 1                       | 1                     | NO         | NO                    | SI         |

| GC20        | Estudio radiológico     |                       |            |                       |            |
|-------------|-------------------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|
| Conejo      | Diástasis proximal (mm) | Diástasis distal (mm) | Callo óseo | Consolidación injerto | Sinost. RC |
| <b>Rb14</b> | 2                       | 0                     | NO         | NO                    | SI         |
| <b>Rb15</b> | 1                       | 1                     | NO         | SI                    | SI         |
| <b>Rb16</b> | 1                       | 2                     | NO         | SI                    | SI         |
| <b>Rb18</b> | 0                       | 2                     | NO         | SI                    | SI         |
| <b>Rb27</b> | 1                       | 1                     | NO         | NO                    | SI         |
| <b>Rb28</b> | 1                       | 1                     | NO         | NO                    | SI         |
| <b>Rb29</b> | 2                       | 2                     | NO         | SI                    | SI         |

El estudio de la presencia de diástasis del foco, tanto proximal como distal, no demostró diferencias entre los subgrupos de seguimiento de los conejos, con un test de ANOVA en la variable de diástasis proximal de  $p=0,930$  y un test de ANOVA en la variable diástasis distal de  $p=0,062$ . Así mismo, el estudio de las pruebas post hoc (Prueba de Tukey) tampoco observó diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos grupos por lo que podemos concluir que la diástasis presente en el foco de interfase entre el injerto y el hueso nativo del animal no ha sido un factor de confusión para la evolución posterior de la consolidación del injerto (figura 56).



Figura 56. Control radiológico postoperatorio. Se observa diástasis de foco proximal de 1mm y distal de 1mm respectivamente

Respecto al callo óseo observable en los subgrupos controles, se observó que en los animales del grupo GC5, la visión del callo óseo por parte de dos observadores resultó positivo en todos los casos, sin observar este callo óseo en los animales que presentaban un mayor tiempo de evolución (GC10 y GC20), cosa que produjo una significación estadística de presencia de callo óseo en el grupo GC5 respecto los otros dos subgrupos donde no se observó la presencia de dicho callo. Esta variable mostró un coeficiente de contingencia de  $p=0,707$ , interpretándose que la asociación entre la variable callo óseo a

nivel radiológico y la variable de seguimiento (subgrupos de evolución) es moderada-alta (figura 57).

| Tabla de contingencia CALLO ÓSEO (Rx) * TIEMPO SEGUIMIENTO |    |                                |                    |            |            |        |
|--|----|--------------------------------|--------------------|------------|------------|--------|
|  |    |                                | TIEMPO SEGUIMIENTO |            |            | Total  |
|  |    |                                | 5 SEMANAS          | 10 SEMANAS | 20 SEMANAS |        |
| CALLO ÓSEO (Rx)  | NO | Recuento                       | 0                  | 8          | 7          | 15     |
|  |    | Frecuencia esperada            | 3,8                | 6,0        | 5,3        | 15,0   |
|  |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 0,0%               | 100,0%     | 100,0%     | 75,0%  |
|  | SI | Recuento                       | 5                  | 0          | 0          | 5      |
|  |    | Frecuencia esperada            | 1,3                | 2,0        | 1,8        | 5,0    |
|  |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 0,0%       | 0,0%       | 25,0%  |
| Total  |    | Recuento                       | 5                  | 8          | 7          | 20     |
|  |    | Frecuencia esperada            | 5,0                | 8,0        | 7,0        | 20,0   |
|  |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 100,0%     | 100,0%     | 100,0% |

| Pruebas de chi-cuadrado      |                     |    |                             |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor               | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | 20,000 <sup>a</sup> | 2  | ,000                        |
| Razón de verosimilitudes     | 22,493              | 2  | ,000                        |
| Asociación lineal por lineal | 12,989              | 1  | ,000                        |
| N de casos válidos           | 20                  |    |                             |

a. 4 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,25.

| Medidas simétricas  |                              |       |                 |
|---------------------|------------------------------|-------|-----------------|
|                     |                              | Valor | Sig. aproximada |
| Nominal por nominal | Phi                          | 1,000 | ,000            |
|                     | V de Cramer                  | 1,000 | ,000            |
|                     | Coefficiente de contingencia | ,707  | ,000            |
| N de casos válidos  |                              | 20    |                 |

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.  
b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

Figura 57. Tablas de contingencia mostrando el análisis estadístico comparativo entre el tiempo de evolución (subgrupo de seguimiento) y la presencia de callo óseo.

La variable dicotómica de consolidación del injerto en el grupo control respecto del seguimiento de los diferentes subgrupos (GC5, GC10 y GC20) se estudió mediante el test de chi-cuadrado mostrando diferencias significativas en cuanto a la consolidación del injerto en el grupo GC5 respecto a los grupos GC10 y GC20 con un valor de  $p=0,044$  (figuras 59, 60 61, y 62).

Además de estas diferencias observadas estadísticamente, en la evolución clínica de los injertos, se observaron 2 conejos con presencia de callo óseo neoformado pero sin evidencia de estructuración de la consolidación radiológica en el grupo GC5 mientras que también se observaron 3 animales con signos de pseudoartrosis y falta de consolidación radiológica en los grupos GC10 y GC20 (figura 58). El recuento total es de 8 animales con signos parciales de no consolidación del injerto a nivel radiológico en los diferentes

tiempos de evolución de los injertos, tanto a corto como a largo plazo, cosa que representa un % de los animales del grupo control.

Figura 58. Imágenes radiológica de falta de consolidación en interfase proximal de injerto-hueso nativo a las 10 semanas de evolución (GC10)

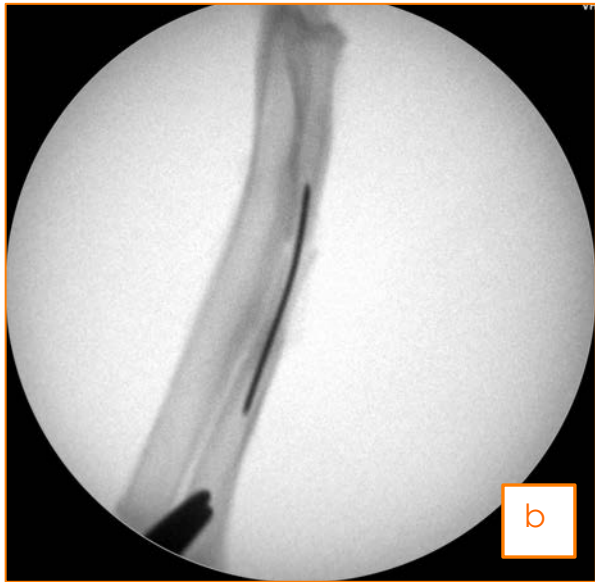
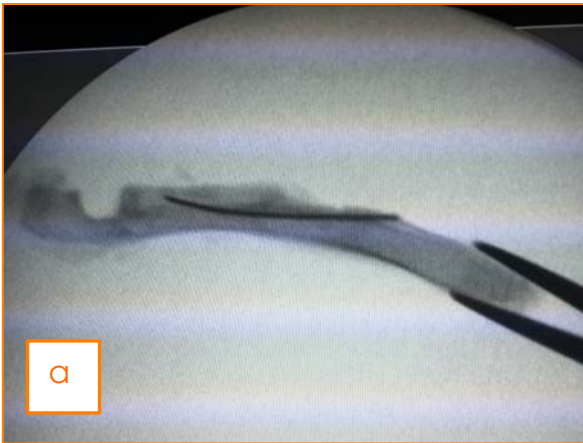
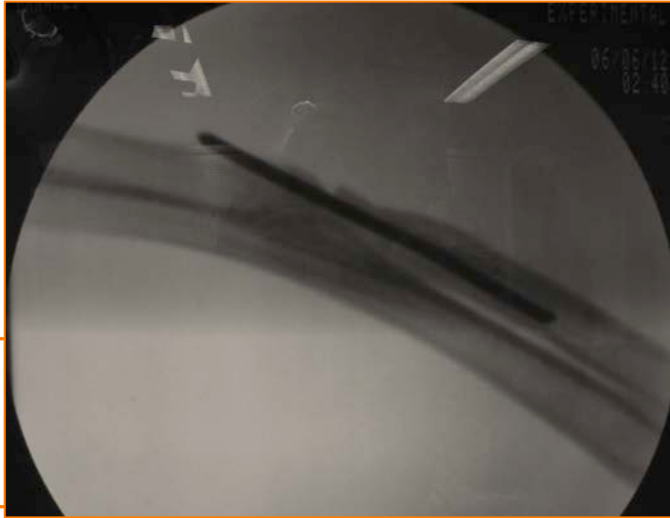


Figura 59. Imágenes radiológicas de 5 semanas de evolución (Grupo GC5) observándose signos de callo óseo periférico y consolidación incipiente Región proximal de figura b con imagen de falta de consolidación



Figura 60. Imágenes radiológicas de 10 semanas evolución (Grupo GC10) observándose signos de consolidación del IMHC sin evidencia de callo óseo



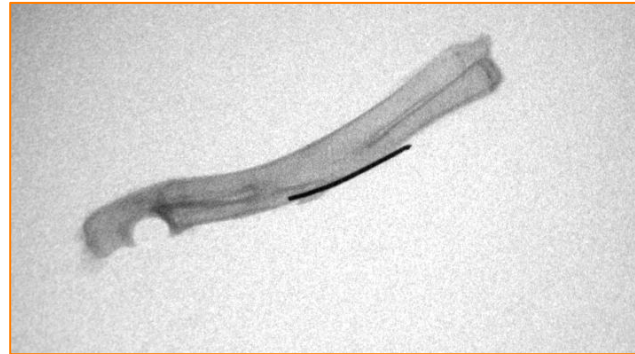


Figura 61. Imágenes radiológicas de 20 semanas evolución (Grupo GC20) observándose signos de consolidación del IMHC sin evidencia de callo óseo

| Pruebas de chi-cuadrado      |                    |    |                             |
|------------------------------|--------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor              | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | 6,259 <sup>a</sup> | 2  | ,044                        |
| Razón de verosimilitudes     | 6,057              | 2  | ,048                        |
| Asociación lineal por lineal | 4,169              | 1  | ,041                        |
| N de casos válidos           | 19                 |    |                             |

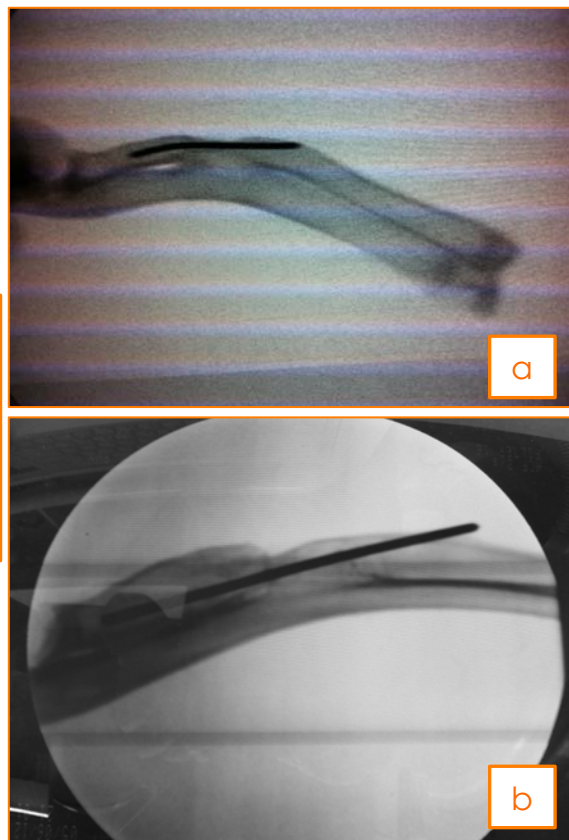
a. 4 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,53.

Figura 62. Tabla de estadísticos mostrando una resulta de  $p=0,044$  mostrando diferencias significativas en la consolidación del injerto del grupo GC5 respecto los grupos GC10 y GC 20. El coeficiente de contingencia del análisis tiene un valor de  $p=0,498$ .

La última variable estudiada dentro del análisis radiológico se trataba de la identificación radiológica de una sinostosis radiocubital secundaria a la intervención quirúrgica y se decidió evaluar como una medida de calidad de la cirugía y de la confirmación de la resección perióstica completa en el borde cubital del radio en los subgrupos controles. Se decidió evaluar la variable de forma dicotómica evaluando la presencia o no de fusión secundaria a nivel medio de ambos huesos. Al tratarse de una variable dicotómica, el test estadístico utilizado fue el test de chi-cuadrado, que mostró un valor de  $p=0,003$ , resultando estadísticamente significativa la asociación de la sinostosis radiocubital secundaria con el tiempo de evolución, obteniendo una frecuencia aumentada de resultado positivo en los animales con mayor tiempo de evolución (GC10 y GC20) respecto a el grupo de menor seguimiento (GC5), cosa que muestra una tendencia a la formación de puentes óseos interóseos con el fin de estabilizar este segmento (figuras 63 y 64).



**Figura 63.** Imágenes pertenecientes a especímenes de 10 semanas evolución (GC10) (a) y 20 semanas respectivamente (b) mostrando la aparición de sinostosis radiocubital tras la intervención



| Tabla de contingencia SINÓSTOSIS RADIOCUBITAL (Rx) * TIEMPO SEGUIMIENTO |    |                                |                    |            |            |        |
|---|----|--------------------------------|--------------------|------------|------------|--------|
|   |    |                                | TIEMPO SEGUIMIENTO |            |            | Total  |
|   |    |                                | 5 SEMANAS          | 10 SEMANAS | 20 SEMANAS |        |
| SINÓSTOSIS RADIOCUBITAL (Rx)  | NO | Recuento                       | 5                  | 4          | 0          | 9      |
|   |    | Frecuencia esperada            | 2,3                | 3,6        | 3,2        | 9,0    |
|   |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 50,0%      | 0,0%       | 45,0%  |
|   | SI | Recuento                       | 0                  | 4          | 7          | 11     |
|   |    | Frecuencia esperada            | 2,8                | 4,4        | 3,9        | 11,0   |
|   |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 0,0%               | 50,0%      | 100,0%     | 55,0%  |
| Total   |    | Recuento                       | 5                  | 8          | 7          | 20     |
|   |    | Frecuencia esperada            | 5,0                | 8,0        | 7,0        | 20,0   |
|   |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 100,0%     | 100,0%     | 100,0% |

| Pruebas de chi-cuadrado      |                     |    |                             |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor               | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | 11,919 <sup>a</sup> | 2  | ,003                        |
| Razón de verosimilitudes     | 16,435              | 2  | ,000                        |
| Asociación lineal por lineal | 11,323              | 1  | ,001                        |
| N de casos válidos           | 20                  |    |                             |

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,25.

**Figura 64.** Tabla de contingencia de sinostosis radiocubital con tiempo de seguimiento. Test estadístico Chi-cuadrado con valor  $p=0,003$  significativo estadísticamente.

### 6.2.1.3 Análisis macroscópico

Tras el punto final del seguimiento de los conejos y la eutanasia programada, se procedió a la necropsia de todos los animales, incluidos los animales que fueron exitus previo a la finalización del seguimiento para estudio postmortem y objetivar si la cirugía era una posible causa desencadenante de la muerte del animal.

Una vez realizada la eutanasia de los animales en el último punto de control se procedía a la disección cutánea de la extremidad intervenida y obtención de las muestras estructurales del segmento de antebrazo del animal realizando una exéresis de los compartimentos musculares, preservando la cobertura musculo-fibrosa alrededor de la zona intervenida con la intención de no dañar ni alterar la zona intervenida para su posterior estudio histológico microscópico (figura 65).



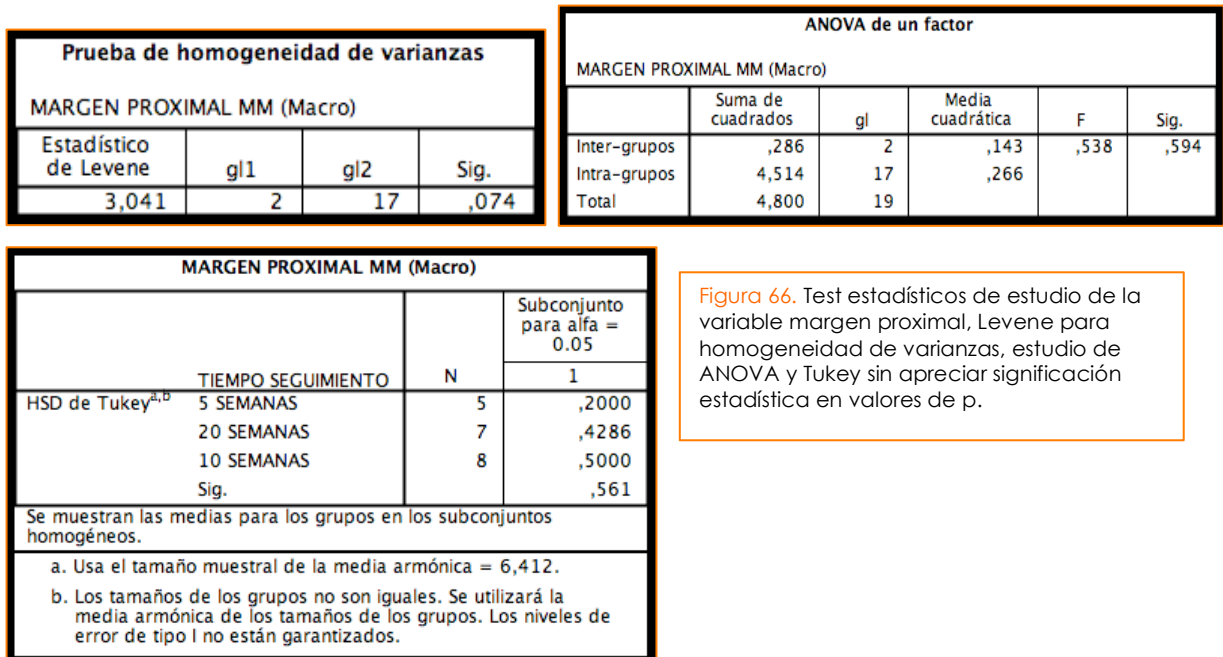
Figura 65. Pieza de resección tras eutanasia del animal para estudio macroscópico

A nivel macroscópico de la muestra la intención era evaluar clínicamente la evolución de los IMHC tras el tiempo de evolución clínica de cada grupo y su consistencia, signos de vitalidad y objetivación de la consolidación ósea en el aspecto clínico para complementar el estudio radiológico. Las primeras variables a analizar fueron el calculo milimétrico de la evolución de los márgenes proximal y distal de la interfase hueso huésped y aloinjerto (tabla 10). Las mediciones de las variables macroscópicas cuantitativas se realizaron mediante calculo *de visu* con cartabón de corredera (pie de rey) y regla milimetrada flexible.

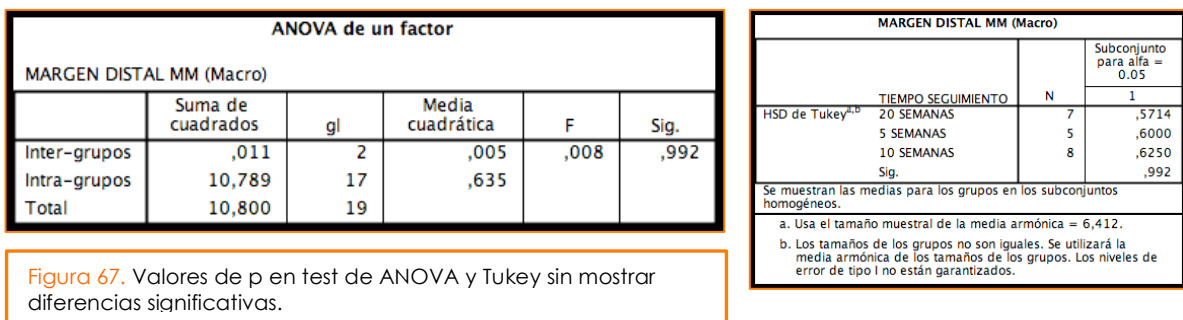
Tabla 10. Resultados de las variables estudiadas a nivel macroscópico en grupo control.

| Conejo      | Estudio macroscópico |                    |            |                       |               |
|-------------|----------------------|--------------------|------------|-----------------------|---------------|
|             | Margen proximal (mm) | Margen distal (mm) | Callo óseo | Longitud injerto (mm) | Color injerto |
| <b>GC5</b>  |                      |                    |            |                       |               |
| <b>Rb42</b> | 0                    | 0                  | SI         | 90                    | BLANCO        |
| <b>Rb43</b> | 0                    | 0                  | SI         | 90                    | BLANCO        |
| <b>Rb44</b> | 0                    | 2                  | SI         | 90                    | AMARILLO      |
| <b>Rb45</b> | 0                    | 0                  | SI         | 70                    | AMARILLO      |
| <b>Rb46</b> | 1                    | 1                  | SI         | 80                    | AMARILLO      |
| <b>GC10</b> |                      |                    |            |                       |               |
| <b>Rb4</b>  | 0                    | 0                  | NO         | 50                    | AMARILLO      |
| <b>Rb6</b>  | 1                    | 1                  | NO         | 60                    | OCRE          |
| <b>Rb9</b>  | 0                    | 0                  | NO         | 75                    | OCRE          |
| <b>Rb10</b> | 1                    | 1                  | NO         | 70                    | AMARILLO      |
| <b>Rb11</b> | 0                    | 0                  | NO         | 65                    | AMARILLO      |
| <b>Rb17</b> | 1                    | 1                  | NO         | 80                    | OCRE          |
| <b>Rb19</b> | 0                    | 2                  | SI         | 60                    | OCRE          |
| <b>Rb21</b> | 1                    | 0                  | SI         | 70                    | BLANCO        |
| <b>GC20</b> |                      |                    |            |                       |               |
| <b>Rb14</b> | 1                    | 1                  | NO         | 80                    | AMARILLO      |
| <b>Rb15</b> | 0                    | 0                  | NO         | 50                    | BLANCO        |
| <b>Rb16</b> | 1                    | 0                  | NO         | 75                    | BLANCO        |
| <b>Rb18</b> | 0                    | 0                  | NO         | 80                    | BLANCO        |
| <b>Rb27</b> | 1                    | 1                  | NO         | 70                    | OCRE          |
| <b>Rb28</b> | 0                    | 2                  | NO         | 30                    | AMARILLO      |
| <b>Rb29</b> | 0                    | 0                  | NO         | 30                    | BLANCO        |

En el estudio de la variable margen proximal, expresada en milímetros, se realizó el test de Levene para la homogeneidad de varianzas, concluyendo con una  $p=0,074$  que éstas eran homogéneas. Posteriormente, comparando los diferentes grupos de seguimiento se realizó análisis estadístico de ANOVA con una  $p=0,594$ , sin observar diferencias entre los subgrupos dentro del grupo control, resultado que fue corroborado al no obtener diferencias entre los grupos mediante el test post hoc de Tukey con un valor de  $p=0,561$  (figura 66).



Respecto a la variable de estudio de margen distal de interfase hueso huésped – aloinjerto, se realizó el mismo estudio que para la variable margen proximal, expresándolo en milímetros y utilizando el mismo test estadístico, con resultado igual a la variable anterior, mostrando una homogeneidad de varianzas ( $p=0,893$ ), sin significación estadística en el test de ANOVA ( $p=0,992$ ) ni en la prueba de Tukey con un valor de  $p=0,992$  (figura 67).



Respecto al grado de consolidación del injerto y su tiempo de evolución, se valoró la presencia macroscópica de callo óseo en la muestra de disección, valorada mediante la evaluación de 3 ítems (figura 68):

- Observación de callo proximal y distal en interfases hueso-IMHC
  - o Presente 1, no presente 0 (por cada interfase)

- La movilización del injerto
  - o Injerto no móvil 1, móvil 0
- La consistencia de las interfases mediante punción
  - o Duro 1, fibroso o no presente 0 (por cada interfase)

obteniendo una medida del estado del callo óseo evaluándolo como presente o no convirtiendo las mediciones agrupadas según la puntuación obtenida (se consideró presencia de callo óseo con una puntuación de  $>4$ ) en una cualitativa dicotómica para posterior estudio estadístico mediante test de chi-cuadrado.



Figura 68. Pieza de resección GC10 (Rb6) como resultado de callo óseo no presente con puntuación de 3 (injerto no móvil, callo proximal presente consistencia proximal dura).

El estudio estadístico de la variable callo óseo macroscópico se realizó mediante test de chi-cuadrado, con un valor de  $p=0,001$  siendo estadísticamente significativa la asociación de callo óseo con el tiempo de seguimiento, presentándose en mayor frecuencia en el grupo de evolución a las 5 semanas (GC5) respecto a los otros dos subgrupos de seguimiento (GC 10 y GC20) (figura 69).

| Tabla de contingencia CALLO ÓSEO (Macro) * TIEMPO SEGUIMIENTO |                                |                                |                    |            |            |       |
|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|------------|------------|-------|
|   |                                |                                | TIEMPO SEGUIMIENTO |            |            | Total |
|   |                                |                                | 5 SEMANAS          | 10 SEMANAS | 20 SEMANAS |       |
| CALLO ÓSEO (Macro)  | NO                             | Recuento                       | 0                  | 6          | 7          | 13    |
|   |                                | Frecuencia esperada            | 3,3                | 5,2        | 4,6        | 13,0  |
|   |                                | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 0,0%               | 75,0%      | 100,0%     | 65,0% |
|   | SI                             | Recuento                       | 5                  | 2          | 0          | 7     |
|   |                                | Frecuencia esperada            | 1,8                | 2,8        | 2,4        | 7,0   |
|   |                                | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 25,0%      | 0,0%       | 35,0% |
| Total   | Recuento                       | 5                              | 8                  | 7          | 20         |       |
|   | Frecuencia esperada            | 5,0                            | 8,0                | 7,0        | 20,0       |       |
|   | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%                         | 100,0%             | 100,0%     | 100,0%     |       |

| Pruebas de chi-cuadrado      |                     |    |                             |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor               | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | 13,407 <sup>a</sup> | 2  | ,001                        |
| Razón de verosimilitudes     | 16,901              | 2  | ,000                        |
| Asociación lineal por lineal | 11,498              | 1  | ,001                        |
| N de casos válidos           | 20                  |    |                             |

a. 5 casillas (83,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,75.

Figura 69. Estudio estadístico de la variable callo óseo mostrando diferencias significativas entre los subgrupos control por tiempo de seguimiento con p=0,001.

A nivel macroscópico también fue evaluada la longitud del injerto restante según el tiempo de evolución, este cálculo fue realizado en milímetros respecto de la interfase proximal hasta la interfase distal. El estudio estadístico de homogeneidad de varianzas resultó significativo con una p=0,002 (figura 70) de modo que el test estadístico utilizado fue la prueba de Welch en vez del ANOVA, observando un valor de p=0,015, mostrando diferencias significativas entre la longitud del injerto y el tiempo de seguimiento. Como pruebas post hoc en este caso se utilizó el test de Games-Howell que mostró diferencias significativas respecto la longitud del injerto en el grupo GC5 y GC10, sin mostrarlas en los grupos GC5 y GC 20 y Gc10 y GC20 respectivamente (figura 71).

| Prueba de homogeneidad de varianzas |     |     |      |
|-------------------------------------|-----|-----|------|
| LONGITUD INJERTO MM (Macro)         |     |     |      |
| Estadístico de Levene               | gl1 | gl2 | Sig. |
| 8,730                               | 2   | 17  | ,002 |

Figura 70. Estadístico de Levene con significación estadística p=0,002



| Pruebas robustas de igualdad de las medias |                          |     |        |      |
|--|--------------------------|-----|--------|------|
| LONGITUD INJERTO MM (Macro)                |                          |     |        |      |
|  | Estadístico <sup>a</sup> | gl1 | gl2    | Sig. |
| Welch                                      | 6,620                    | 2   | 10,006 | ,015 |
| Brown-Forsythe                             | 4,152                    | 2   | 10,183 | ,048 |

a. Distribuidos en F asintóticamente.

Figura 71. Test estadísticos de Welch con un valor de p significativo (p=0,015) y test post hoc de Games-Howell mostrando diferencias significativas entre grupos GC5 y GC10, sin diferencias entre GC5 y GC20 y GC10 y GC20 respectivamente

| Comparaciones múltiples                           |                        |                            |              |      |                               |                 |
|---|------------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: LONGITUD INJERTO MM (Macro) |                        |                            |              |      |                               |                 |
| Games-Howell                                      |                        |                            |              |      |                               |                 |
| (I) TIEMPO SEGUIMIENTO                            | (J) TIEMPO SEGUIMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|   |                        |                            |              |      | Límite inferior               | Límite superior |
| 5 SEMANAS   | 10 SEMANAS             | 17,75000                   | 5,23297      | ,019 | 3,1655                        | 32,3345         |
|   | 20 SEMANAS             | 24,71429                   | 9,37757      | ,067 | -1,8498                       | 51,2784         |
| 10 SEMANAS  | 5 SEMANAS              | -17,75000                  | 5,23297      | ,019 | -32,3345                      | -3,1655         |
|   | 20 SEMANAS             | 6,96429                    | 9,12813      | ,735 | -19,2023                      | 33,1309         |
| 20 SEMANAS  | 5 SEMANAS              | -24,71429                  | 9,37757      | ,067 | -51,2784                      | 1,8498          |
|   | 10 SEMANAS             | -6,96429                   | 9,12813      | ,735 | -33,1309                      | 19,2023         |

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Por último, en el estudio macroscópico de las piezas de resección, se estudió la variable categórica de color del injerto, esta variable nace con la intención de evaluar la viabilidad del hueso alogénico estructural comparado respecto del hueso sano vitalizado, su estudio se basó en 3 ítems diferentes determinando la coloración blanca (figura 72) como la más afín a la coloración del hueso huésped, la coloración amarilla (figura 73) y la coloración ocre (figura 74) siguiendo una escala gradual de evolución del hueso (blanco más vital que ocre).



Figura 72. Pieza de resección grupo GC20 (RB15). Se determinó el grado de coloración blanco para esta muestra.



Figura 73. Pieza de resección grupo GC20 (RB14). Se determinó el grado de coloración amarillo para esta muestra



Figura 74. Pieza de resección grupo GC10 (RB17). Se determinó el grado de coloración nácar para esta muestra

El test estadístico para evaluar esta variable fue el test de chi-cuadrado, que mostró un valor de  $p=0,166$  sin evidencias de diferencias significativas en los subgrupos de seguimiento en la muestra de controles del estudio. Pese a no tener significación estadística, se determinó un mayor predominio de muestras de coloración amarilla o ocre en las muestras de los grupos GC5 (60% de las muestras) y GC10 (87,5% de las muestras) respecto al grupo de GC20 (48,2%) cosa que indica que macroscópicamente la vitalidad del injerto se encuentra comprometida respecto al hueso del huésped (figura 75).



| Tabla de contingencia COLOR INJERTO (Macro) * TIEMPO SEGUIMIENTO |          |                                |                    |            |            |        |
|--|----------|--------------------------------|--------------------|------------|------------|--------|
|  |          |                                | TIEMPO SEGUIMIENTO |            |            | Total  |
|  |          |                                | 5 SEMANAS          | 10 SEMANAS | 20 SEMANAS |        |
| COLOR INJERTO (Macro)  | NACAR    | Recuento                       | 0                  | 4          | 1          | 5      |
|  |          | Frecuencia esperada            | 1,3                | 2,0        | 1,8        | 5,0    |
|  |          | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 0,0%               | 50,0%      | 14,3%      | 25,0%  |
|  | BLANCO   | Recuento                       | 2                  | 1          | 4          | 7      |
|  |          | Frecuencia esperada            | 1,8                | 2,8        | 2,4        | 7,0    |
|  |          | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 40,0%              | 12,5%      | 57,1%      | 35,0%  |
|  | AMARILLO | Recuento                       | 3                  | 3          | 2          | 8      |
|  |          | Frecuencia esperada            | 2,0                | 3,2        | 2,8        | 8,0    |
|  |          | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 60,0%              | 37,5%      | 28,6%      | 40,0%  |
| Total  |          | Recuento                       | 5                  | 8          | 7          | 20     |
|  |          | Frecuencia esperada            | 5,0                | 8,0        | 7,0        | 20,0   |
|  |          | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 100,0%     | 100,0%     | 100,0% |

| Pruebas de chi-cuadrado      |                    |    |                             |
|------------------------------|--------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor              | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | 6,486 <sup>a</sup> | 4  | ,166                        |
| Razón de verosimilitudes     | 7,522              | 4  | ,111                        |
| Asociación lineal por lineal | ,679               | 1  | ,410                        |
| N de casos válidos           | 20                 |    |                             |

a. 9 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,25.

Figura 75. Test de chi-cuadrado para el estudio de la variable color del IMHC. Obsérvese un valor de  $p=0,166$ , sin diferencias estadísticas significativas respecto subgrupos de seguimiento.

### 6.2.1.4 Estudio histoanatomopatológico

Respecto al estudio microscópico de las muestras de los grupos de seguimiento del control, se evaluaron las variables de callo óseo microscópico, la longitud del injerto, la evaluación de la presencia de periostio en la zona media del injerto (variable que se ha utilizado una vez más para valorar la calidad de la cirugía y la consecución del objetivo de ablación del periostio nativo del periostio respecto el grupo experimental) y la neoformación de hueso y cartilago.

Además de las variables analizadas, se realizó un estudio de las muestras junto a un especialista en histología y anatomopatología para estudio descriptivo de las muestras y su impresión en la comparativas de ambos grupos experimentales.

Por último, dentro del estudio histológico y a modo de estudio a nivel celular, se ha realizado el estudio a microscopía electrónica de muestras tanto del grupo control como del grupo con periostio por parte del Profesor Alfonso Blanco, que ha aportado su evaluación e impresiones de las imágenes obtenidas por microscopio electrónico que se detallan más adelante (apartado 6.2.3. Comparativa de grupos de esta tesis).

En las siguientes tablas se detallan los resultados de las variables estudiadas y posteriormente se expondrán los resultados estadísticos obtenidos para cada una de ellas. Finalmente en último apartado se expondrá la impresión descriptiva de las muestras dentro del grupo control y sus subgrupos:

Tabla 11. Resultados obtenidos de las variables microscópicas en grupo control

| Conejo      | Estudio micro |                  |                                  |                      |   |
|-------------|---------------|------------------|----------------------------------|----------------------|---|
|             | Callo óseo    | Longitud injerto | Hueso-cartilago neoformado (MM2) | Periostio zona media | Grosor periostio margen cortical (micras) |
| <b>GC5</b>  |               |                  |                                  |                      |   |
| <b>Rb42</b> | SI            | 10               | 52,5                             | NO                   | 75,7                                      |
| <b>Rb43</b> | SI            | 8,3              | 61                               | NO                   | 246,3                                     |
| <b>Rb44</b> | SI            | 10               | 35                               | NO                   | 715,3                                     |
| <b>Rb45</b> | SI            | 7,8              | 46,5                             | NO                   | 428,6                                     |
| <b>Rb46</b> | SI            | 7,5              | 52,5                             | NO                   | 104,3                                     |

| GC10        |    |     |    |    |    |
|-------------|----|-----|----|----|----|
| <b>Rb4</b>  | SI | 8,1 | 12 | NO | 52 |
| <b>Rb6</b>  | NO |     |    | NO |    |
| <b>Rb9</b>  | SI | 6   | 13 | NO | 0  |
| <b>Rb10</b> | NO | 5,9 | 15 | NO | 0  |
| <b>Rb11</b> | SI | 9,8 | 42 | NO | 0  |
| <b>Rb17</b> | NO | 7,3 | 9  | NO | 0  |
| <b>Rb19</b> | SI | 5,9 | 34 | NO | 72 |
| <b>Rb21</b> | SI | 5,5 | 21 | NO | 0  |

| GC20        |    |     |     |    |    |
|-------------|----|-----|-----|----|----|
| <b>Rb14</b> | NO | 8,5 | 8   | NO | NO |
| <b>Rb15</b> | NO | 8   | 0   | NO | NO |
| <b>Rb16</b> | NO | 5,1 | 14  | NO | NO |
| <b>Rb18</b> | NO | 1,7 | 2,2 | NO | NO |
| <b>Rb27</b> | NO | 1,9 | 0   | NO | NO |
| <b>Rb28</b> | NO | 4   | 0   | NO | NO |
| <b>Rb29</b> | NO |     | 0   | NO | NO |

La primera variable estudiada fue la evaluación del callo óseo en las muestras microscópicas. El test utilizado fue el test de chi-cuadrado por tratarse de una variable cuantitativa dicotómica y se obtuvo un valor de  $p=0,002$  con significación estadística entre la presencia/ausencia de callo óseo a nivel macroscópico comparado según el tiempo de seguimiento de los diferentes subgrupos (figura 76).

| Tabla de contingencia CALLO ÓSEO (Micro) * TIEMPO SEGUIMIENTO |    |                                |                    |            |            |        |
|---|----|--------------------------------|--------------------|------------|------------|--------|
|   |    |                                | TIEMPO SEGUIMIENTO |            |            | Total  |
|   |    |                                | 5 SEMANAS          | 10 SEMANAS | 20 SEMANAS |        |
| CALLO ÓSEO (Micro)  | NO | Recuento                       | 0                  | 3          | 7          | 10     |
|   |    | Frecuencia esperada            | 2,5                | 4,0        | 3,5        | 10,0   |
|   |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 0,0%               | 37,5%      | 100,0%     | 50,0%  |
|   | SI | Recuento                       | 5                  | 5          | 0          | 10     |
|   |    | Frecuencia esperada            | 2,5                | 4,0        | 3,5        | 10,0   |
|   |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 62,5%      | 0,0%       | 50,0%  |
| Total   |    | Recuento                       | 5                  | 8          | 7          | 20     |
|   |    | Frecuencia esperada            | 5,0                | 8,0        | 7,0        | 20,0   |
|   |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 100,0%     | 100,0%     | 100,0% |

| Pruebas de chi-cuadrado      |                     |    |                             |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor               | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | 12,500 <sup>a</sup> | 2  | ,002                        |
| Razón de verosimilitudes     | 17,141              | 2  | ,000                        |
| Asociación lineal por lineal | 11,593              | 1  | ,001                        |
| N de casos válidos           | 20                  |    |                             |

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,50.

Figura 76. Tabla de contingencia mostrando los resultados obtenidos en el estudio de la presencia de callo óseo. Se observan diferencias significativas con un valor de  $p=0,002$  en el test chi-cuadrado

La longitud del injerto óseo a nivel microscópico también fue contabilizado, realizándose las mediciones mediante microscopía óptica y expresadas en milímetros (figura 77). Se observó un test de Levene con un resultado de  $p=0,081$  no significativa por lo que se asumieron varianzas homogéneas y se realizó el estudio de la muestra mediante un test de ANOVA que mostró un valor de  $p=0,024$ , mostrando diferencias significativas entre los tres grupos de seguimiento.



Figura 77 Muestra histológica Rb11 (GC10) donde se observa el injerto intercalar (→) para su medición microscópica

Tras los resultados obtenidos se realizaron pruebas post hoc mediante el test estadístico de Tukey que mostró diferencias significativas entre la longitud del injerto en el grupo GC5 comparado con el grupo GC20 (valor de  $p=0,019$ ), sin embargo, no se mostraron diferencias entre la comparación de los grupos de seguimiento de 5 y 10 semanas ( $p=0,320$ ) y de 10 y 20 semanas ( $p=0,229$ ) respectivamente (figura 78).

| ANOVA de un factor          |                   |    |                  |       |      |
|-----------------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| LONGITUD INJERTO MM (Micro) |                   |    |                  |       |      |
|                             | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F     | Sig. |
| Inter-grupos                | 4090,716          | 2  | 2045,358         | 4,853 | ,024 |
| Intra-grupos                | 6321,562          | 15 | 421,437          |       |      |
| Total                       | 10412,278         | 17 |                  |       |      |

| LONGITUD INJERTO MM (Micro) |   |                              |         |
|-----------------------------|---|------------------------------|---------|
| HSD de Tukey <sup>a,b</sup> |   |                              |         |
| TIEMPO SEGUIMIENTO          | N | Subconjunto para alfa = 0.05 |         |
|                             |   | 1                            | 2       |
| 20 SEMANAS                  | 6 | 48,6667                      |         |
| 10 SEMANAS                  | 7 | 69,2857                      | 69,2857 |
| 5 SEMANAS                   | 5 |                              | 87,2000 |
| Sig.                        |   | ,229                         | ,320    |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,888.  
 b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 78. Tablas estadísticas de análisis de la variable longitud del injerto óseo, observándose significación entre grupo GC5 y GC20

| Comparaciones múltiples                           |                        |                            |              |      |                               |                 |
|---|------------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: LONGITUD INJERTO MM (Micro) |                        |                            |              |      |                               |                 |
| HSD de Tukey                                      |                        |                            |              |      |                               |                 |
| (I) TIEMPO SEGUIMIENTO                            | (J) TIEMPO SEGUIMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|   |                        |                            |              |      | Límite inferior               | Límite superior |
| 5 SEMANAS   | 10 SEMANAS             | 17,91429                   | 12,02052     | ,323 | -13,3087                      | 49,1372         |
|   | 20 SEMANAS             | 38,53333*                  | 12,43089     | ,019 | 6,2445                        | 70,8222         |
| 10 SEMANAS  | 5 SEMANAS              | -17,91429                  | 12,02052     | ,323 | -49,1372                      | 13,3087         |
|   | 20 SEMANAS             | 20,61905                   | 11,42125     | ,201 | -9,0473                       | 50,2854         |
| 20 SEMANAS  | 5 SEMANAS              | -38,53333*                 | 12,43089     | ,019 | -70,8222                      | -6,2445         |
|   | 10 SEMANAS             | -20,61905                  | 11,42125     | ,201 | -50,2854                      | 9,0473          |

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Para analizar la calidad de la resección perióstica llevada a término en la cirugía del grupo control, se estableció el estudio microscópico de la presencia de tejido perióstico a nivel de la zona media de la zona quirúrgica. Esta variable establecida según la presencia o ausencia del tejido se determinó en todas las muestras de los grupos control observando la ausencia de periostio a nivel de la zona media del injerto sin excepción, debido a esto se puede objetivar que en todos los casos se realizó la ablación del tejido de manera correcta. Debido a no observar ninguna variación, se estableció una constante por lo que no se ha realizado ningún estudio estadístico de dicha variable.

Por último la variable que se determinó para estudiar la evolución de las muestras según el tiempo y su progreso de consolidación y revascularización de los injertos fue la presencia de hueso y cartílago neoformado según el seguimiento en el tiempo. La variable que se obtuvo fue una variable cuantitativa expresada en milímetros cuadrados y fue determinada por un experto en histología de tejido óseo.

El estudio estadístico de los resultados determinó una homogeneidad de varianzas mediante un valor de  $p=0,171$  en el estadístico de Levene. El test de ANOVA de un factor, mostró diferencias significativas en la comparación de todos los grupos, con un valor de  $p=0,000$ . Tras este estudio se realizaron pruebas post hoc (test de Tukey) observando diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos comparados entre sí, GC5 con GC 10 y GC20 y Gc10 con GC20 (figura 79).

| ANOVA de un factor                    |                   |    |                  |        |      |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| HUESO-CARTÍLAGO NEOFORMADO MM (Micro) |                   |    |                  |        |      |
|                                       | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F      | Sig. |
| Inter-grupos                          | 6197,251          | 2  | 3098,625         | 33,374 | ,000 |
| Intra-grupos                          | 1485,534          | 16 | 92,846           |        |      |
| Total                                 | 7682,785          | 18 |                  |        |      |

| HUESO-CARTÍLAGO NEOFORMADO MM (Micro) |   |                              |         |         |
|---------------------------------------|---|------------------------------|---------|---------|
| HSD de Tukey <sup>a,b</sup>           |   |                              |         |         |
| TIEMPO SEGUIMIENTO                    | N | Subconjunto para alfa = 0.05 |         |         |
|                                       |   | 1                            | 2       | 3       |
| 20 SEMANAS                            | 7 | 3,4571                       |         |         |
| 10 SEMANAS                            | 7 |                              | 20,8571 |         |
| 5 SEMANAS                             | 5 |                              |         | 49,5000 |
| Sig.                                  |   | 1,000                        | 1,000   | 1,000   |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,176.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 79. Tablas estadísticas de análisis de la variable neoformación de hueso y cartílago, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos

| Comparaciones múltiples                                     |                        |                            |              |      |                               |                 |
|---|------------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: HUESO-CARTÍLAGO NEOFORMADO MM (Micro) |                        |                            |              |      |                               |                 |
| HSD de Tukey  |                        |                            |              |      |                               |                 |
| (i) TIEMPO SEGUIMIENTO                                      | (j) TIEMPO SEGUIMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|   |                        |                            |              |      | Límite inferior               | Límite superior |
| 5 SEMANAS   | 10 SEMANAS             | 28,64286*                  | 5,64206      | ,000 | 14,0845                       | 43,2012         |
|   | 20 SEMANAS             | 46,04286*                  | 5,64206      | ,000 | 31,4845                       | 60,6012         |
| 10 SEMANAS  | 5 SEMANAS              | -28,64286*                 | 5,64206      | ,000 | -43,2012                      | -14,0845        |
|   | 20 SEMANAS             | 17,40000*                  | 5,15048      | ,010 | 4,1101                        | 30,6899         |
| 20 SEMANAS  | 5 SEMANAS              | -46,04286*                 | 5,64206      | ,000 | -60,6012                      | -31,4845        |
|   | 10 SEMANAS             | -17,40000*                 | 5,15048      | ,010 | -30,6899                      | -4,1101         |

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

### 6.2.1.5 Hallazgos Grupo Control

Dentro de este apartado del estudio del grupo control se realizará un resumen de las variables y su análisis estadístico y realizar una impresión de la evolución del injerto criopreservado (IMHC) sin el aporte del periostio vascularizado respecto a su consolidación y a la valoración de la revascularización del mismo. Posteriormente y tras exponer los resultados obtenidos del grupo periostio, se realizará un análisis comparativo entre ambos grupos que se desarrollará en el apartado 6.2.3 de este trabajo.

En primer lugar, cabe mencionar que la técnica quirúrgica que hemos realizado, basada en el modelo propugnado por Zhao L et al<sup>118</sup>, y cuyas modificaciones realizadas en nuestro estudio consideramos han mejorado tanto la técnica quirúrgica como el manejo preoperatorio y postoperatorio, ha resultado una técnica segura y reproducible, pese a que en los primeros especímenes hubo un aumento de las pérdidas en especial en este grupo (pues fue realizado antes que el grupo experimental) cosa que puede ser debida a la curva de aprendizaje de la cirugía.

El grupo control se compuso de 11 conejos macho y 9 hembras, sin mostrar diferencias entre los grupos en cuanto a su formación según el genero. Tampoco el peso fue un factor que mostrara una variación en los resultados, exceptuando la diferencia de pesos significativa estadísticamente entre el grupo GC5 y el resto de los grupos de control en el peso previo a la cirugía, no obstante este factor no se ha considerado determinante al ser un valor previo a la intervención del estudio. Todos los conejos viables han ido aumentando peso y han presentado una evolución correcta pese a pequeñas complicaciones menores. Únicamente un conejo presentó una clínica de infección quirúrgica que finalmente fue sacrificado por puntuación de punto final.



Dentro del estudio radiológico, entre sus variables cabe destacar varios resultados:

- La diástasis proximal y distal de la interfase entre el injerto y el hueso huésped no mostraron diferencias significativas por lo que consideramos que no ha creado un factor de confusión en la cirugía de cara a impedir la correcta consolidación de la interfase, incluso mejorando el tamaño de resección y ajustarlo al defecto crítico estipulado en los huesos largos del conejo en el estudio de Geiger F et al aunque no era el objetivo del estudio de esta tesis.
- Otro resultado a destacar es la presencia del callo óseo en los diferentes grupos y su evolución, se ha visto radiológicamente la aparición de éste callo óseo en el grupo de más corta evolución (5 semanas GC5) sin observarlo en los grupos de más larga evolución, pudiendo concluir que la formación del callo óseo sucede en las primeras semanas de evolución, posteriormente se organiza y se reduce hacia las 10 semanas post-intervención, sin evidencias del callo óseo a las 20 semanas de evolución. Ésta muestra obtiene también una correlación importante entre el callo óseo observado en las diferentes modalidades de estudio, tanto radiológico como macroscópico y microscópico.
- El análisis de la consolidación del injerto también mostró un hecho importante como es que, aunque la tasa de consolidación de la interfase IMHC-Hueso huésped a nivel radiológico ha sido elevada, no es despreciable el porcentaje de falta de consolidación, tanto a corto plazo (5 semanas evolución) con diferencias significativas respecto los otros dos grupos de seguimiento, como por la tasa de falta de consolidación/pseudoartrosis en alguno de los polos de manera global del grupo control (8 conejos de 20 animales en total del grupo)

A nivel macroscópico cabe decir, aparte de la correlación de la presencia de callo óseo radiológico y histológico (tanto macro como microscópico), que los márgenes de interfase no mostraron diferencias entre los grupos, a consonancia del estudio radiológico y que el color del injerto tampoco mostró diferencias entre los grupos, aunque se



puede observar una tendencia de los IMHC pertenecientes a este grupo control con exéresis del periostio, a poseer una coloración más frecuente de tonalidad amarilla/ocre en proporción 3 de cada 5 respecto a una coloración más blanca y similar al hueso nativo (2:5).

La longitud del remanente de injerto óseo en los diferentes grupos también mostró diferencias significativas entre sus grupos, y esta correlación fue también similar a la observada a nivel microscópico cosa que hace pensar que en los grupos más evolucionados y con seguimiento mas largo se produce una resorción de este injerto que progresivamente hace que su tamaño se vea reducido con el tiempo.

A nivel de las variables microscópicas, en primer lugar comentar la no presencia de periostio en la zona media del injerto en los diferentes animales intervenidos, cosa que nos muestra un sello de garantía y calidad de la resección perióstica realizada en este grupo, evidenciando su no presencia en la zona más aislada del IMHC.

El otro punto importante a nivel microscópico en este grupo es la observación de hueso y cartílago neoformado valorado por un patólogo experto que en el análisis estadístico evidenció diferencias comparando todos los grupos entre si con un aumento progresivo de la neoformación en etapas precoces del seguimiento (corto plazo) que con el tiempo de evolución mantiene una disminución progresiva, debido a la estabilización del proceso agudo de curación de la “fractura” inducida.

Al realizar el estudio comparativo entre ambos grupos, se evaluarán estos datos conjuntamente para inferir si el periostio puede poseer capacidad de revascularizar estos injertos criopreservados en apartados siguientes.

### 6.2.2 Análisis de resultados grupo periostio (GP)

El grupo periostio incluyó 20 especímenes seleccionados de la muestra y divididos, de la misma manera que el grupo control, en 3 subgrupos según el tiempo de evolución postoperatorio que se realizó, con 1 pérdida de un animal, siendo la composición final de los grupos de 5 conejos en el subgrupo GP5 a las 5 semanas de evolución, 7 conejos en el grupo de 10 semanas de evolución (GP10) y por último, 7 conejos destinados al grupo de control de 20 semanas de evolución postoperatoria (GP20).

Una vez divididos los conejos en los subgrupos de estudio y dado la distribución no simétrica y aleatorizada de los mismos, se realizó, de igual manera que en el grupo control, un estudio de la homogeneidad de grupos dentro de las variables demográficas como el sexo del animal, el peso inicial al iniciar la estabulación (peso de entrada) y el peso en el mismo día de la cirugía.

De la muestra de 19 conejos del grupo periostio, se incluyeron 12 machos (63,2%) y 7 hembras (36,8%), repartidos según las siguientes proporciones en los diferentes subgrupos (grafico 5):

- Grupo GP5 (3:2)
- Grupo GP10 (4:3)
- Grupo GP20 (5:2)

| Tabla de contingencia SEXO * TIEMPO SEGUIMIENTO |                                |                                |                    |            |            |        |
|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|------------|------------|--------|
|   |                                |                                | TIEMPO SEGUIMIENTO |            |            | Total  |
|   |                                |                                | 5 SEMANAS          | 10 SEMANAS | 20 SEMANAS |        |
| SEXO  | MACHO                          | Recuento                       | 3                  | 4          | 5          | 12     |
|   |                                | Frecuencia esperada            | 3,2                | 4,4        | 4,4        | 12,0   |
|   |                                | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 60,0%              | 57,1%      | 71,4%      | 63,2%  |
| SEXO  | HEMBRA                         | Recuento                       | 2                  | 3          | 2          | 7      |
|   |                                | Frecuencia esperada            | 1,8                | 2,6        | 2,6        | 7,0    |
|   |                                | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 40,0%              | 42,9%      | 28,6%      | 36,8%  |
| Total   | Recuento                       |                                | 5                  | 7          | 7          | 19     |
|   | Frecuencia esperada            |                                | 5,0                | 7,0        | 7,0        | 19,0   |
|   | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO |                                | 100,0%             | 100,0%     | 100,0%     | 100,0% |

| Pruebas de chi-cuadrado      |                   |    |                             |
|------------------------------|-------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor             | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | ,336 <sup>a</sup> | 2  | ,845                        |
| Razón de verosimilitudes     | ,342              | 2  | ,843                        |
| Asociación lineal por lineal | ,187              | 1  | ,665                        |
| N de casos válidos           | 19                |    |                             |

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,84.

Figura 80. Tablas de contingencia del estudio de la variable sexo, sin mostrar diferencias significativas respecto a la variable sexo.

Se comparó el sexo de los animales respecto los diferentes subgrupos (tiempo de seguimiento) mediante una tabla de contingencia y posterior estudio estadístico mediante el test de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con una  $p = 0,845$ , no observando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto a la variable del sexo del animal (figura 80).

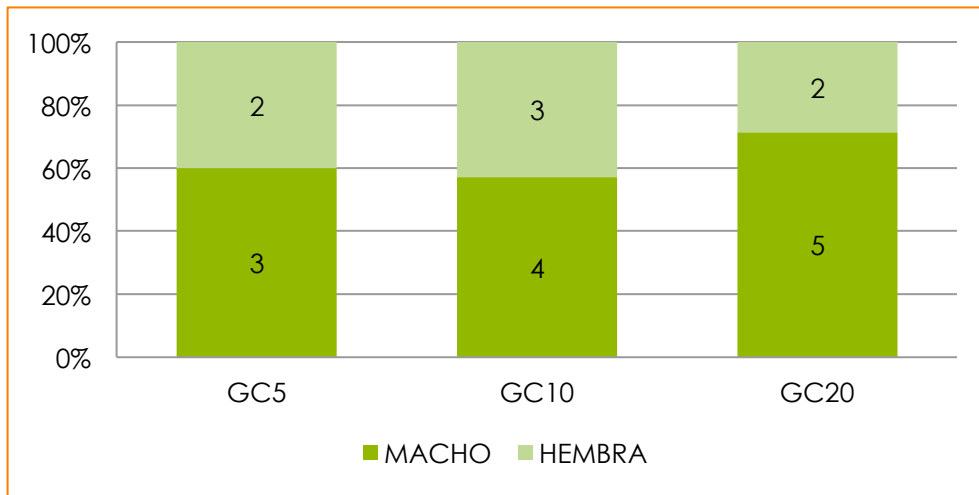


Gráfico 5. Gráfico de frecuencias y distribución por sexos subgrupos control

Respecto al peso inicial, la media de todos los grupos se situó en un  $1,74 \pm 0,16$  kg al inicio del estudio, no realizándose la media dentro de los diferentes grupos pues no se había introducido ningún factor modificador y el peso era del que partían los especímenes a su entrada a estabulación. En el estudio estadístico se observó una homogeneidad de varianzas tras el análisis de ANOVA de un factor con una  $p = 0,699$ . En este caso se utilizó una prueba no paramétrica como el test de Tukey para observar que no existieron diferencias significativas entre los tres grupos de seguimiento respecto del peso inicial de los conejos ( $p=0,730$ ) (figura 81).

| ANOVA de un factor |                   |    |                  |      |      |
|--------------------|-------------------|----|------------------|------|------|
| PESO ENTRADA (Kg)  |                   |    |                  |      |      |
|                    | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F    | Sig. |
| Inter-grupos       | ,021              | 2  | ,011             | ,367 | ,699 |
| Intra-grupos       | ,469              | 16 | ,029             |      |      |
| Total              | ,490              | 18 |                  |      |      |

| PESO ENTRADA (Kg)           |   |                              |
|-----------------------------|---|------------------------------|
| HSD de Tukey <sup>a,b</sup> |   |                              |
| TIEMPO SEGUIMIENTO          | N | Subconjunto para alfa = 0,05 |
| 20 SEMANAS                  | 7 | 1,7071                       |
| 5 SEMANAS                   | 5 | 1,7200                       |
| 10 SEMANAS                  | 7 | 1,7814                       |
| Sig.                        |   | ,730                         |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,176.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 81. Estudio estadístico del peso inicial de los conejos del grupo periostio sin mostrar diferencias significativas entre grupos (p=0,730)

| Comparaciones múltiples                 |                        |                            |              |      |                               |                 |
|---|------------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: PESO ENTRADA (Kg) |                        |                            |              |      |                               |                 |
| HSD de Tukey                            |                        |                            |              |      |                               |                 |
| (I) TIEMPO SEGUIMIENTO                  | (J) TIEMPO SEGUIMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|   |                        |                            |              |      | Límite inferior               | Límite superior |
| 5 SEMANAS                               | 10 SEMANAS             | -,06143                    | ,10021       | ,815 | -,3200                        | ,1971           |
|   | 20 SEMANAS             | ,01286                     | ,10021       | ,991 | -,2457                        | ,2714           |
| 10 SEMANAS                              | 5 SEMANAS              | ,06143                     | ,10021       | ,815 | -,1971                        | ,3200           |
|   | 20 SEMANAS             | ,07429                     | ,09148       | ,701 | -,1618                        | ,3103           |
| 20 SEMANAS                              | 5 SEMANAS              | -,01286                    | ,10021       | ,991 | -,2714                        | ,2457           |
|   | 10 SEMANAS             | -,07429                    | ,09148       | ,701 | -,3103                        | ,1618           |

Tras la estabulación de los conejos para el paso de la cuarentena (15 días) se realizó un pesaje de todos los sujetos, donde se obtuvo una media de peso de  $2,49 \pm 0,072$  kg. Así mismo, se realizó el análisis de la varianza obteniendo una homogeneidad de las mismas (Levene  $p=0,092$ ) pero presentando un test de ANOVA con diferencias significativas ( $p=0,002$ ) entre el peso previo a cirugía del grupo de 5 semanas (GP5) respecto los otros dos grupos (que no mostraron diferencias entre ellos) (figura 82).

| Comparaciones múltiples            |                        |                            |              |      |                               |                 |
|------------------------------------|------------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: PESO IQ (Kg) |                        |                            |              |      |                               |                 |
| HSD de Tukey                       |                        |                            |              |      |                               |                 |
| (I) TIEMPO SEGUIMIENTO             | (J) TIEMPO SEGUIMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|                                    |                        |                            |              |      | Límite inferior               | Límite superior |
| 5 SEMANAS                          | 10 SEMANAS             | -,56171                    | ,13074       | ,002 | -,8991                        | -,2244          |
|                                    | 20 SEMANAS             | -,45171*                   | ,13074       | ,009 | -,7891                        | -,1144          |
| 10 SEMANAS                         | 5 SEMANAS              | ,56171                     | ,13074       | ,002 | ,2244                         | ,8991           |
|                                    | 20 SEMANAS             | ,11000                     | ,11935       | ,635 | -,1980                        | ,4180           |
| 20 SEMANAS                         | 5 SEMANAS              | ,45171                     | ,13074       | ,009 | ,1144                         | ,7891           |
|                                    | 10 SEMANAS             | -,11000                    | ,11935       | ,635 | -,4180                        | ,1980           |

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

| PESO IQ (Kg)                |   |                              |        |
|-----------------------------|---|------------------------------|--------|
| HSD de Tukey <sup>a,b</sup> |   |                              |        |
| TIEMPO SEGUIMIENTO          | N | Subconjunto para alfa = 0.05 |        |
|                             |   | 1                            | 2      |
| 5 SEMANAS                   | 5 | 2,1240                       |        |
| 20 SEMANAS                  | 7 |                              | 2,5757 |
| 10 SEMANAS                  | 7 |                              | 2,6857 |
| Sig.                        |   | 1,000                        | ,669   |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,176.  
 b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 82. Tabla de análisis estadístico post-hoc de la variable peso previo IQ mostrando diferencias significativas estadísticamente en el peso del grupo GP5 respecto los otros dos grupos control (GP10 y GP20)

Tras el proceso postoperatorio y la correcta evolución de los conejos, una vez normalizada la tendencia a la ganancia de peso se realizó una nueva medida de peso a los 15 días postoperatorios, realizándose el mismo análisis estadístico que con los pesos previos, mostrando un test de Levene con un valor de  $p=0,457$ . En el test de ANOVA se observaron diferencias entre los diferentes grupos de seguimiento ( $p=0,001$ ) y mediante el test de Tukey se observó diferencias significativas en el peso postoperatorio a las 2 semanas del grupo GP5 respecto los grupos GP10 y GP20 (figura 83).

| Comparaciones múltiples                   |                        |                            |              |      |                               |                 |
|---|------------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: PESO 2 SEMANAS (Kg) |                        |                            |              |      |                               |                 |
| HSD de Tukey                              |                        |                            |              |      |                               |                 |
| (I) TIEMPO SEGUIMIENTO                    | (J) TIEMPO SEGUIMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|   |                        |                            |              |      | Límite inferior               | Límite superior |
| 5 SEMANAS                                 | 10 SEMANAS             | -,78600                    | ,15941       | ,000 | -1,1973                       | -,3747          |
|   | 20 SEMANAS             | -,52743*                   | ,15941       | ,012 | -,9387                        | -,1161          |
| 10 SEMANAS                                | 5 SEMANAS              | ,78600                     | ,15941       | ,000 | ,3747                         | 1,1973          |
|   | 20 SEMANAS             | ,25857                     | ,14552       | ,209 | -,1169                        | ,6341           |
| 20 SEMANAS                                | 5 SEMANAS              | ,52743                     | ,15941       | ,012 | ,1161                         | ,9387           |
|   | 10 SEMANAS             | -,25857                    | ,14552       | ,209 | -,6341                        | ,1169           |

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

| PESO 2 SEMANAS (Kg)         |   |                              |        |
|-----------------------------|---|------------------------------|--------|
| HSD de Tukey <sup>a,b</sup> |   |                              |        |
| TIEMPO SEGUIMIENTO          | N | Subconjunto para alfa = 0.05 |        |
|                             |   | 1                            | 2      |
| 5 SEMANAS                   | 5 | 2,3840                       |        |
| 20 SEMANAS                  | 7 |                              | 2,9114 |
| 10 SEMANAS                  | 7 |                              | 3,1700 |
| Sig.                        |   | 1,000                        | ,247   |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,176.  
 b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 83. Tabla de análisis de pruebas post hoc (Test Tukey) mostrando diferencias significativas entre el grupo GP5 respecto los grupos GP10 y GP 20 respectivamente.

Al finalizar el seguimiento definitivo y el día de la eutanasia programada de los conejos se realizó una última medida de peso que tras el estudio estadístico y al igual que en el grupo control y las diferencias de seguimiento, debido a la tendencia natural del crecimiento y aumento de la ingesta de los animales, mostraron diferencias significativas en el peso final de los sujetos comparando los 3 subgrupos (grafico 6).

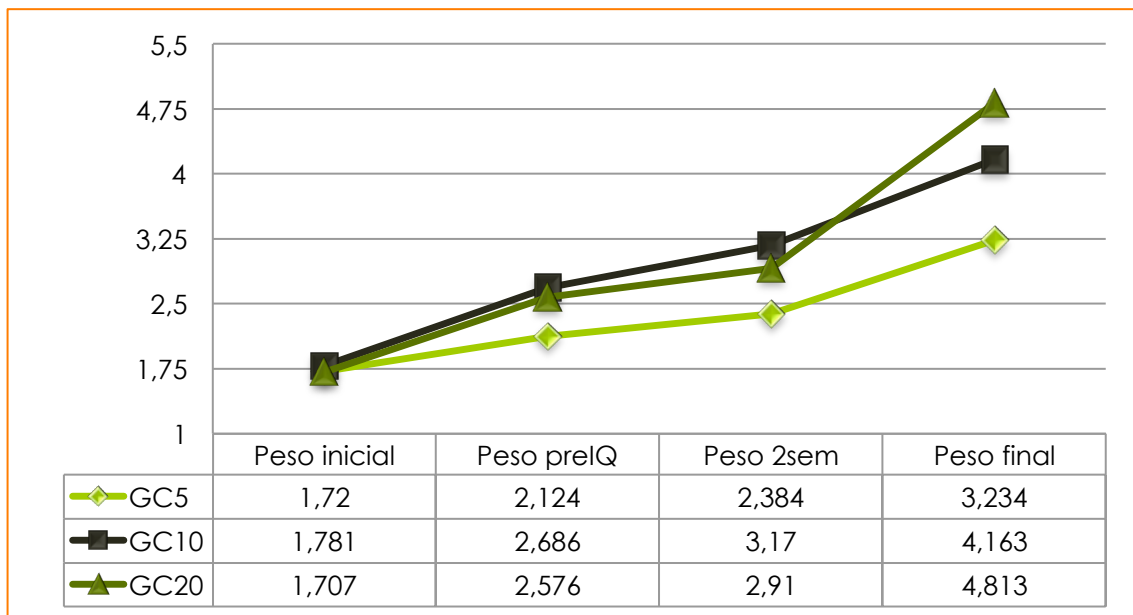


Grafico 6. Desarrollo y evolutivo de la media de peso animales grupo control

Cabe concluir que, si bien apareció una diferencia significativa en la fase de control de peso previa IQ en el grupo GC5 respecto de los otros dos grupos control, las características demográficas de los grupos de estudio se mantenían homogéneos, sin diferencias en cuanto a la composición por sexo de los grupos, como la evolución del peso, tanto inicial, como durante el seguimiento de los conejos. Se ha considerado innecesario realizar un estudio comparativo de los resultados del peso final de los animales puesto que difiere en el punto final de los mismos y no aportaba datos de interés a la comparación de los grupos dentro del grupo control.

### 6.2.2.1 Supervivencia / Mortalidad

La evolución de los animales en el postoperatorio fue una condición indispensable para la continuación del estudio. Tal como se ha realizado en el grupo control, se exponen más abajo los seguimientos de los conejos del grupo periostio.

- Se introdujeron en el grupo periostio en un principio 20 especímenes de conejo, de los cuales se validaron para el estudio 19 teniendo una pérdida de en el postoperatorio:

- El espécimen que fue *exitus* en el grupo periostio fue el Rb20 que si bien se intervino con éxito, en el seguimiento el segundo día se encontró muerto en



la jaula sin evidencia de alteraciones a nivel de la extremidad intervenida

- Ningún animal del grupo presentó complicaciones preoperatorias en la inducción anestésica ni en el bloqueo axilar.
- El conejo Rb 23 (GC20) presentó un hematoma postoperatorio en la extremidad intervenida que no requirió revisión ni presentó complicaciones posteriores (figura 84).
- El conejo Rb41, perteneciente al grupo GP5 también presentó problemas locales a nivel de la extremidad intervenida, presentando un edema sin fôvea que se resolvió a los 5 días sin otras complicaciones secundarias.

- Al igual que sucedió en los anteriores grupos, en las primeras 72 horas la ingesta sólida y líquida se encontraba disminuida en gran parte de los conejos intervenidos, normalizándose posteriormente sin más incidencias. Al igual que ocurrió en el grupo control, 2 conejos de este grupo, el Rb22 y el Rb24 (grupos GP10 y GP20 respectivamente) requirieron el aporte de pienso especializado de cuidados críticos (Oxbow® Critical Care) por no ingesta en las primeras 24 horas.



Figura 84. Rb23, obsérvese el hematoma postoperatorio en extremidad intervenida. La tinción plateada es secundaria a la cura con Aluspray® de la herida quirúrgica

- El conejo Rb31 (GP 20) presentó descomposición (diarrea) las primeras 36 horas postoperatorias que se autolimitó a las pocas horas. En el resto de conejos intervenidos del grupo, en todo momento durante el seguimiento se observó un ritmo de excrementos constante y un aumento progresivo del peso corporal
- No se observó un aumento patológico de la temperatura corporal de los conejos, ésta se mantuvo constante alrededor de los 38,8-39,5°C, condición habitual en estos animales, tampoco se observaron alteraciones a nivel cutáneo en la zona de incisión que pudieran indicar una infección aguda-subaguda de la cirugía en los conejos viables.
- El conejo Rb26 presentó una erosión a nivel lumbar en el postoperatorio que no requirió intervención y fue cicatrizada sin otras alteraciones.



- En el conejo Rb25 (GP20), durante la intervención quirúrgica se produjo una pequeña fractura no desplazada del segmento proximal del hueso nativo, sin evidenciar alteraciones en la estabilidad del montaje ni en el seguimiento posterior, llevando a término una evolución normal y un análisis dentro del grupo perteneciente.
- Al igual que en la evaluación de los conejos del grupo control, en el grupo periostio, no se observaron alteraciones en el pelaje de los animales ni alteraciones en la condición corporal en los animales viables durante el periodo de seguimiento. En cuanto al comportamiento de los animales, tanto el provocado como el espontáneo se encontraban disminuidos en las primeras 24 horas tras la cirugía, recuperando posteriormente un nivel adecuado.
- Se observó una carga parcial - descarga de la extremidad en los animales intervenidos entre las 6 y las 24 horas postoperatorias, iniciando carga completa aunque con cojera durante los días siguientes en el postoperatorio incluido el conejo Rb25 que presentó la fractura intraoperatoria.

### 6.2.2.2 Análisis radiológico

Los conejos fueron sometidos a fluoroscopia en el momento de la cirugía para control de la zona fisaria previa IQ y posteriormente de nuevo se evaluó al finalizar la cirugía para comprobación de correcta situación del injerto y la fijación y en ese momento se obtenían los datos de diástasis distal y proximal para obtener una muestra de calidad de la síntesis realizada. A los 15 días postoperatorios se realizó una nueva fluoroscopia rutinaria para control de complicaciones a nivel de la síntesis o del aloinjerto. Por último, un nuevo control mediante radiología se realizaba tras la eutanasia del animal observando la estructura del aloinjerto, la presencia de callo óseo y la presencia de sinostosis radiocubital.

A continuación se exponen las tablas de recogida de datos de las variables incluidas en el estudio radiológico (tabla 12) según los subgrupos pertenecientes al grupo periostio :

#### Estudio radiológico

| Conejo     | Diástasis proximal (mm) | Diástasis distal (mm) | Callo óseo | Consolidación injerto | Sinostosis RC |
|------------|-------------------------|-----------------------|------------|-----------------------|---------------|
| <b>GP5</b> |                         |                       |            |                       |               |
| 37         | 2                       | 1                     | SI         | SI                    | SI            |
| 38         | 2                       | 1                     | SI         | SI                    | SI            |
| 39         | 1                       | 0                     | SI         | NO                    | NO            |
| 40         | 0                       | 1                     | SI         | SI                    | SI            |
| 41         | 1                       | 2                     | SI         | SI                    | SI            |

#### **GP10**

| Conejo | Diástasis proximal (mm) | Diástasis distal (mm) | Callo óseo | Consolidación injerto | Sinostosis RC |
|--------|-------------------------|-----------------------|------------|-----------------------|---------------|
| 12     | 0                       | 0                     | SI         | SI                    | NO            |
| 13     | 1                       | 1                     | NO         | SI                    | NO            |
| 22     | 0                       | 1                     | SI         | SI                    | SI            |
| 33     | 1                       | 1                     | NO         | SI                    | SI            |
| 34     | 1                       | 1                     | SI         | SI                    | NO            |
| 35     | 0                       | 1                     | NO         | SI                    | SI            |
| 36     | 1                       | 1                     | NO         | SI                    | NO            |

| GP20   |                         |                       |            |                       |               |
|--------|-------------------------|-----------------------|------------|-----------------------|---------------|
| Conejo | Diástasis proximal (mm) | Diástasis distal (mm) | Callo óseo | Consolidación injerto | Sinostosis RC |
| 23     | 1                       | 1                     | NO         | SI                    | NO            |
| 24     | 2                       | 1                     | NO         | SI                    | NO            |
| 25     | 1                       | 2                     | NO         | SI                    | SI            |
| 26     | 0                       | 0                     | NO         | SI                    | NO            |
| 30     | 2                       | 1                     | NO         | SI                    | SI            |
| 31     | 3                       | 1                     | NO         | SI                    | NO            |
| 32     | 1                       | 1                     | NO         | SI                    | NO            |

Tabla 12. Resultados de las variables radiológicas del grupo periostio

El estudio de la presencia de diástasis del foco, tanto proximal como distal, al igual que el grupo control no demostró diferencias entre los subgrupos de seguimiento de los conejos, con un test de ANOVA en la variable de diástasis proximal de  $p=0,152$  y un test de ANOVA en la variable diástasis distal de  $p=0,863$ . Así mismo, el estudio de las pruebas post hoc (Prueba de Tukey) tampoco mostró diferencias con significación estadística en ninguno de los dos grupos por lo que podemos concluir que la diástasis presente en el foco de interfase entre el injerto y el hueso nativo del animal no ha sido un factor de confusión para la evolución posterior de la consolidación del injerto en ninguno de los dos grupos (figura 85).

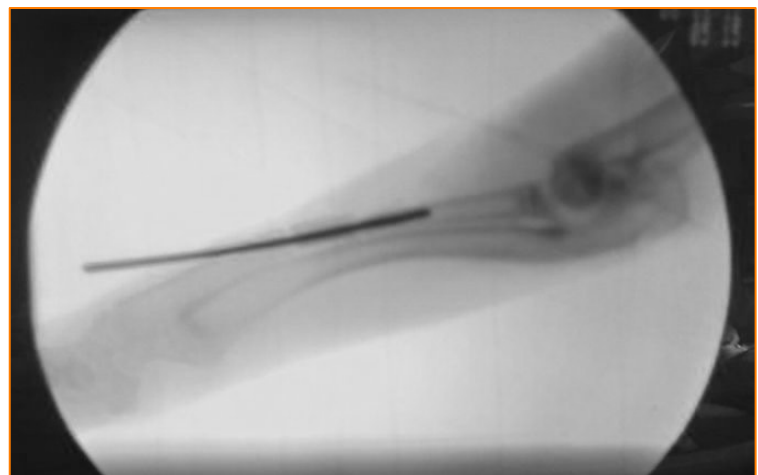


Figura 85. Control radiológico postoperatorio. Se observa diástasis de foco proximal de 1mm y distal de 1 mm respectivamente

Respecto al callo óseo observable en los subgrupos del grupo periostio, se observó que el callo óseo se presentaba de manera constante en el grupo GP5, mientras que a medida que se realizaba el seguimiento a más largo plazo este callo óseo iba en descenso, siendo estas diferencias significativas estadísticamente respecto a la evolución del callo óseo en el grupo GP5 y los grupos GP10 y GP20 ( $p=0,003$ ). Esta variable mostró un coeficiente de contingencia de  $p=0,622$ , interpretándose que la asociación entre la variable

callo óseo a nivel radiológico y la variable de seguimiento (subgrupos de evolución) es moderada (figura 86).

| Tabla de contingencia CALLO ÓSEO (Rx) * TIEMPO SEGUIMIENTO |    |                                |                    |            |            |        |
|--|----|--------------------------------|--------------------|------------|------------|--------|
|  |    |                                | TIEMPO SEGUIMIENTO |            |            | Total  |
|  |    |                                | 5 SEMANAS          | 10 SEMANAS | 20 SEMANAS |        |
| CALLO ÓSEO (Rx)  | NO | Recuento                       | 0                  | 4          | 7          | 11     |
|  |    | Frecuencia esperada            | 2,9                | 4,1        | 4,1        | 11,0   |
|  |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 0,0%               | 57,1%      | 100,0%     | 57,9%  |
|  | SI | Recuento                       | 5                  | 3          | 0          | 8      |
|  |    | Frecuencia esperada            | 2,1                | 2,9        | 2,9        | 8,0    |
|  |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 42,9%      | 0,0%       | 42,1%  |
| Total  |    | Recuento                       | 5                  | 7          | 7          | 19     |
|  |    | Frecuencia esperada            | 5,0                | 7,0        | 7,0        | 19,0   |
|  |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 100,0%     | 100,0%     | 100,0% |

| Pruebas de chi-cuadrado      |                     |    |                             |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor               | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | 11,968 <sup>a</sup> | 2  | ,003                        |
| Razón de verosimilitudes     | 16,303              | 2  | ,000                        |
| Asociación lineal por lineal | 11,251              | 1  | ,001                        |
| N de casos válidos           | 19                  |    |                             |

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,11.

| Medidas simétricas  |                              |       |                 |
|---------------------|------------------------------|-------|-----------------|
|                     |                              | Valor | Sig. aproximada |
| Nominal por nominal | Phi                          | ,794  | ,003            |
|                     | V de Cramer                  | ,794  | ,003            |
|                     | Coefficiente de contingencia | ,622  | ,003            |
| N de casos válidos  |                              | 19    |                 |

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.  
 b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

Figura 86. Tablas de contingencia mostrando el análisis estadístico comparativo entre el tiempo de evolución (subgrupo de seguimiento) y la presencia de callo óseo en los grupos periostio.

Posteriormente se ha valorado la consolidación del injerto en el grupo periostio respecto del seguimiento de los diferentes subgrupos (GP5, GP10 y GP20), el estudio analítico se realizó mediante el test de chi-cuadrado, sin obtener una asociación estadísticamente significativa en entre la consolidación del injerto y el tiempo de evolución mostrando un valor de  $p=0,702$ , cosa que se interpreta como una consolidación primaria del injerto en el primer grupo de periostio a las 5 semanas y que posteriormente en los otros grupos control este fenómeno ya ha sucedido y se confirma a las 10 y 20 semanas. A diferencia del grupo control, en el grupo experimental con el periostio vascularizado, se ha observado únicamente 1 falta de consolidación radiológica en el grupo GP5 (figura 87) mientras que en los grupos de seguimiento más largo (grupos GP10 y GP20), no se han observado fenómenos de pseudoartrosis o falta consolidación en el grupo experimental con periostio

vascularizado asociado al injerto intercalar congelado (IMHC). Así pues, el recuento final de problemas de consolidación muestra un 5% del total de animales pertenecientes al grupo experimental (figuras 88, 89, 90 y 91).

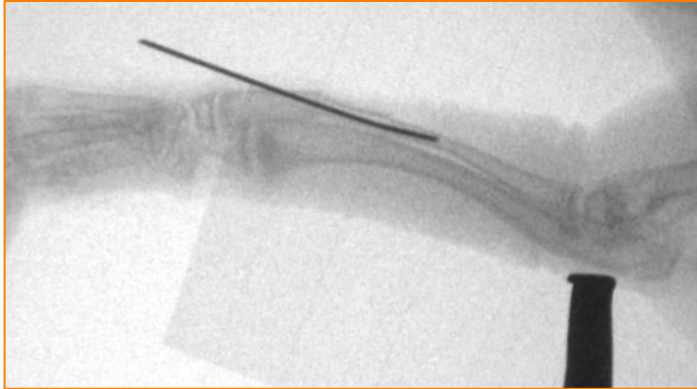


Figura 87. Imágenes radiológica de falta de consolidación en interfase proximal de injerto-hueso nativo a las 5 semanas de evolución (Rb39 - GP5)

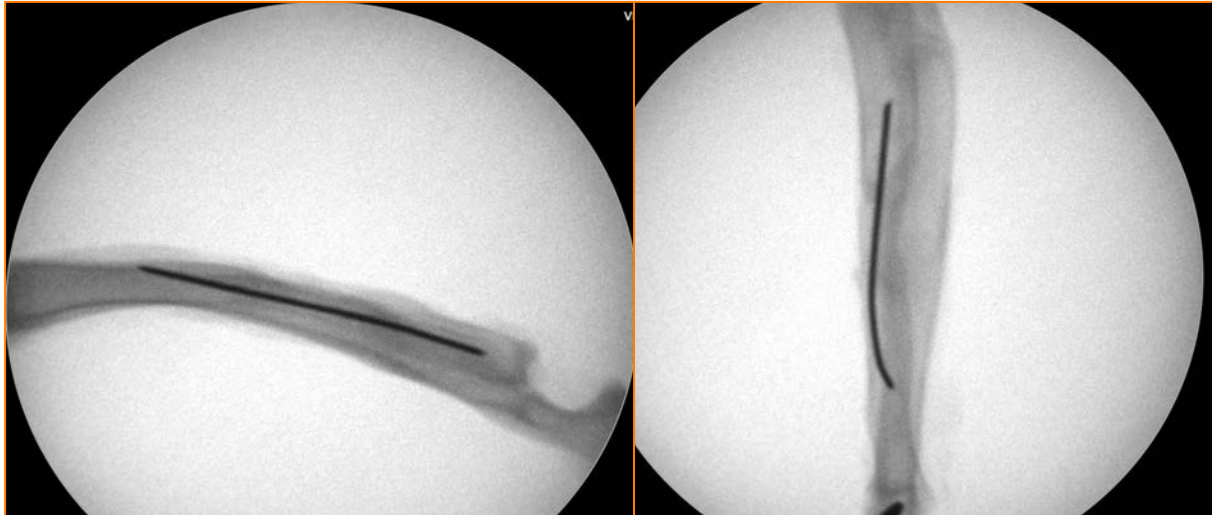


Figura 88. Imágenes radiológicas de 5 semanas de evolución en el grupo experimental (Grupo GP5) observándose signos de callo óseo periférico y consolidación incipiente.

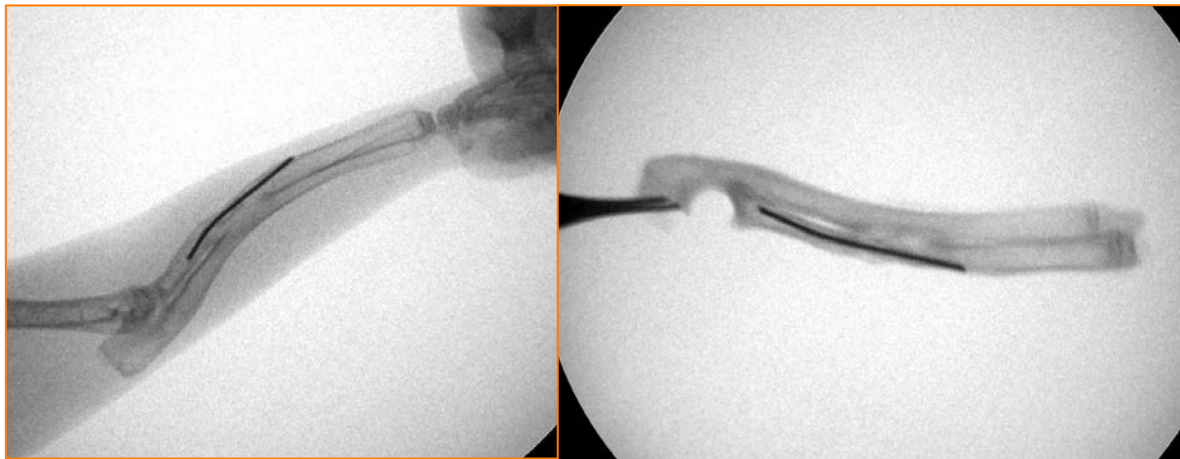


Figura 89. Imágenes radiológicas de 10 semanas evolución (Grupo GP10) observándose signos de consolidación del IMHC sin evidencia de callo óseo

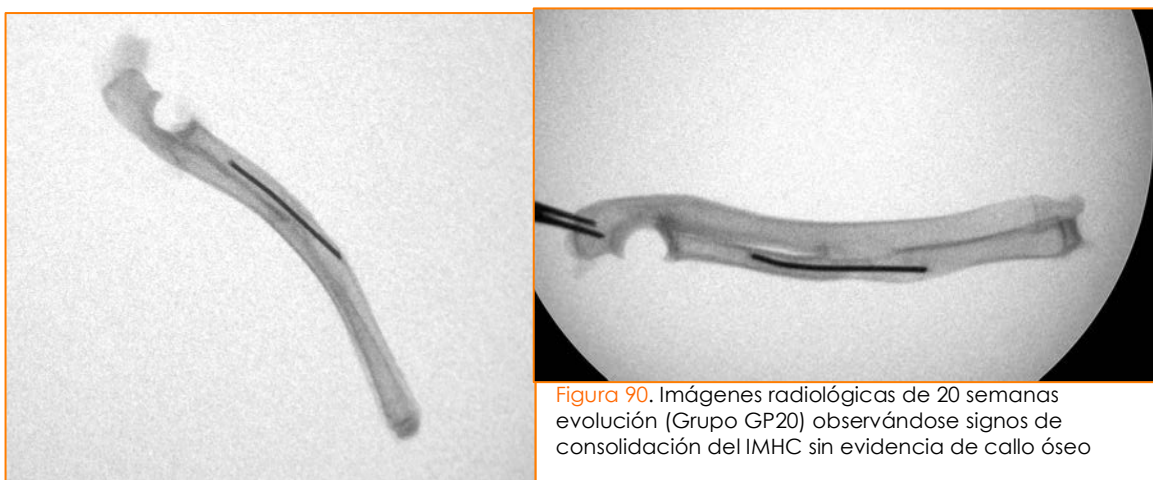


Figura 90. Imágenes radiológicas de 20 semanas evolución (Grupo GP20) observándose signos de consolidación del IMHC sin evidencia de callo óseo

| Pruebas de chi-cuadrado      |                   |    |                             |
|------------------------------|-------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor             | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | ,706 <sup>a</sup> | 2  | ,702                        |
| Razón de verosimilitudes     | ,748              | 2  | ,688                        |
| Asociación lineal por lineal | ,598              | 1  | ,439                        |
| N de casos válidos           | 20                |    |                             |

a. 5 casillas (83,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,75.

Figura 91. Tabla de test estadístico Chi-cuadrado con valor no significativo estadísticamente ( $p=0,702$ )

La última variable estudiada dentro del análisis radiológico de los grupos de estudio experimental fue, al igual que en el grupo control previamente, la identificación radiológica de una fusión de ambos huesos del antebrazo del animal formando una sinostosis radiocubital secundaria a la intervención quirúrgica.

Se decidió evaluar la variable de forma dicotómica observando la presencia o no de fusión secundaria a nivel medio de ambos huesos. Al tratarse de una variable dicotómica, el test estadístico utilizado fue el test de chi-cuadrado, que mostró un valor de  $p=0,203$  sin mostrar diferencias estadísticamente significativa entre la asociación de la sinostosis radiocubital secundaria con el tiempo de evolución, obteniendo un porcentaje alrededor de un 50% entre ambos resultados (presencia/ausencia) (figuras 92 y 93). Este resultado se puede interpretar como un efecto protector de la membrana perióstica para evitar la sinostosis radiocubital por el descenso de la frecuencia respecto de los sinostosis en los grupos controles, aunque debido al poder de regeneración ósea, una lesión de esta membrana perióstica puede explicar el traspaso de hematoma postquirúrgico con factores de crecimiento que promueven la consolidación ósea y de ese modo, aumentar la frecuencia de sinostosis en el grupo experimental.



**Figura 92.** Imágenes pertenecientes a especímenes de 10 semanas evolución (GP10) (a) y 20 semanas respectivamente (GP20) (b) mostrando la aparición de sinostosis radiocubital tras intervención.



| Tabla de contingencia SINÓSTOSIS RADIOCUBITAL (Rx) * TIEMPO SEGUIMIENTO |                                |                                |                    |            |            |       |
|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|------------|------------|-------|
|   |                                |                                | TIEMPO SEGUIMIENTO |            |            | Total |
|   |                                |                                | 5 SEMANAS          | 10 SEMANAS | 20 SEMANAS |       |
| SINÓSTOSIS RADIOCUBITAL (Rx)  | NO                             | Recuento                       | 1                  | 4          | 5          | 10    |
|   |                                | Frecuencia esperada            | 2,6                | 3,7        | 3,7        | 10,0  |
|   |                                | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 20,0%              | 57,1%      | 71,4%      | 52,6% |
|   | SI                             | Recuento                       | 4                  | 3          | 2          | 9     |
|   |                                | Frecuencia esperada            | 2,4                | 3,3        | 3,3        | 9,0   |
|   |                                | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 80,0%              | 42,9%      | 28,6%      | 47,4% |
| Total   | Recuento                       | 5                              | 7                  | 7          | 19         |       |
|   | Frecuencia esperada            | 5,0                            | 7,0                | 7,0        | 19,0       |       |
|   | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%                         | 100,0%             | 100,0%     | 100,0%     |       |

| Pruebas de chi-cuadrado      |                    |    |                             |
|------------------------------|--------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor              | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | 3,185 <sup>a</sup> | 2  | ,203                        |
| Razón de verosimilitudes     | 3,346              | 2  | ,188                        |
| Asociación lineal por lineal | 2,800              | 1  | ,094                        |
| N de casos válidos           | 19                 |    |                             |

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,37.

**Figura 93.** Tabla de contingencia de sinostosis radiocubital con tiempo de seguimiento. Test estadístico Chi-cuadrado con valor p=0,203 sin significación estadística.



### 6.2.2.3 Análisis macroscópico

Siguiendo la misma metodología para la obtención de las muestras respecto del grupo control, se planificó la eutanasia programada en el momento final de seguimiento del conejo según el grupo perteneciente, se procedió a la necropsia de todos los animales, incluido el animal Rb20 que fue *exitus* previo a la finalización del seguimiento para estudio postmortem y objetivar si la cirugía era una posible causa desencadenante de la muerte del animal.

Una vez realizada la eutanasia de los animales en el último punto de control se procedía a la disección cutánea y posteriormente disección cuidadosa de la extremidad intervenida y obtención de las muestras estructurales del segmento de antebrazo del animal realizando una exéresis de los compartimentos musculares, preservando la cobertura musculo-fibrosa alrededor de la zona intervenida con la intención de no dañar ni alterar la zona intervenida para su posterior estudio histológico microscópico (figura 94).



Figura 94. Pieza de resección tras eutanasia del animal para estudio macroscópico

A nivel macroscópico de la muestra la intención era evaluar clínicamente la evolución de los IMHC tras el tiempo de evolución clínica de cada grupo y su consistencia, signos de vitalidad y objetivación de la consolidación ósea en el aspecto clínico para complementar el estudio radiológico. Las primeras variables a analizar fueron el calculo milimétrico de la evolución de los márgenes proximal y distal de la interfase hueso huésped y aloinjerto. Las mediciones de las variables macroscópicas cuantitativas se

realizaron mediante calculo *de visu* con cartabón de corredera (pie de rey) y regla milimetrada flexible.

Tabla 13. Resultados de las variables macroscópicas en el grupo periostio

| Conejo      | Estudio macroscópico |                    |            |                       |               |
|-------------|----------------------|--------------------|------------|-----------------------|---------------|
|             | Margen proximal (mm) | Margen distal (mm) | Callo óseo | Longitud injerto (mm) | Color injerto |
| <b>GP5</b>  |                      |                    |            |                       |               |
| 37          | 0                    | 0                  | SI         | 70                    | BLANCO        |
| 38          | 0                    | 0                  | SI         | 90                    | AMARILLO      |
| 39          | 0                    | 0                  | SI         | 80                    | BLANCO        |
| 40          | 0                    | 0                  | SI         | 60                    | BLANCO        |
| 41          | 0                    | 0                  | SI         | 70                    | BLANCO        |
| <b>GP10</b> |                      |                    |            |                       |               |
| 12          | 0                    | 0                  | SI         | 60                    | BLANCO        |
| 13          | 0                    | 0                  | SI         | 60                    | BLANCO        |
| 22          | 0                    | 0                  | SI         | 40                    | BLANCO        |
| 33          | 0                    | 0                  | SI         | 60                    | BLANCO        |
| 34          | 0                    | 0                  | SI         | 80                    | BLANCO        |
| 35          | 1                    | 0                  | SI         | 70                    | AMARILLO      |
| 36          | 0                    | 0                  | SI         | 70                    | BLANCO        |
| <b>GP20</b> |                      |                    |            |                       |               |
| 23          | 0                    | 0                  | NO         | 60                    | AMARILLO      |
| 24          | 0                    | 0                  | NO         | 40                    | BLANCO        |
| 25          | 0                    | 0                  | NO         | 50                    | BLANCO        |
| 26          | 0                    | 0                  | NO         | 50                    | BLANCO        |
| 30          | 0                    | 0                  | NO         | 30                    | BLANCO        |
| 31          | 0                    | 0                  | NO         | 40                    | BLANCO        |
| 32          | 0                    | 0                  | NO         | 50                    | BLANCO        |

En el estudio de la variables de los márgenes proximal y distal no se pudieron realizar los respectivos análisis estadísticos. En la primera variable (margen proximal) se observaron diferencias en la homogeneidad de varianzas por lo que se procedió a realizar el estudio mediante la prueba de Welch (ANOVA no se podía realizar por no ser homogéneas (Levene  $p=0,02$ )) aunque no se pudo ejecutar al presentar una de las variables una varianza de 0.

Respecto la variable que estudiaba el margen distal resultó ser una constante en todos los grupo con un valor de 0, por lo que no hay opción de estudio estadístico.

El grado de consolidación del injerto y su tiempo de evolución si que pudo ser estudiado, valorándose la presencia macroscópica de callo óseo en la muestra de disección, con la escala presentada en el estudio del grupo control que recordemos constaba de 3 ítems:

- Observación de callo proximal y distal en interfases hueso-IMHC
  - o Presente 1, no presente 0 (por cada interfase)
- La movilización del injerto
  - o Injerto no móvil 1, móvil 0
- La consistencia de las interfases mediante punción
  - o Duro 1, fibroso o no presente 0 (por cada interfase)

obteniendo una medida del estado del callo óseo evaluándolo como presente o no convirtiendo las mediciones agrupadas según la puntuación obtenida (se consideró presencia de callo óseo con una puntuación de  $>4$ ) en una cualitativa dicotómica para posterior estudio estadístico mediante test de chi-cuadrado (figura 95).



Figura 95. Pieza de resección GP20 (Rb32) con resultado de callo óseo no presente con puntuación de 3 (injerto no móvil, no callo proximal ni distal presente y consistencia proximal y distal dura).

El estudio estadístico de la variable callo óseo macroscópico se realizó mediante test de chi-cuadrado y mostró, al igual que el grupo control, con un valor de  $p=0,000$ , significación estadística en cuanto a la asociación de callo óseo con el tiempo de seguimiento, presentándose en mayor frecuencia en el grupo de evolución a las 5 y 10 semanas (GP5 y GP10) respecto al subgrupo de seguimiento de 20 semanas (GP20) (figura 96).

| Tabla de contingencia CALLO ÓSEO (Macro) * TIEMPO SEGUIMIENTO |    |                                |                    |            |            |        |
|---|----|--------------------------------|--------------------|------------|------------|--------|
|   |    |                                | TIEMPO SEGUIMIENTO |            |            | Total  |
|   |    |                                | 5 SEMANAS          | 10 SEMANAS | 20 SEMANAS |        |
| CALLO ÓSEO (Macro)  | NO | Recuento                       | 0                  | 0          | 7          | 7      |
|   |    | Frecuencia esperada            | 1,8                | 2,6        | 2,6        | 7,0    |
|   |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 0,0%               | 0,0%       | 100,0%     | 36,8%  |
|   | SI | Recuento                       | 5                  | 7          | 0          | 12     |
|   |    | Frecuencia esperada            | 3,2                | 4,4        | 4,4        | 12,0   |
|   |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 100,0%     | 0,0%       | 63,2%  |
| Total   |    | Recuento                       | 5                  | 7          | 7          | 19     |
|   |    | Frecuencia esperada            | 5,0                | 7,0        | 7,0        | 19,0   |
|   |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 100,0%     | 100,0%     | 100,0% |

| Pruebas de chi-cuadrado      |                     |    |                             |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor               | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | 19,000 <sup>a</sup> | 2  | ,000                        |
| Razón de verosimilitudes     | 25,008              | 2  | ,000                        |
| Asociación lineal por lineal | 13,547              | 1  | ,000                        |
| N de casos válidos           | 19                  |    |                             |

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,84.

Figura 96. Estudio estadístico de la variable callo óseo mostrando diferencias significativas entre los subgrupos experimentales por tiempo de seguimiento con p=0,000.

A nivel macroscópico también fue evaluada la longitud del injerto restante según el tiempo de evolución, este cálculo fue realizado en milímetros respecto de la interfase proximal hasta la interfase distal (figura 99). El estudio estadístico de homogeneidad de varianzas resultó no significativo con una p=0,931 (figura 97). Tras esta premisa, el estudio estadístico de comparación de medias se realizó mediante el test de ANOVA para el estudio comparativo, observando con un valor de p=0,002, diferencias significativas entre la longitud del injerto y el tiempo de seguimiento.

Como pruebas post hoc en este caso se utilizó el test de Tukey que mostró diferencias significativas al comparar la longitud del injerto entre el grupo GP 20 y los otros dos subgrupos (GP5 y GP10) respectivamente. En la comparativa entre grupos a corto y medio plazo (GP5 y GP10) no se observaron diferencias en el estudio (figura 98).

| Prueba de homogeneidad de varianzas |     |     |      |
|-------------------------------------|-----|-----|------|
| LONGITUD INJERTO MM (Macro)         |     |     |      |
| Estadístico de Levene               | gl1 | gl2 | Sig. |
| ,072                                | 2   | 16  | ,931 |

Figura 97. Estadístico de Levene sin mostrar significación estadística p=0,931. Homogeneidad de varianzas.

| ANOVA de un factor          |                   |    |                  |       |      |
|-----------------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| LONGITUD INJERTO MM (Macro) |                   |    |                  |       |      |
|                             | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F     | Sig. |
| Inter-grupos                | 2460,451          | 2  | 1230,226         | 9,676 | ,002 |
| Intra-grupos                | 2034,286          | 16 | 127,143          |       |      |
| Total                       | 4494,737          | 18 |                  |       |      |

| Comparaciones múltiples                           |                        |                            |              |      |                               |                 |
|---|------------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: LONGITUD INJERTO MM (Macro) |                        |                            |              |      |                               |                 |
| HSD de Tukey                                      |                        |                            |              |      |                               |                 |
| (I) TIEMPO SEGUIMIENTO                            | (J) TIEMPO SEGUIMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|   |                        |                            |              |      | Límite inferior               | Límite superior |
| 5 SEMANAS   | 10 SEMANAS             | 11,14286                   | 6,60241      | ,240 | -5,8935                       | 28,1793         |
|   | 20 SEMANAS             | 28,28571*                  | 6,60241      | ,002 | 11,2493                       | 45,3221         |
| 10 SEMANAS  | 5 SEMANAS              | -11,14286                  | 6,60241      | ,240 | -28,1793                      | 5,8935          |
|   | 20 SEMANAS             | 17,14286*                  | 6,02715      | ,030 | 1,5908                        | 32,6949         |
| 20 SEMANAS  | 5 SEMANAS              | -28,28571*                 | 6,60241      | ,002 | -45,3221                      | -11,2493        |
|   | 10 SEMANAS             | -17,14286*                 | 6,02715      | ,030 | -32,6949                      | -1,5908         |

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

| LONGITUD INJERTO MM (Macro) |   |                              |         |
|-----------------------------|---|------------------------------|---------|
| HSD de Tukey <sup>a,b</sup> |   |                              |         |
| TIEMPO SEGUIMIENTO          | N | Subconjunto para alfa = 0.05 |         |
|                             |   | 1                            | 2       |
| 20 SEMANAS                  | 7 | 45,7143                      |         |
| 10 SEMANAS                  | 7 |                              | 62,8571 |
| 5 SEMANAS                   | 5 |                              | 74,0000 |
| Sig.                        |   | 1,000                        | ,223    |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,176.  
 b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 98. Test estadísticos de ANOVA con un valor de p significativo (p=0,002) y test post hoc de Tukey mostrando diferencias significativas entre grupos GP20 respecto GP5 y GP10, sin diferencias entre GC5 y GC10 respectivamente.



Figura 99. Marcaje (\*) de la muestra para medición de la longitud macroscópica del injerto mediante regla (o pie de rey)



Por último, como antes se ha visto en el grupo control, en el estudio de las variables macroscópicas del grupo experimental con preservación del injerto perióstico vascularizado, también se valoró la variable categórica de color del injerto, esta variable se ha propuesto para evaluar la evaluar macroscópicamente la viabilidad del hueso alogénico estructural (IMHC) comparado respecto del hueso sano vitalizado circundante del huésped, su estudio se basó en la observación del injerto adjudicando 4 tipos de ítems diferentes según si la coloración era blanca (figura100) orientada como la más similar al tejido sano del hueso huésped, la coloración amarilla (figura 101) y la coloración ocre siguiendo una escala gradual de evolución del hueso (blanco más vital que ocre).

Cabe decir que dentro de este grupo, no se observó ningún caso de coloración ocre del injerto, basándose los resultados en dos coloraciones únicamente (blanca y amarilla) a diferencia del grupo control donde si se ha observado la coloración más oscura. A continuación se muestran dos ejemplos de injertos y su adjudicación a los grupos respectivos en cuanto coloración:



Figura 100. Piezas de resección de conejos pertenecientes al grupo experimental a) Rb12 (GP10) y b) Rb41 (GP5). Se determinó el grado de coloración blanco para estas muestras.

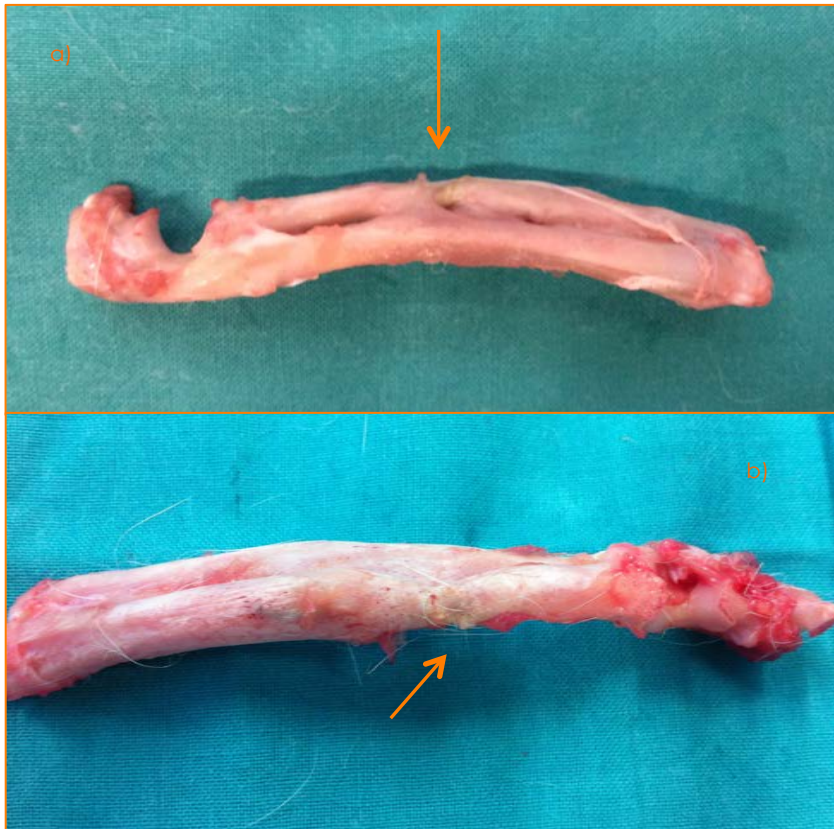


Figura 101. Piezas de resección de conejos pertenecientes al grupo experimental a) Rb35 (GP10) y b) Rb23 (GP20). Se determinó el grado de coloración amarillo para estas muestras.

El test estadístico para evaluar esta variable al igual que ha sucedido con el estudio del grupo control fue el test de chi-cuadrado, que mostró un valor de  $p=0,956$  sin evidencias diferencias significativas en los subgrupos de seguimiento en la muestra de controles del estudio (figura 102).

Pese a no tener significación estadística, se determinó una mayor frecuencia de muestras de coloración blanca en todos los subgrupos de seguimiento observando un porcentaje del 80% en las muestras del grupo GP5, un porcentaje del 85,7% en el grupo de seguimiento a 10 semanas (GP10) e incluso dentro del grupo de 20 semanas (GP20) la frecuencia observada también fue del 85,7% de las muestras cosa que indica que macroscópicamente la vitalidad del injerto se encuentra preservada respecto al hueso del huésped.

| Tabla de contingencia COLOR INJERTO (Macro) * TIEMPO SEGUIMIENTO |          |                                |                    |            |            |        |
|--|----------|--------------------------------|--------------------|------------|------------|--------|
|  |          |                                | TIEMPO SEGUIMIENTO |            |            | Total  |
|  |          |                                | 5 SEMANAS          | 10 SEMANAS | 20 SEMANAS |        |
| COLOR INJERTO (Macro)  | BLANCO   | Recuento                       | 4                  | 6          | 6          | 16     |
|  |          | Frecuencia esperada            | 4,2                | 5,9        | 5,9        | 16,0   |
|  |          | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 80,0%              | 85,7%      | 85,7%      | 84,2%  |
|  | AMARILLO | Recuento                       | 1                  | 1          | 1          | 3      |
|  |          | Frecuencia esperada            | ,8                 | 1,1        | 1,1        | 3,0    |
|  |          | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 20,0%              | 14,3%      | 14,3%      | 15,8%  |
| Total  |          | Recuento                       | 5                  | 7          | 7          | 19     |
|  |          | Frecuencia esperada            | 5,0                | 7,0        | 7,0        | 19,0   |
|  |          | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 100,0%     | 100,0%     | 100,0% |

| Pruebas de chi-cuadrado  |                   |    |                             |
|--|-------------------|----|-----------------------------|
|  | Valor             | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson  | ,090 <sup>a</sup> | 2  | ,956                        |
| Razón de verosimilitudes   | ,087              | 2  | ,957                        |
| Asociación lineal por lineal   | ,060              | 1  | ,806                        |
| N de casos válidos   | 19                |    |                             |
| a. 4 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,79. |                   |    |                             |

Figura 102. Test de chi-cuadrado para el estudio de la variable color del IMHC. Obsérvese un valor de  $p=0,956$ , sin diferencias estadísticas significativas respecto subgrupos de seguimiento.



#### 6.2.2.4 Estudio histoanatomopatológico

Respecto al estudio microscópico de las muestras de los grupos de seguimiento de las muestras pertenecientes al grupo experimental, al igual que sucedió con el grupo control y para su comparativa posteriormente, se evaluaron las variables:

- Callo óseo microscópico
- Longitud del injerto
- Presencia de periostio en la zona media del injerto (variable que se ha utilizado una vez más para valorar la calidad de la cirugía y la consecución del objetivo de ablación del periostio nativo del periostio respecto al grupo experimental)
- Neoformación de hueso y cartilago.
- En el grupo GP5 también se estudió la variable Grosor del periostio margen cortical (no valorable por patólogo en los grupos de seguimiento GP10 y GP20)

Además de las variables analizadas, se realizó un estudio de las muestras junto a un especialista en histología y anatomopatología para estudio descriptivo de las muestras y su impresión en las comparativas de ambos grupos experimentales.

Por último, dentro del estudio histológico y a modo de estudio a nivel celular, se ha realizado el estudio a microscopía electrónica de muestras tanto del grupo control como del grupo con periostio por parte del Profesor Alfonso Blanco, que ha aportado su evaluación e impresiones de las imágenes obtenidas por microscopio electrónico que se detallan más adelante (apartado 6.2.3. Comparativa de grupos de esta tesis).

En las siguientes tablas se detallan los resultados de las variables estudiadas y posteriormente se expondrán los resultados estadísticos obtenidos para cada una de ellas. Finalmente en último apartado se expondrá la impresión descriptiva de las muestras dentro del grupo control y sus subgrupos (tabla 14):

|             | Estudio microscópico |                       |                                  |                      |   |
|-------------|----------------------|-----------------------|----------------------------------|----------------------|---|
| Conejo      | Callo óseo           | Longitud injerto (mm) | Hueso-cartílago neoformado (MM2) | Periostio zona media | Grosor periostio margen cortical (micras) |
| <b>GP5</b>  |                      |                       |                                  |                      |   |
| 37          | SI                   | 82                    | 33,5                             | 139                  | 194,3                                     |
| 38          | SI                   | 100                   | 52,8                             | 51                   | 236                                       |
| 39          | SI                   | 100                   | 33                               | 220                  | 277                                       |
| 40          | SI                   | 87                    | 26                               | 732                  | 444,8                                     |
| 41          | SI                   | 83                    | 29,5                             | 511                  | 467,3                                     |
| <b>GP10</b> |                      |                       |                                  |                      |   |
| 12          | SI                   | 59                    | 11                               | SI                   | NV  |
| 20          | SI                   | 72                    | 31                               | SI                   | NV  |
| 22          | SI                   | 42                    | 8                                | SI                   | NV  |
| 33          | SI                   | 45                    | 16                               | SI                   | NV  |
| 34          | SI                   | 65                    | 39                               | SI                   | NV  |
| 35          | SI                   | 57                    | 20                               | SI                   | NV  |
| 36          | SI                   | 61                    | 12                               | SI                   | NV  |
| <b>GP20</b> |                      |                       |                                  |                      |   |
| 23          | NO                   | 69                    | 4                                | SI                   | NV  |
| 24          | NO                   | 70                    | 3                                | SI                   | NV  |
| 25          | NO                   |                       | 10                               | SI                   | NV  |
| 26          | NO                   | 59                    | NV                               | SI                   | NV  |
| 30          | NO                   |                       | 5                                | SI                   | NV  |
| 31          | NO                   | 56                    | 9                                | SI                   | NV  |
| 32          | NO                   |                       | 3,5                              | SI                   | NV  |

Tabla 14. Resultados de las variables microscópicas en el grupo periostio

La primera variable estudiada fue la evaluación del callo óseo en las muestras microscópicas. El test utilizado fue el test de chi-cuadrado por tratarse de una variable cualitativa obteniéndose un valor de  $p=0,000$  mostrando diferencias estadísticamente significativas entre la presencia/ausencia de callo óseo a nivel macroscópico comparado según el tiempo de seguimiento de los diferentes subgrupos, mostrando un callo óseo microscópico en los subgrupos de seguimiento GP5 y GP10, no así en el subgrupo de más largo seguimiento (GP20) (figura 103).

| Tabla de contingencia CALLO ÓSEO (Micro) * TIEMPO SEGUIMIENTO |    |                                |                    |            |            |        |
|---|----|--------------------------------|--------------------|------------|------------|--------|
|   |    |                                | TIEMPO SEGUIMIENTO |            |            | Total  |
|   |    |                                | 5 SEMANAS          | 10 SEMANAS | 20 SEMANAS |        |
| CALLO ÓSEO (Micro)  | NO | Recuento                       | 0                  | 0          | 7          | 7      |
|   |    | Frecuencia esperada            | 1,8                | 2,6        | 2,6        | 7,0    |
|   |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 0,0%               | 0,0%       | 100,0%     | 36,8%  |
|   | SI | Recuento                       | 5                  | 7          | 0          | 12     |
|   |    | Frecuencia esperada            | 3,2                | 4,4        | 4,4        | 12,0   |
|   |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 100,0%     | 0,0%       | 63,2%  |
| Total   |    | Recuento                       | 5                  | 7          | 7          | 19     |
|   |    | Frecuencia esperada            | 5,0                | 7,0        | 7,0        | 19,0   |
|   |    | % dentro de TIEMPO SEGUIMIENTO | 100,0%             | 100,0%     | 100,0%     | 100,0% |

| Pruebas de chi-cuadrado      |                     |    |                             |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
|                              | Valor               | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
| Chi-cuadrado de Pearson      | 19,000 <sup>a</sup> | 2  | ,000                        |
| Razón de verosimilitudes     | 25,008              | 2  | ,000                        |
| Asociación lineal por lineal | 13,547              | 1  | ,000                        |
| N de casos válidos           | 19                  |    |                             |

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,84.

Figura 103. Tabla de contingencia mostrando los resultados obtenidos en el estudio de la presencia de callo óseo. Se observan diferencias significativas con un valor de  $p=0,000$  en el test chi-cuadrado

Otra de las variables analizadas en este estudio fue la longitud del remanente de aloinjerto presente al punto final en los diferentes subgrupos, medido mediante lupa y regla microscópica, tanto analógica como digital. El resultado obtenido fue expresado en milímetros (figura104).

El primer paso fue analizar mediante el test de Levene la homogeneidad de varianzas, obteniendo un valor de  $p=0,779$  sin significación estadística (homogeneidad de varianzas). Posteriormente se realizó el estudio de la muestra mediante un test de ANOVA que mostró un valor de  $p=0,000$ , mostrando diferencias significativas entre los tres grupos de seguimiento (figura 105).

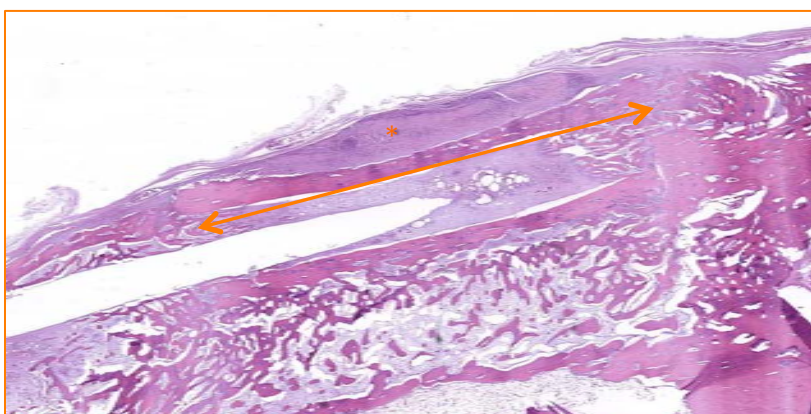


Figura 104. Muestra histológica Rb40 (GP5) donde se observa el injerto intercalar (→) para su medición microscópica. El (\*) muestra la membrana perióstica.

Tras los resultados obtenidos se realizaron pruebas post hoc mediante el test estadístico de Tukey que mostró diferencias significativas entre la longitud del injerto remanente a nivel microscópico y su relación según el tiempo de seguimiento (figura 106):

- Se han observado diferencias entre el grupo GP5 comparado con el grupo GP10 ( $p=0,000$ ) y el grupo GP20 ( $p=0,002$ )
- No se mostraron diferencias entre la comparación de los grupos de seguimiento de 10 y 20 semanas respectivamente ( $p=0,557$ )

| Prueba de homogeneidad de varianzas |     |     |      |
|-------------------------------------|-----|-----|------|
| LONGITUD INJERTO MM (Micro)         |     |     |      |
| Estadístico de Levene               | gl1 | gl2 | Sig. |
| ,255                                | 2   | 13  | ,779 |

| ANOVA de un factor          |                   |    |                  |        |      |
|-----------------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| LONGITUD INJERTO MM (Micro) |                   |    |                  |        |      |
|                             | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F      | Sig. |
| Inter-grupos                | 3370,809          | 2  | 1685,404         | 19,092 | ,000 |
| Intra-grupos                | 1147,629          | 13 | 88,279           |        |      |
| Total                       | 4518,438          | 15 |                  |        |      |

Figura 105. Tablas estadísticas mostrando el test de Levene ( $p=0,779$ ) objetivando una homogeneidad de varianzas. El test de ANOVA muestra una significación estadística mostrando diferencias entre los grupos con un valor de  $p=0,000$ .

| Comparaciones múltiples                           |                        |                            |              |      |                               |                 |
|---|------------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: LONGITUD INJERTO MM (Micro) |                        |                            |              |      |                               |                 |
| HSD de Tukey                                      |                        |                            |              |      |                               |                 |
| (I) TIEMPO SEGUIMIENTO                            | (J) TIEMPO SEGUIMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|   |                        |                            |              |      | Límite inferior               | Límite superior |
| 5 SEMANAS   | 10 SEMANAS             | 33,11429*                  | 5,50156      | ,000 | 18,5878                       | 47,6408         |
|   | 20 SEMANAS             | 26,90000*                  | 6,30283      | ,002 | 10,2578                       | 43,5422         |
| 10 SEMANAS  | 5 SEMANAS              | -33,11429*                 | 5,50156      | ,000 | -47,6408                      | -18,5878        |
|   | 20 SEMANAS             | -6,21429                   | 5,88906      | ,557 | -21,7640                      | 9,3354          |
| 20 SEMANAS  | 5 SEMANAS              | -26,90000*                 | 6,30283      | ,002 | -43,5422                      | -10,2578        |
|   | 10 SEMANAS             | 6,21429                    | 5,88906      | ,557 | -9,3354                       | 21,7640         |

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

| LONGITUD INJERTO MM (Micro) |   |                              |         |
|-----------------------------|---|------------------------------|---------|
| HSD de Tukey <sup>a,b</sup> |   |                              |         |
| TIEMPO SEGUIMIENTO          | N | Subconjunto para alfa = 0.05 |         |
|                             |   | 1                            | 2       |
| 10 SEMANAS                  | 7 | 57,2857                      |         |
| 20 SEMANAS                  | 4 | 63,5000                      |         |
| 5 SEMANAS                   | 5 |                              | 90,4000 |
| Sig.                        |   | ,559                         | 1,000   |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,060.  
 b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 106. Tablas estadísticas de análisis de la variable longitud del injerto óseo, observándose significación estadística entre grupo GP5 y los grupos GP10 ( $p=0,000$ ) y GP20 ( $p=0,002$ )

Al contrario que en los especímenes pertenecientes al grupo control, se analizó la presencia de tejido perióstico circundante alrededor del injerto alogénico (IMHC) en su zona media para valorar y objetivar la preservación de dicho tejido tras la intervención quirúrgica. Esta variable establecida según la presencia o ausencia del tejido se determinó en todas las muestras de los grupos experimentales observando la presencia de periostio a nivel de la zona media del injerto sin excepción, debido a esto se puede afirmar que en todos los casos se realizó la preservación y sutura del tejido de manera correcta. Debido al idéntico resultado positivo en todas las muestras, esta variable se estableció como constante por lo que no se ha realizado ningún estudio estadístico de la misma.

Por último la variable que se determinó para estudiar la evolución de las muestras según el tiempo y su progreso de consolidación y revascularización de los injertos fue la presencia de hueso y cartílago neoformado según el seguimiento en el tiempo. La variable que se obtuvo fue una variable cuantitativa expresada en milímetros cuadrados y fue determinada por un experto en histología de tejido óseo.

El estudio estadístico de los resultados determinó una homogeneidad de varianzas mediante un valor de  $p=0,114$  en el estadístico de Levene. El test de ANOVA de un factor, mostró diferencias significativas en la comparación de todos los grupos, con un valor de  $p=0,000$ . Tras este estudio se realizaron pruebas post hoc (test de Tukey) observando diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de seguimiento (figura 107):

- GP5 con GP10 ( $p=0,030$ )
- GP5 con GP20 ( $p=0,000$ )
- GP10 con GP20 ( $p=0,041$ )

| ANOVA de un factor                    |                   |    |                  |        |      |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| HUESO-CARTÍLAGO NEOFORMADO MM (Micro) |                   |    |                  |        |      |
|                                       | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F      | Sig. |
| Inter-grupos                          | 2328,241          | 2  | 1164,121         | 13,805 | ,000 |
| Intra-grupos                          | 1264,921          | 15 | 84,328           |        |      |
| Total                                 | 3593,163          | 17 |                  |        |      |

| HUESO-CARTÍLAGO NEOFORMADO MM (Micro) |   |                              |         |
|---------------------------------------|---|------------------------------|---------|
| HSD de Tukey <sup>a,b</sup>           |   |                              |         |
| TIEMPO SEGUIMIENTO                    | N | Subconjunto para alfa = 0.05 |         |
|                                       |   | 1                            | 2       |
| 20 SEMANAS                            | 6 | 5,7500                       |         |
| 10 SEMANAS                            | 7 | 19,5714                      |         |
| 5 SEMANAS                             | 5 |                              | 34,9600 |
| Sig.                                  |   | ,051                         | 1,000   |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,888.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 107. Tablas estadísticas de análisis de la variable neoformación de hueso y cartílago, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos

| Comparaciones múltiples                                     |                        |                            |              |      |                               |                 |
|---|------------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: HUESO-CARTÍLAGO NEOFORMADO MM (Micro) |                        |                            |              |      |                               |                 |
| HSD de Tukey  |                        |                            |              |      |                               |                 |
| (I) TIEMPO SEGUIMIENTO                                      | (J) TIEMPO SEGUIMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|   |                        |                            |              |      | Límite inferior               | Límite superior |
| 5 SEMANAS   | 10 SEMANAS             | 15,38857*                  | 5,37703      | ,030 | 1,4219                        | 29,3553         |
|   | 20 SEMANAS             | 29,21000*                  | 5,56060      | ,000 | 14,7665                       | 43,6535         |
| 10 SEMANAS  | 5 SEMANAS              | -15,38857*                 | 5,37703      | ,030 | -29,3553                      | -1,4219         |
|   | 20 SEMANAS             | 13,82143*                  | 5,10897      | ,041 | ,5510                         | 27,0918         |
| 20 SEMANAS  | 5 SEMANAS              | -29,21000*                 | 5,56060      | ,000 | -43,6535                      | -14,7665        |
|   | 10 SEMANAS             | -13,82143*                 | 5,10897      | ,041 | -27,0918                      | -,5510          |

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

### 6.2.2.5 Hallazgos Grupo Periostio

Este apartado del estudio del grupo experimental resumirá el estudio realizado de las variables con los hallazgos más relevantes y realizar una impresión de la evolución del injerto criopreservado (IMHC) con el aporte del periostio vascularizado respecto a su consolidación y a la valoración de la revascularización del mismo. Tal y como se ha comentado en el apartado 6.2.1.5 del grupo control, más adelante se realizará un análisis comparativo entre ambos grupos que se desarrollará en el apartado 6.2.3 de este trabajo.

El grupo experimental se compuso de 12 conejos macho y 7 hembras (el exitus observado del grupo periostio también era un animal hembra), sin mostrar diferencias entre los grupos en cuanto a su formación según el genero. Tampoco el peso fue un factor que mostrara una variación en los resultados, exceptuando la diferencia de pesos significativa estadísticamente entre el grupo GP5 y el resto de los grupos experimentales en el peso previo a la cirugía y también en el análisis a las 2 semanas, no obstante este factor (también observado en el análisis del grupo control) no se ha considerado determinante al ser el primero un valor previo a la intervención del estudio y el segundo consecuencia posiblemente del primero, al partir de un peso más bajo el grupo GP5, postoperatoriamente ha mantenido esa línea. Todos los conejos viables han ido aumentando peso y han presentado una evolución correcta pese a pequeñas complicaciones menores. Dentro de este grupo no se han observado complicaciones infecciosas que hayan supuesto una morbimortalidad añadida.

Dentro del estudio radiológico, entre sus variables cabe destacar varios resultados:

- La diástasis proximal y distal de la interfase entre el injerto y el hueso huésped no mostraron diferencias significativas por lo que consideramos que no ha creado un factor de confusión en la cirugía de cara a impedir la correcta consolidación de la interfase.

- Otro resultado a destacar es la presencia del callo óseo en los diferentes grupos y su evolución, se ha visto radiológicamente la aparición de éste callo óseo en el grupo de más corta evolución (GP5) sin observarlo en los grupos de mas larga evolución, pudiendo concluir que la formación del callo óseo sucede en las primeras semanas de evolución, posteriormente se organiza y se reduce hacia las 10 semanas post-intervención, sin evidencias el callo óseo a las 20 semanas de evolución. Ésta muestra obtiene también una correlación importante entre el callo óseo observado en las diferentes modalidades de estudio, tanto radiológico como macroscópico y microscópico.
- El análisis de la consolidación del injerto en este caso no mostró diferencias estadísticas significativas entre los grupos estudiados con una tasa de consolidación de la interfase IMHC-Hueso huésped a nivel radiológico correcta, únicamente presentando un solo caso de falta de consolidación en el grupo GP5, sin mostrar este problema de pseudoartrosis ni retraso de consolidación en los grupos GP10 y GP20, donde se observó consolidación radiológica en todos los casos.

A nivel macroscópico cabe decir, aparte de la correlación de la presencia de callo óseo radiológico y histológico (tanto macro como microscópico), que los márgenes de interfase no mostraron diferencias entre los grupos, a consonancia del estudio radiológico y que el color del injerto tampoco mostró diferencias entre los grupos, observándose como se ha comentado una proporción predominante de coloración blanca semejante al hueso huésped nativo en estos animales intervenidos de resección masiva e implantación de aloinjerto estructural (IMHC) asociado a periostio vascularizado.

Al igual que se observó en los resultados del grupo control, la longitud del remanente de injerto óseo en los diferentes grupos también mostró diferencias significativas entre los grupos GP20 (más larga evolución) y GP5 y GP10 respectivamente. Esta correlación fue también observada a nivel microscópico entre el grupo GP20 y el grupo GP5, no así en la comparativa de grupos GP10 y GP20 donde no se observaron diferencias significativas. Este dato corrobora la explicación presentada



en el análisis del grupo control que sugiere que en los grupos más evolucionados y con seguimiento mas largo se produce una resorción de este injerto que progresivamente hace que su tamaño se vea reducido con el tiempo pero que este injerto no llega a desaparecer.

A nivel de las variables microscópicas, en primer lugar comentar la presencia de periostio en la zona media del injerto en los diferentes animales intervenidos, cosa que nos muestra un sello de garantía y calidad de la preservación y sutura perióstica realizada en este grupo, evidenciando su presencia en la zona más aislada del IMHC.

El otro punto importante a nivel microscópico en este grupo es la observación de hueso y cartílago neoformado valorado por un patólogo experto que en el análisis estadístico evidenció diferencias comparando todos los grupos entre si con un aumento progresivo de la neoformación en etapas precoces del seguimiento (corto plazo) que con el tiempo de evolución mantiene una disminución progresiva, debido a la estabilización del proceso agudo de curación de la “fractura” inducida.

Al realizar el estudio comparativo entre ambos grupos, se evaluarán la variable microscópica de grosor del periostio en el margen cortical, ya que sólo pudo observarse cuantitativamente en los grupos de menos evolución al seguimiento (tanto del grupo control como del grupo periostio).

En el próximo apartado se evaluarán todos los datos obtenidos conjuntamente y comparando entre ambos grupos experimental y control para inferir si el periostio puede poseer capacidad de revascularizar estos injertos criopreservados.

### 6.2.3 Comparativa de ambos grupos

Anteriormente en diferentes apartados de este trabajo, se han expuesto los resultados obtenidos en las variables estudiadas, tanto en el grupo control como en el grupo experimental. En este nuevo apartado se realizará un estudio comparativo de ambos grupos, valorando el tiempo de evolución de cada uno de los subgrupos de seguimiento a 5, 10 y 20 semanas.

Aunque gran parte de los estudios experimentales utilizan habitualmente machos en los estudios (por la variabilidad hormonal de las hembras), consideramos que el sexo no era un factor de confusión del estudio pues no creemos que el sexo del animal afecte a la consolidación y revascularización de los injertos. Por este motivo se han incluido en el estudio tanto machos como hembras, repartidos al azar entre los grupos y sin mostrar diferencias entre los grupos ( $p > 0,005$ ) por lo que se puede concluir que el sexo no fue una variable de confusión y que la muestra no tenía diferencias en la composición de los diferentes grupos de seguimiento respecto al sexo de los animales.

Como todo estudio experimental en el que se utilizan animales de experimentación, una de las variables frecuentemente utilizadas es el peso del animal, que nos indica una correcta evolución, una buena alimentación y una correcta viabilidad del animal. En este trabajo se ha estudiado la evolución del peso al inicio del estudio, en el momento de la intervención y durante el seguimiento, si bien se ha medido el peso de manera habitual semanalmente, se decidió realizar el estudio del mismo a las 2 semanas postoperatorias y en el punto final el día de la eutanasia. A grandes trazos cabe decir que el peso no ha mostrado diferencias entre los dos grupos, siendo su evolución progresiva y sin mostrar diferencias significativas (en el peso previo a la cirugía se observó diferencias entre el grupo control a 5 semanas y el resto de periodos de seguimiento a 10 y 20 semanas, pero también se observó esta diferencia entre los seguimientos dentro del grupo experimental, cosa que no altera el resultado de la comparativa entre grupos). En resumen el peso del animal no ha influido en diferenciar la muestra, mostrando unos grupos comparables.

El estudio se ha basado en 3 tipos de estudio:

- A. Estudio radiológico donde las diferentes variables se han evaluado para evaluar la correcta evolución del injerto intercalar asociado o no a periostio y el grado de consolidación del mismo. Se ha estudiado los márgenes proximal y distal de la interfase que no han mostrado diferencias en la comparación de ambos grupos ni entre los subgrupos de seguimiento, pudiendo concluir que los márgenes han sido adecuados y no han expresado un factor de distracción o confusión que pueda mostrar un sesgo entre los grupos estudiados.

Otra de las variables estudiadas era el callo óseo radiológico y la consolidación del injerto radiológica, que tras el estudio estadístico de comparación de medias, no ha mostrado diferencias entre los grupos control y periostio así como en la comparación entre subgrupos de seguimiento.

En la última variable de este grupo se evaluó la sinostosis radiocubital distal secundaria, obteniendo significación estadística entre los grupos de seguimiento de 20 semanas, mostrándose en el grupo control una frecuencia mayor de sinostosis radiocubital respecto al grupo experimental (frecuencia GC20 7:7, GP20 2:7).

- B. Estudio macroscópico donde las variables estudiadas pretendían observar el grado de consolidación del injerto mediante la evaluación de los márgenes proximal y distal y la presencia de callo óseo y consolidación del injerto.

Además se han estudiado dos condicionantes que pueden dar indicaciones sobre la vitalidad del injerto como son la longitud remanente del injerto óseo y el color del injerto.

Referente a los márgenes de la interfase proximal y distal del compuesto hueso-huésped - aloinjerto el estudio inferencial dentro de los grupos periostio no se pudieron analizar al ser variables sin varianzas homogéneas y con varianza de 0 en el margen distal. A

nivel intergrupos de estudio, se han observado diferencias significativas en el margen distal en los grupos GC10 y GP10 aunque no consideramos que tenga relevancia clínica y sea secundaria a la medición de una constante en dicho margen.

A nivel de callo óseo en el estudio macroscópico, no se observaron diferencias en los grupos a corto plazo (5 semanas) estando presente este callo en todas las muestras. Tampoco a nivel de las muestras a largo plazo hubo diferencias significativas a nivel macroscópico sin observarse callo en ninguna muestra, ni en el grupo control ni en el grupo experimental. Donde si se encontraron diferencias ( $p=0,015$ ) fue en los grupos de 10 semanas de evolución, observando una frecuencia superior de callo óseo presente en el grupo GP10 (7:7 muestras) mientras que en el grupo control se obtuvo una proporción de 1:3 muestras con callo presente. Estos resultados pueden interpretarse de manera que el callo perióstico es más constante en el tiempo, con una evolución clara hasta las 5 semanas y persistencia en el tiempo con la asociación de periostio respecto al descenso de actividad en los grupos controles, el punto de disminución de la actividad del callo óseo se establecería entre las semanas previas a la 10 semana y se finalizaría antes de las 20 semanas donde ya no se muestra la presencia de este callo a nivel macroscópico.

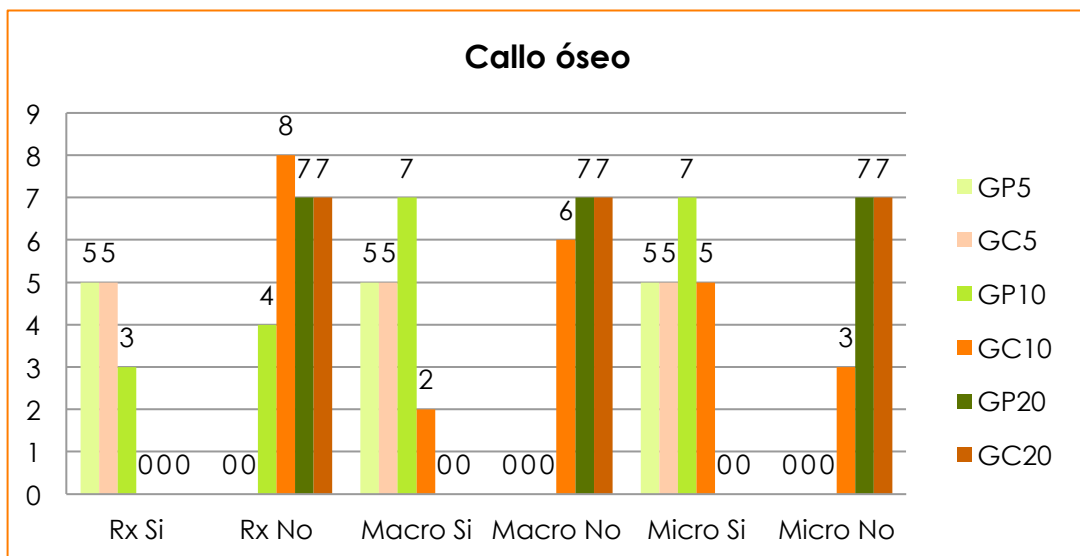
En cuanto a la medición de la longitud del injerto óseo a nivel macroscópico, no se obtuvieron diferencias entre los dos grupos estudiados ( $p>0,05$ ) aunque el valor de  $p$  global fue de 0,067, cosa que puede interpretarse que aumentando el tamaño muestral se podría obtener una  $p$  significativa, no obstante si que se observaron diferencias entre la evolución del injerto, mostrando un menor tamaño del mismo a medida que el tiempo de evolución era más largo.

Por último el estudio del color del injerto a nivel macroscópico en los dos grupos de estudio (control y experimental-periostio) mostró diferencias significativas entre los grupos ( $p=0,005$ ), con un aumento

de la frecuencia de resultados blanco en el grupo periostio respecto el grupo control. La frecuencia total de blanco en el grupo experimental fue de 16:19 (84,2%), mientras que en el grupo control la frecuencia observada fue de 7:20 (35%), siendo la frecuencia amarillo la moda de la muestra con un recuento de 8 (proporción de 2:5 – 40%).

C. Estudio microscópico donde las variables analizadas fueron estipuladas para valorar el grado de consolidación del IMHC, su proceso de resorción-neoformación ósea y su revascularización.

La primera variable estudiada fue el callo óseo que, a semejanza de los resultados obtenidos en el estudio radiológico y macroscópico, no se observaron diferencias estadísticas entre los grupos ( $p > 0,05$ ) siguiendo una distribución similar a los resultados obtenidos en las diferentes mediciones del callo óseo como se ve más abajo (grafico 8).



Gráfica 8. Distribución de los resultados de aparición de callo óseo según los diferentes grupos.

La longitud del injerto a nivel microscópico también fue evaluada, midiendo el remanente de injerto según el grupo y el tiempo de seguimiento, sin observarse diferencias entre el grupo control y el grupo experimental (periostio) con un valor de  $p = 0,810$  en los diferentes grupos de seguimiento, aunque si se vieron diferencias intragrupos entre los subgrupos según el seguimiento.

Como las variables de callo óseo y de longitud del injerto fueron evaluadas tanto microscópica como macroscópicamente, se decidió realizar una correlación entre las variables para evaluar las similitudes entre ellas. Respecto al callo óseo macroscópico y microscópico se obtuvo una asociación estadística con un valor de  $p=0,000$  mostrando un coeficiente de contingencia de 0,651 con una relación moderada-alta entre ambas variables, cosa que objetiva la similitud de medición de la variable en los dos campos. En cuanto a la longitud del injerto micro y macroscópicamente, también se estudió su correlación con un test de Pearson  $p=0,03$  significativo estadísticamente y con una correlación leve entre ambas variables (0,373) que refleja una asociación positiva en las mediciones de ambos campos de trabajo.

Como se ha comentado previamente, se utilizó la presencia microscópica de periostio en la zona media del injerto intercalar para valorar el grado de resección del mismo en el grupo control y su preservación en el grupo experimental. A la vista de los resultados, con una presencia constante de la membrana perióstica en el grupo experimental y su ausencia en los animales incluidos en el grupo control, se puede concluir que la cirugía se realizó correctamente en los conejos intervenidos observando diferencias significativas en los grupos ( $p=0,000$ ).

Anteriormente se comentó que una de las variables analizadas, el grosor de periostio en el margen cortical expresado en micras, únicamente se pudo medir sus resultados en los grupos de menor tiempo de evolución (GC5 y GP5) ya que ésta no era valorable en los grupos de mayor seguimiento por parte del patólogo (grupos de seguimiento a 10 y 20 semanas). Al comparar los dos subgrupos se obtuvieron diferencias significativas con un valor de  $p=0,049$ , suficiente para considerar una diferencia estadística que sería más potente en caso de un tamaño muestral más grande.

Por último, se valoró por parte del patólogo la neoformación ósea y de matriz condral en la interfase del injerto-hueso huésped,

observándose diferencias significativas a corto plazo en los grupos de menor seguimiento (5 semanas) con un aumento de dicha neoformación en los animales pertenecientes al grupo de periostio (GP5) respecto al grupo control (GC5) con un valor de  $p=0,049$ . Al igual que sucedía con la variable grosos del periostio en el margen cortical, este valor sería más significativo con un tamaño muestral más grande). En el resto de subgrupos de seguimiento, al comparar entre ellos según control o experimental, estas diferencias no se observaban (en la comparativa a 10 semanas se obtuvo un valor de  $p=0,844$  y en la comparativa a 20 semanas un valor de  $p=0,111$ ).

D. Para completar el estudio y valorar la revascularización del injerto estructural criopreservado, se realizó un estudio mediante microscopia electrónica para identificar la presencia de osteocitos-osteoblastos a nivel de las osteonas del injerto, la presencia de neovasos o vasos sanguíneos ocupados del injerto y valorar la interfase corticoperióstica. Estos ítems fueron valorados por el Profesor Alfonso Blanco que evaluó 1 muestra de cada uno de los grupos del experimento (control-periostio) y de cada uno de los tiempos de seguimiento (5, 10 y 20 semanas) al microscopio electrónico. Se instauró el protocolo de observación de la zona de interfase injerto-hueso huésped a 1mm de la unión para valorar la zona más activa de osteoformación y por otro lado la zona central del injerto, alrededor de 5 mm de la zona de interfase hueso huésped-injerto de las muestras y allí contabilizar tanto los osteocitos viables como los vasos presentes en el injerto. Se han comparado los resultados entre ambos grupos observando diferencias entre los grupos control y experimental (periostio) a nivel de la viabilidad celular de las muestras, como se mostrará en el apartado siguiente de este trabajo (6.2.3.1 Revascularización del injerto criopreservado)

E. A modo de resumen de las variables analizadas se ha observado a nivel clínico como estadístico las siguientes afirmaciones:

- El callo óseo tanto radiológico como macro y microscópico presenta una evolución desde el momento de la intervención quirúrgica, estando presente a las 5 semanas en ambos grupos, manteniéndose en el tiempo y empezando a revertir hacia las 10 semanas, no apreciándose a las 20 semanas. El periostio juega un papel de mayor durabilidad de la formación del callo óseo en la muestra observada.
- A nivel macroscópico, el grupo periostio ha mostrado una coloración del aloinjerto criopreservado (IMHC) más semejante al hueso huésped nativo (blanco) de manera significativa respecto del injerto óseo sin aporte de periostio vascularizado.
- Tanto en el estudio macro como microscópico, se ha observado injerto óseo remanente en todos los subgrupos de tiempo de evolución, si bien este injerto ha ido disminuyendo de tamaño de manera progresiva en ambos grupos (experimental y control), no se han observado diferencias significativas estadísticas en su estudio comparativo. Concluimos que el injerto óseo presenta un proceso de resorción por parte del huésped que se prolonga en el tiempo.
- Tanto la neoformación ósea y de tejido condral como el grosor perióstico en el margen cortical en los grupos de corto seguimiento han mostrado diferencias significativas (aunque con  $p=0,049$ ) en la comparativa de los subgrupos de seguimiento a 5 semanas (GC5 y GP5), observando una mayor producción de tejido nuevo y un mayor grosor perióstico en el grupo experimental respecto al grupo control, concluyendo que el periostio favorece y exagera los mecanismos de resorción, remodelación y consolidación de la interfase hueso huésped – aloinjerto.



### 6.2.3.1 Revascularización del injerto criopreservado

El patólogo encargado de la revisión de las muestras en microscopía óptica junto al doctorando ha dictaminado los resultados objetivos que ha visualizado en las muestras según las diferentes variables observadas, aunque el proceso de revascularización es un proceso poco estudiado, complicado de resolver mediante el análisis histológico y poco caracterizable de manera objetiva evaluando vasos sanguíneos y vitalidad del tejido, no obstante, se ha intentado realizar una extrapolación a partir de los resultados obtenidos en el estudio de las muestras de este trabajo mediante la agrupación de variables.

Además, se ha realizado una impresión de las muestras observadas por parte del experto en las muestras según su tiempo de evolución (subgrupos) y el grupo al que pertenecen (control versus experimental):

Los casos experimentales y controles a las 5 semanas (figura 108) muestran diferencias histológicas relativas en cuanto a la producción y cantidad de callo de fractura. En los casos de aloinjerto sin periostio (grupo control) se observa un callo de fractura que ocupa mayor superficie, con más producción de trabéculas de hueso inmaduro y de tejido cartilaginoso pero más desordenada. También puede identificarse sin problemas los límites del aloinjerto desvitalizado y como un tejido mesenquimal e inflamatorio reparador se integra con los bordes del mismo.

Las muestras del grupo experimental (periostio), por el contrario, presentan callos de fractura con menor superficie pero con un grado de evolución más avanzada que los casos sin periostio. Tienen menor cantidad de tejido cartilaginoso y las trabéculas de hueso inmaduro se empiezan a integrar con el aloinjerto, aunque no parece que lo sustituya nunca. En ambas situaciones, las osteonas del aloinjerto se han observado mayoritariamente desvitalizadas y no se observa regeneración de osteocitos a dicho nivel en microscopía óptica de bajos aumentos.

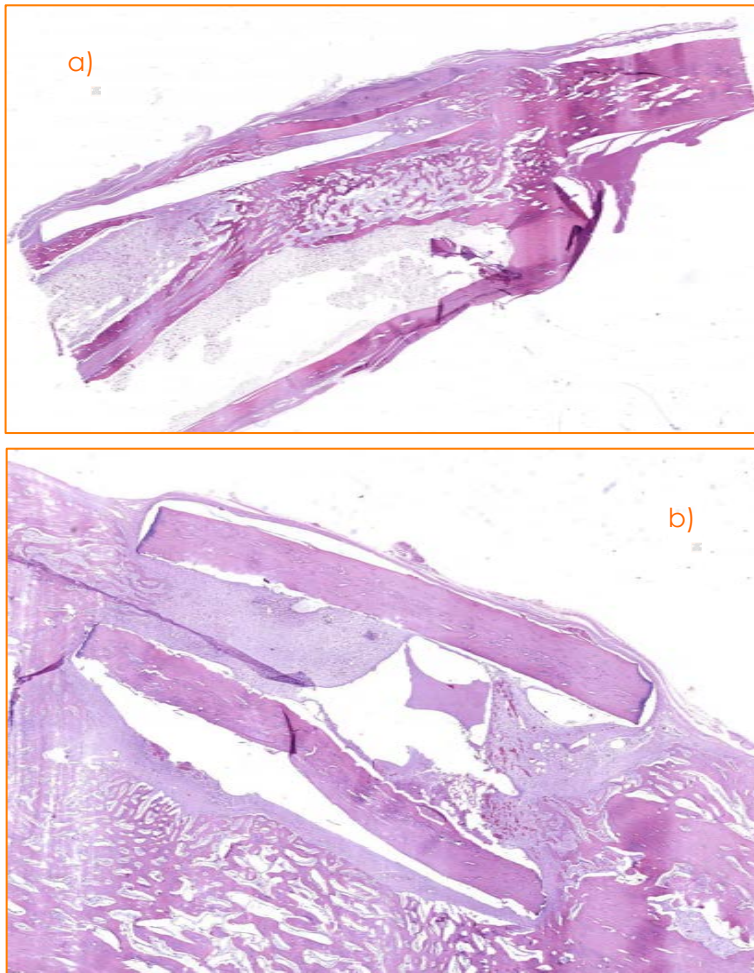


Figura 108. Muestras histológicas a las 5 semanas evolución:  
a) Rb 40 (GP5)  
b) Rb46 (GC5)  
mostrando los márgenes del aloinjerto, tejido perióstico circundante y márgenes de interfase con callo óseo

A las 10 semanas de evolución, los casos experimentales y controles presentan imágenes histológicas similares (figura 109) con diferencias muy sutiles o imperceptibles. Tanto los casos como los controles presentan callos de fractura muy inferiores a los observados a las 5 semanas y prácticamente no se ve tejido cartilaginoso.

En los casos sin periostio puede observarse algunas muestras con tejido cartilaginoso residual. En todas las muestras, desataca la formación nueva matriz ósea con presencia de osteocitos y osteoblastos que tratan de integrarse con el aloinjerto sin llegar a sustituirlo. El aloinjerto sirve como una estructura de andamiaje para el crecimiento del nuevo tejido óseo.

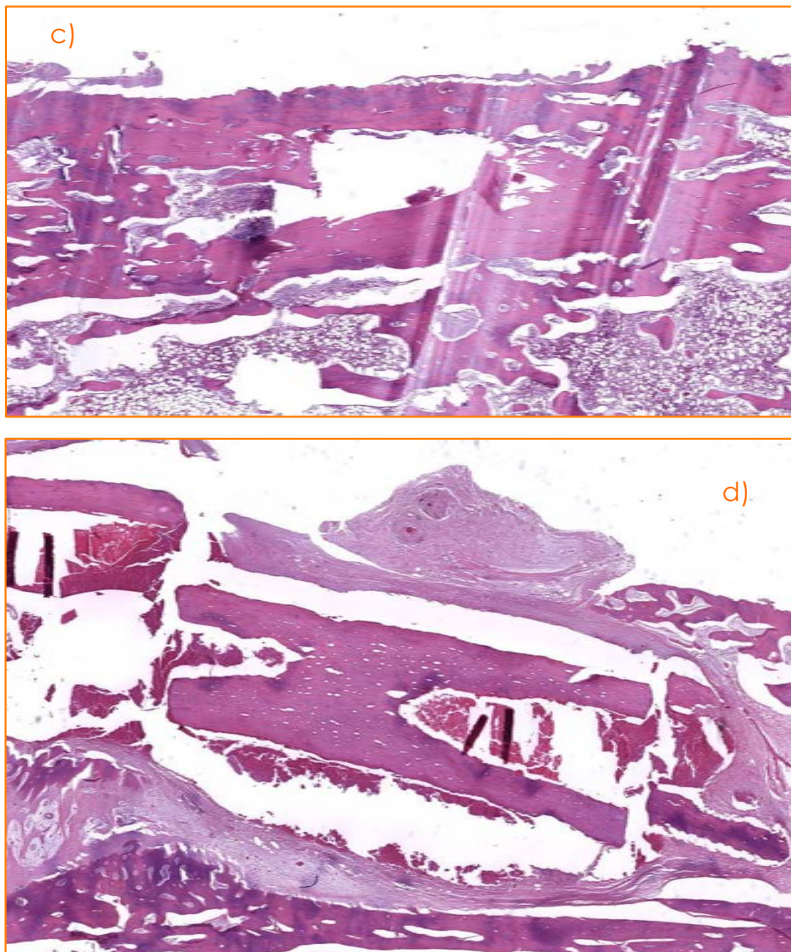


Figura 109. Ejemplo de muestras histológicas a las 10 semanas de evolución:

c) Rb35 (GP10)

d) Rb11 (GC10)

mostrando los márgenes del aloinjerto, con menor componente de callo óseo y tejido condral y nueva matriz ósea con trabéculas vacías

En las muestras a mayor seguimiento, en los animales estudiados durante 20 semanas de evolución, no se han observado diferencias histológicas (figura 110)

Microscópicamente no se identifica callo de fractura en ninguna de las dos situaciones (aloinjerto con y sin periostio) y el nuevo tejido óseo está consolidado e integrado con el aloinjerto. Sin embargo, aun se puede distinguir parte del segmento del aloinjerto con presencia de osteonas desvitalizadas.

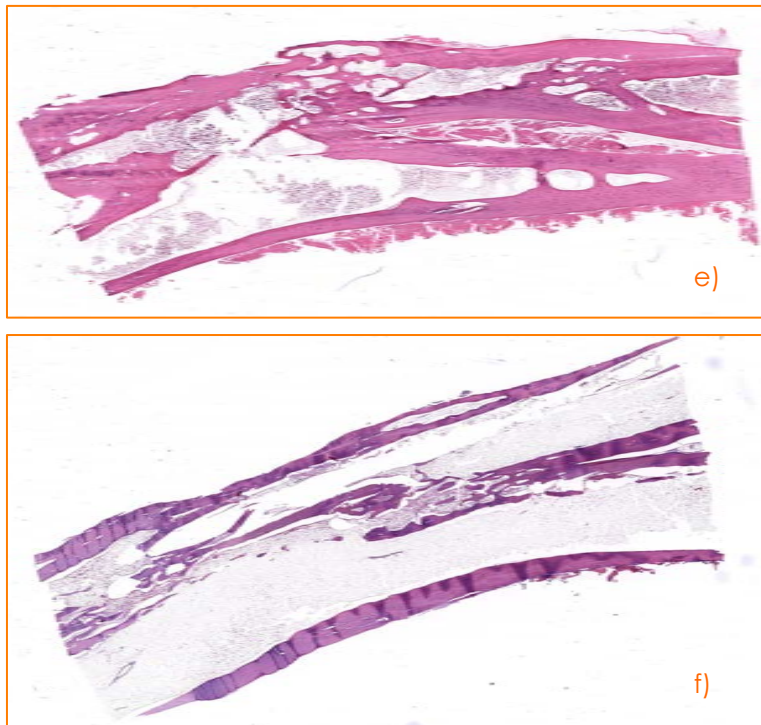


Figura 110. Ejemplo de muestras histológicas a las 20 semanas de evolución:  
 e) Rb31 (GP20)  
 f) Rb17 (GC20)  
 Sin mostrar grandes diferencias entre ambos, con

Respecto al estudio en microscopia electrónica se compararon las muestras de los grupos control y periostio en el evolutivo de los subgrupos de evolución de 5, 10 y 20 semanas. Los resultados obtenidos en cuanto a la celularidad mostrada en los diferentes grupos reflejan una aparición de osteoblastos en la zona de interfase (figura 111) en ambos grupos de manera cualitativa con una ultraestructura reproducible. Para valorar el grado de revitalización-revascularización se estudió el porcentaje de osteocitos viables que se ha mostrado superior en los grupos experimentales (gráficos 9 y 10) respecto al grupo control (gráficos 11 y 12), con un mayor predominio en los subgrupos de seguimiento de 5 y 10 semanas (GP5 42%, GP10 38% respecto GC5 34% y GC10 37%), también se ha observado la tasa de osteocitos apoptóticos (figura 112) que en cambio, es superior en el grupo control (GP5 19%, GP10 20% respecto GC5 31% y GC 34%). Así mismo, en las muestras obtenidas en el aloinjerto estructural se observa un porcentaje considerable (alrededor de un 35% de las células contabilizadas en grupo experimental respecto de un 32% en grupo control) de osteocitos que estando en fase apoptótica, han reiniciado un proceso de endocitosis y revitalización, mostrando vacuolas a nivel de los bordes de la osteona en contacto con los calcóforos (prolongaciones citoplasmáticas) de comunicación con osteocitos viables (figura 113). Estas células están en proceso de revitalización por un



mecanismo de reprogramación celular. Este fenómeno se ha observado en los dos grupos de estudio aunque en un porcentaje mayor en el grupo perióstico.

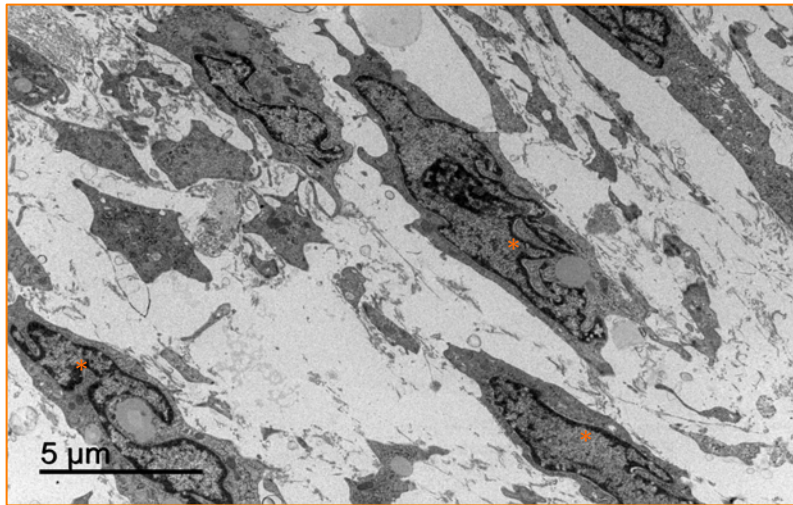
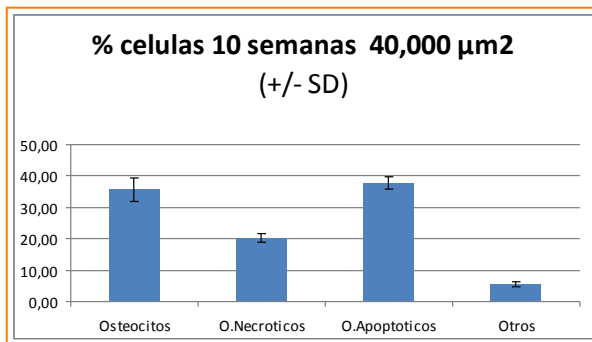
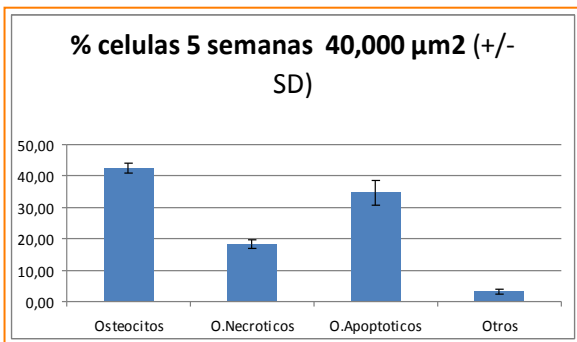
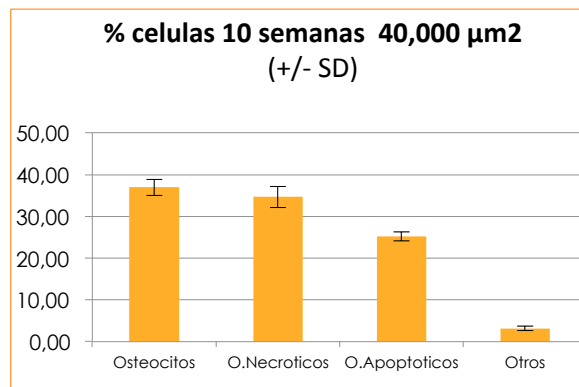
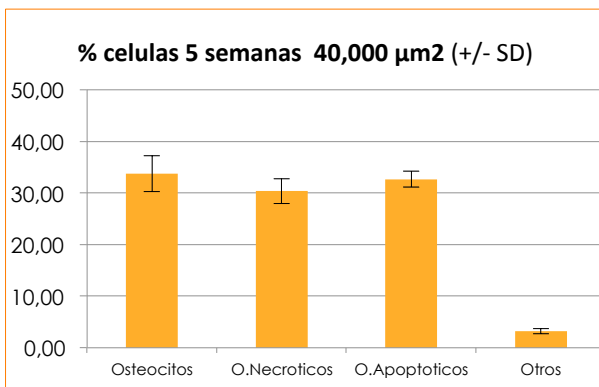


Figura 111. Muestra de osteoblastos (\*) presentes en región próxima a interfase a nivel de injerto óseo estructural en grupo experimental (5 semanas)



Gráficos 9 y 10. Se muestran los porcentajes de aparición de osteocitos viables, necróticos y apoptóticos (en proceso de revitalización) en la muestra de los grupos experimentales (GP5 y GP10)



Gráficos 11 y 12. Se muestran los porcentajes de aparición de osteocitos viables, necróticos y apoptóticos (en proceso de revitalización) en la muestra de los grupos control (GC5 y GC10)

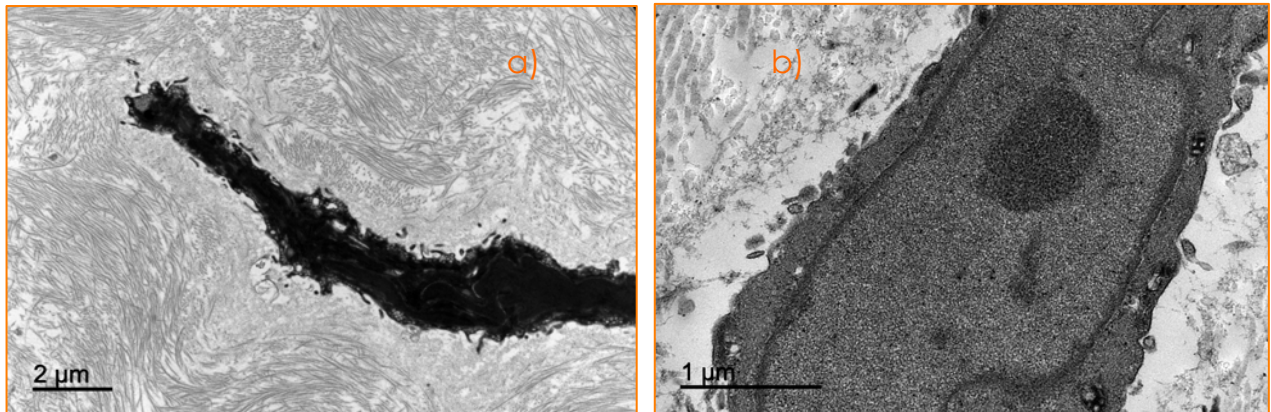


Figura 112. Osteocito necrótico (a) y osteocito vivo viable (b) vistos a microscopia electrónica. En la zona de interfase injerto alogénico. Cortesía del Prof. Blanco.

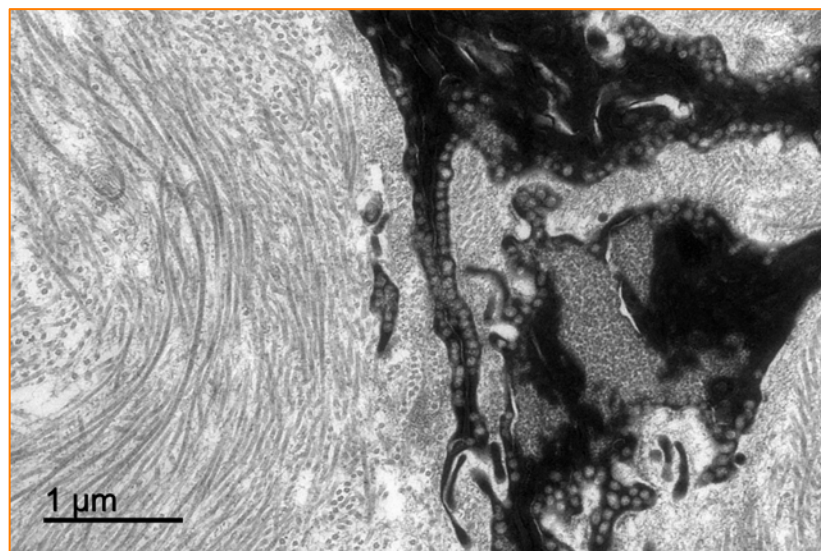


Figura 113. Detalle del calcíforo con vacuolas de endocitosis recubriendo la membrana citoplasmática de un osteocito en proceso de revitalización.

En cuanto a la presencia de neovascularización, a nivel cualitativo se han observado la presencia de vasos neoformados en la zona del injerto estudiada en zona de interfase con el hueso huésped en los grupos de seguimiento a 5 semanas, prolongándose en el tiempo más maduros a las 10 y 20 semanas, cosa que refleja un proceso de revascularización o neoformación de vasos a nivel de la zona en contacto con el injerto huésped que se encuentra más avanzado en la muestra de grupo experimental respecto a el grupo control (figura 114).

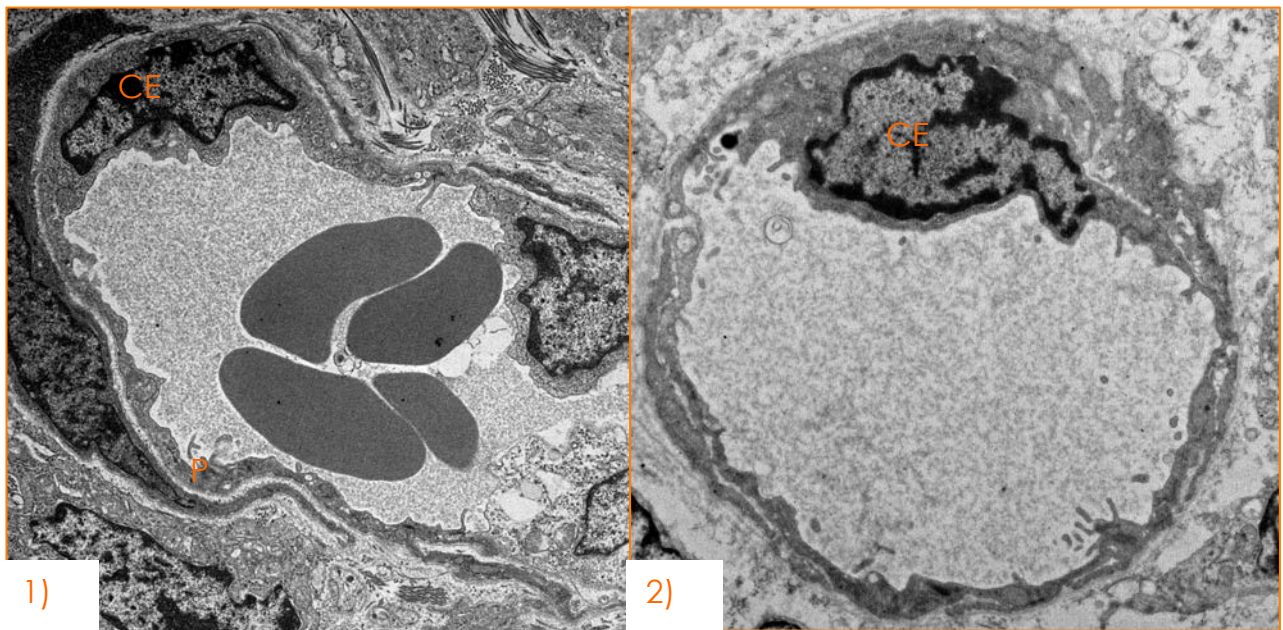


Figura 114. Muestra de capilares en zona interfase. 1) Capilar organizado con pericito (P) y Cel. Endotelial (CE) en grupo experimental 5 semanas evolución respecto 2) Capilar en proceso de estructuración con cel. endotelial presente (CE)

No obstante se han obtenido estos resultados en la zona de interfase, cabe decir que, al igual que sucedía en la microscopía óptica, a nivel central en la zona del aloinjerto, no se han observado osteocitos viables ni neoformación de vasos estructurados en la zona central del aloinjerto. Estos hallazgos han sido descritos y valorados por un patólogo especialista en microscopía electrónica y se concluye que el hueso del injerto sufre a nivel de la zona más activa biológicamente un proceso de revitalización y revascularización, traducido por el mecanismo de endocitosis inducida de osteocitos en fase de apoptosis revertida y por los osteocitos viables encontrados en porcentaje significativo, además la formación y estructuración de vasos sanguíneos también apoya este proceso de regeneración – remodelación, siendo este proceso más avanzado y potenciado por la adición del periostio vascularizado. Se infiere también que este proceso es un proceso a muy largo plazo al mantener remanentes de aloinjerto observables en las muestras estudiadas a largo plazo (20 semanas).

Tras la valoración clínica y analítica de los resultados obtenidos, podemos comentar que se puede concluir con los indicios mostrados en este trabajo, que el injerto óseo criopreservado (IMHC) asociado a periostio vascularizado sufre un proceso de revascularización y revitalización por los al

considerar que el periostio proporciona materia biológica y establece un mejor ambiente para acelerar la consolidación y remodelación de la interfase entre el hueso huésped y el aloinjerto, ocasionando un aumento de tejido óseo neoformado, con una mejor organización del callo óseo, un mayor tiempo de mantenimiento del callo óseo activo (alrededor de las 10 semanas) y un aspecto más vital ( en cuanto a coloración y celularidad osteocítica) de los injertos.

Por el contrario, en el tiempo de evolución observado, se ha objetivado una persistencia de parte de remanente de injerto, que si bien ha sufrido un proceso de resorción progresiva y sustitución por hueso neoformado, no se puede asegurar que con una evolución más larga pueda ser reabsorbido del parcialmente o mantener el proceso de revascularización por un largo periodo de tiempo hasta consumir el proceso de regeneración tisular del injerto óseo.





## 7.- Discusión

## 7.- DISCUSIÓN

### 7.1. MODELO EXPERIMENTAL DE RECONSTRUCCIÓN DE GRANDES DEFECTOS ÓSEOS Y RECONSTRUCCIÓN CON ALOINJERTOS Y PERIOSTIO VASCULARIZADO

La cirugía oncológica en las últimas décadas ha experimentado una gran evolución, con una mejora de los tratamientos tanto quirúrgicos como adyuvantes de quimioterapia y radioterapia. Uno de los avances más importantes en el campo de la cirugía oncológica ha sido el aumento de las posibilidades de preservación de la extremidad como primera opción en el tratamiento de los sarcomas óseos debido a la mejora de las técnicas de reconstrucción compleja de los defectos segmentarios que siguen a las resecciones masivas imprescindibles para obtener unos márgenes libres de seguridad con actitud terapéutica curativa<sup>42,46</sup>.

Globalmente los avances en el tratamiento de los sarcomas óseos en su aspecto quirúrgico y de tratamiento médico (quimioterapia y radioterapia) han experimentado en las últimas décadas una mejora de la supervivencia global y del tiempo de seguimiento de los pacientes causando al mismo tiempo un aumento de la actividad habitual en la vida diaria que obliga a una mejora de la resistencia de las técnicas de reconstrucción quirúrgica tanto en implantes ortoprotéticos como reconstrucciones biológicas.

Epidemiológicamente nos encontramos con una prevalencia de la enfermedad oncológica en gran porcentaje en niños y adolescentes, los cuales poseen ciertas características distintivas de los adultos en cuanto a su mayor capacidad de regeneración ósea, de resistencia biológica a los tratamientos adyuvantes y unas características morfológicas propias del hueso del niño respecto del adulto que son claves en el estudio que propugnamos, la presencia de las fisis de crecimiento y la presencia de un periostio más grueso que en el adulto y secundariamente con un mayor componente osteoformador y osteoinductor.

El apoyo del periostio vascularizado a las reconstrucciones biológicas con injertos criopreservados (IMHC) puede ser un paso importante en la consecución de un aloinjerto con propiedades muy similares en cuanto a biomecánica y metabolismo al hueso huésped y que con la combinación de dicho constructo periostio-aloinjerto se consiga una adaptación del IMHC a la exigencia de las actividades diarias que tenga el paciente intervenido en sus años libres de enfermedad o remanentes de vida<sup>73,114,121,122</sup>.

La microcirugía es una subespecialidad muy exigente técnicamente y con un aprendizaje meticuloso dentro del campo de la cirugía ortopédica que debe ser realizada por profesionales acreditados que actúen conjuntamente con los cirujanos ortopédicos tumorales para la perfecta sincronía entre resección tumoral y reconstrucción en un mismo acto. No se debe obviar que además de los responsables de la cirugía tumoral, deben estar supeditados al necesario enfoque multidisciplinar que deber conllevar el tratamiento de la enfermedad del paciente.

La capacidad osteogénica del periostio ha sido demostrada en varios estudios experimentales<sup>120,123-127</sup>, demostrando que la capa interna basal (*cambium layer*) es la responsable de la neoformación ósea. La viabilidad de los injertos corticoperiósticos y periósticos están influenciados por su vascularización, el contacto con el hueso vivo, la zona receptora y el método de obtención del injerto. Camilli et al en 1994<sup>128</sup> realizó un estudio en ratas comprobando esta capacidad osteogénica del periostio y los injertos corticoperiósticos con un aumento del grosor de la capa interna en las primeras 4 semanas, regresando posteriormente con el paso del tiempo dejando paso a un hueso neoformado inmaduro que coinciden deriva de la transformación de las células mesenquimales en osteocitos. Concluyen al igual que otros autores que la disección de los injertos periósticos deben ser exhaustivos en la preservación de la capa basal del periostio para conservar su potencial osteogénico.

La asociación de hueso cortical o esponjoso al injerto perióstico favorece la neoformación ósea y reduce la lesión de la capa basal, cosa que ha provocado el uso y descripción de diversos colgajos corticoperiósticos como el

colgajo de Sakai <sup>110</sup>, para el tratamiento de defectos óseos, pseudoartrosis y defectos estructurales pequeños, no obstante este aporte estructural queda limitado en este tipo de injertos si exceptuamos el injerto de peroné vascularizado que si aporta un injerto óseo vascularizado estructural para la reparación de grandes defectos. Cabe añadir también que estos injertos corticoperiosticos esta mayormente descritos para población adulta.

El injerto de peroné vascularizado se ha utilizado de manera habitual por parte de microcirujanos ortopédicos para tratar defectos óseos secundarios a pérdidas de sustancia importantes secundarias a fracturas e infecciones, resecciones tumorales, no uniones e incluso pseudoartrosis congénitas de tibia con buenos resultados de neoformación ósea, consolidación más temprana y hueso viable<sup>103,116,129,130</sup>.

No obstante, se han observado aumentos de volumen y modificación del injerto de peroné vascularizado en su uso como injerto estructural para defectos tibiales, éste tiene sus limitaciones en cuanto al volumen y grosor del injerto y el defecto óseo de la zona dadora. Además se debe tener en cuenta sus potenciales complicaciones a nivel de la zona dadora del injerto de peroné, resulta de complicaciones postquirúrgicas y a largo plazo con deformidades de la tibia distal o disfunciones de la articulación tibioperonea e incluso sobrecompensaciones del tobillo en valgo<sup>131,132</sup>, que aunque se estiman de un porcentaje bajo, pueden ser limitantes en cuanto a funcionalidad de la extremidad dadora.

Por otra parte, aunque como se ha comentado, el uso de implantes protésicos para grandes resecciones tumorales o reconstrucciones de defectos óseos esta en auge en las últimas décadas, la sustitución del defecto óseo con injertos masivos de hueso criopreservado (IMHC) es la opción de tratamiento habitual en defectos de huesos largos de las extremidades inferiores tras la resección tumoral en aquellos tumores que no afecten a nivel intrarticular (resecciones intercalares).

El IMHC es una estructura acelular formada por el componente mineral y extracelular del hueso previamente tratado para evitar problemas de rechazo

por histocompatibilidad entre huésped y donante que aporta un soporte mecánico y un aporte biológico de cara a integrarse con el hueso huésped.

Sin embargo, diferentes estudios y controles a largo plazo han demostrado que estos injertos intercalares no poseen una buena integración con el hueso huésped sin adquirir la resistencia fisiológica del hueso sano, presentando, debido a su condición de estructura avascular, un alto porcentaje de complicaciones potencialmente graves y relativamente frecuentes como la no unión en la interfase injerto-huésped (15 -34%), la fractura del injerto óseo (27-54%) y la infección (12 al 16%). Ésta última complicación es especialmente grave en el contexto de un paciente con un sarcoma óseo al cual se pretende en primera instancia preservar la extremidad afecta (*limb savage*) ya que debido a su acelularidad, el injerto actúa como un secuestro óseo con tasas de alrededor del 50% de los injertos masivos infectados que finalizan en una amputación de la extremidad.

Para mejora la biología de los injertos estructurales criopreservados, se ha planteado la asociación de un injerto de peroné vascularizado (IPV) al IMHC tal como lo describió Capanna et al<sup>8</sup>, estos constructos ofrecen un soporte mecánico por el injerto intercalar estructural y un componente de neoformación ósea y potencial osteogénico como es el injerto de peroné vascularizado. En la utilización de este constructo para la reconstrucción de grandes defectos óseos se ha observado una disminución de la tasa de complicaciones en la zona receptora con un descenso sustancial de la tasa de no unión del injerto estructural en resecciones tumorales (34% al 8,8% de no uniones). Se ha estimado que en la población pediátrica, el peroné vascularizado consolida en un tiempo medio de 5.4 meses y favorece la integración del aloinjerto hacia los 19.1 meses de evolución.

Aunque ante estos datos y la reproducibilidad de obtener un injerto de peroné vascularizado (IPV) de la zona dadora con una longitud de aproximadamente 15-18 cm que aporta tanto soporte estructural como biológico con potencial de osteogénesis y que se puede combinar de manera efectiva con un aloinjerto estructural para mejorar el soporte estructural, la morbilidad asociada a este tipo de injertos vascularizados en la zona dadora ha dado lugar a alternativas que mantengan el potencial osteogénico y

osteoformador sin la necesidad de la resección ósea en la región sural dadora del peroné.

La posibilidad de extracción del periostio vascularizado a nivel de la fíbula (peroné) en pacientes de edad pediátrica, donde como hemos comentado, este periostio es mucho mas grueso y disecable que el periostio en la población adulta, ha sido documentado y descrito en la literatura por el Dr. Soldado <sup>14</sup> tras el estudio anatómico complejo de la zona dadora sural y el posterior refinamiento de las técnica de extracción del injerto libre de peroné vascularizado obteniendo un tejido perióstico vascularizado viable de unos 20cm para coberturas de defectos óseos o injertos y viable con una anastomosis microquirúrgica que ofrece un gran potencial osteogénico<sup>127</sup>.

Cabe decir que esta técnica ha sido utilizada en diversos casos complejos para la restauración de grandes defectos óseos por el mismo grupo en humanos y presentados como series de casos en la literatura, con muy buenos resultados clínico-radiológicos tanto en integración ósea (con tasas de consolidación de 7,1 meses respecto a la no consolidación en IMHC aislados de un 15-34% según las series en hueso diafisario) como en desarrollo evolutivo posterior, acelerando la neoformación y consolidación ósea.

Motivados por la aplicabilidad y reproducibilidad de la técnica en pacientes pediátricos y por los resultados clínicos observados en los casos intervenidos, nos apremió a realizar este estudio experimental preclínico para evaluar el proceso de consolidación a nivel histológico de la interfase IMHC-hueso huésped en un modelo experimental y comprobar si la mejora observada de la integración de los injertos óseos masivos criopreservados (IMHC) se debe a un proceso de revascularización del injerto y así postulamos la hipótesis en que se basa este trabajo y que nos ha llevado a la realización de este estudio experimental en un modelo animal de conejo gazapo con fisis abierta (simulando la edad pediátrica).

### 7.1.1 Elección del animal a estudio

Se decidió realizar el estudio con el modelo animal de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza New Zealand White puesto que era el animal de estirpe filogenéticamente más temprana del cual se podía realizar una disección del periostio de manera libre más cuidadosa para no afectar la capa interna basal (con mayor poder osteogénico) y que poseía características fisarias observables radiológicamente similares al humano.

Se han descrito modelos animales, tanto filogenéticamente inferiores como rata y superiores como oveja con aplicaciones de injertos vascularizados de periostio asociando cortical ósea y libres. A nuestro parecer, el conejo ofrece el tamaño ideal, docilidad y manejo sencillo tanto en la cirugía como en el postoperatorio. Para realizar nuestro estudio nos basamos en el modelo descrito por Zhao et al y Kaya et al <sup>118,120</sup> para la reconstrucción de grandes defectos de radio con asociación de colgajos libres. En nuestro caso refinamos varias partes del modelo descrito como el manejo preoperatorio anestésico, la resección ósea y evidentemente el aporte del periostio vascularizado.

Se tuvo en cuenta también que esta raza de conejo albino es ampliamente utilizada en los estudios de investigación por su carácter resistente y por sus reacciones similares a humanos en cuanto a procesos patológicos, medicaciones y cirugías, siendo el tercer animal tras ratas y ratones en estudios de experimentación animal, al mismo nivel que las ovejas. No obstante el uso de roedores presenta una mejor maniobrabilidad de los animales en estabulación y permite realizar colgajos pediculados corticoperiosticos, el aporte del periostio libre sin cortical al constructo quirúrgico era más reproducible en el modelo de conejo.

Otro de los motivos de elección del animal en cuestión es su anatomía del antebrazo, que permitía la realización de una resección masiva a nivel de las patas delanteras con un mínimo deterioro funcional de los mismos al hallarse fusionado el componente distal de ambos huesos del antebrazo (radio y cúbito) y pudiéndose permitir la carga sin miedo a fracasos por carga completa y ayudando a la biomecánica de los injertos óseos masivos (IMHC) de



restaurar la función disminuyendo las complicaciones debido a fracturas de los mismos. Creemos que esta razón es vital ya que en caso de dolor o necesidad de descarga, los animales no realizan una correcta alimentación, cosa que haría inviable el estudio.

Por último, se optó por realizar el estudio en gazapos con fisis abiertas (8-11 semanas edad) para intentar asemejar en la medida de lo posible la edad pediátrica del humano y evaluar la técnica y la evolución del estudio emulando la población diana en la cual el injerto de periostio vascularizado es más reproducible y asequible.

### 7.1.2 Evaluación del protocolo de obtención y análisis de muestras

El estudio piloto previo que se ha realizado previo al estudio preclínico experimental nos ha permitido obtener una reproducibilidad de la técnica quirúrgica y establecer los protocolos de tratamiento pre y postoperatorio así como la evolución clínica de los animales.

Los conejos New Zealand White destinados a los estudios experimentales suelen vivir alrededor de unos 3-5 años, siendo gazapos desde el nacimiento hasta aproximadamente los 6 meses de edad (23 - 25 semanas). De cara a los estudios experimentales y en nuestro caso en concreto, se optó por incluir en el estudio conejos con una edad comprendida entre las 8 y 11 semanas que muestran mejor adaptación y no son tan frágiles como en edades más tempranas.

Basándonos en estudios previos<sup>133,134</sup> y en los tiempos de consolidación de las fracturas tanto en humanos como en estudios veterinarios en conejos, se consideró realizar 3 tiempos de seguimiento orientados a corto plazo (5 semanas de evolución postquirúrgica, representando 13-14 semanas de vida), a medio plazo (10 semanas de evolución – 18-20 semanas, acercándonos al final de la vida pediátrica) y a largo plazo con un seguimiento de 20 semanas

considerando este seguimiento la observación al final de la edad pediátrica-inicio de edad adulta plena del animal.

Ante las posibilidades que ofrecía este estudio y las limitaciones a nivel organizativo, económico y de personal que se han sufrido, se decidió realizar un estudio básico con radiología convencional, estudio macroscópico y microscópico (óptico y electrónico) . Se contempló la posibilidad de realizar estudio biomecánico de las muestras, estudio inmunohistoquímico, molecular, con marcaje fluoroscópico y con radiología avanzada (microCT y RM) pero debido al gran coste que suponía se practicaba irrealizable. No obstante, consideramos que las muestras obtenidas nos ofrecen medios para evaluar el proceso que sufre el aloinjerto asociando el periostio vascularizado y su interacción.

El protocolo de exéresis, obtención, manipulación y procesado de los injertos óseos ha seguido el mismo curso en todos los caso. Se ha seguido una retroalimentación positiva con los injertos, siendo los propios conejos los donantes sanos del injerto para los siguientes. Se ha realizado una disección exhaustiva del tejido pericortical como intramedular y posteriormente el procesamiento se ha realizado basándose en el tratamiento que se realiza habitualmente por parte del Banco de Sangre y Tejidos (BST) para la decelularización y preservación de tejidos humanos (exceptuando medidas físicas y estudios serológicos). Se mantenía en congelación seca a  $-70^{\circ}$  durante al menos 1 semana. Se retiraban del congelador en el momento de la cirugía y se procedía a su implantación según la técnica descrita manteniendo el campo estéril en todo momento.

La eutanasia programada se realizó por parte de personal cualificado en todo momento, con un mismo protocolo de sedación. Tras la muerte programada del animal se procedió a la extracción de las muestras en condiciones estériles mediante disección anatómica preservando la zona a estudio con parte de musculo circundante y sin exéresis exhaustiva del tejido periférico a la intervención, Para dañar al mínimo las estructuras se procedió a su disección con el material de osteosíntesis, únicamente retirado en el proceso de decalcificación de las muestras. El procesado de las muestras siguió el mismo protocolo tras la obtención, de lavado de restos de detritus,

pelaje y restos orgánicos, realizando las mediciones macroscópicas y posteriormente su conservación en formaldehído/formalina tamponada. Una vez fijadas las muestras se procedió en el laboratorio de anatomía patológica a su preparación, decalcificación y corte para estudio histológico.

Respecto a los diversos ítems valorados en el estudio de las muestras, se ha decidido realizar un análisis de factores que podían influir y ser factor de confusión en los resultados así como valorar la cirugía realizada y su idoneidad. Estas variables son:

- El *gap* en ambas interfases (proximal y distal) tanto radiológico como histológico macroscópico.
- La presencia de periostio en la zona media del injerto (zona más distante a la interfase) a nivel microscópico
- La sinostosis radiocubital secundaria a la intervención quirúrgica a nivel radiológico.

Todas ellas mostraron muestras de que la cirugía realizada ha sido correcta, obteniendo resultados que diferencian ambos grupos de estudio.

### 7.1.3 Evaluación del modelo animal

La utilización de animales de experimentación en los estudios preclínicos es una constante en la investigación médica que viene condicionada por la posibilidad de extrapolación de los resultados que se obtienen en el estudio al ámbito médico en el ser humano para su aplicabilidad clínica.

La elección del modelo animal es uno de los pasos clave en esta investigación pues debe ser un modelo viable, factible, reproducible y que nos muestre unas características de similitud con el humano que permitan llevar a cabo el proyecto y alcanzar los objetivos propuestos.

La utilización de aloinjertos segmentarios (IMHC intercalares) en la práctica habitual clínica y en los estudios preclínicos ha sido objeto de

caracterización, evaluación y so durante muchos años y han ofrecido muestras de reproducibilidad y resultados, que si bien no son excelentes ni exentos de complicaciones, pretenden otorgar un sustento biológicamente afín al segmento resecado para compensar esa pérdida y permitir la funcionalidad de la extremidad afecta.

Hoy en día, la utilización de aloinjertos criopreservados en la cirugía oncológica de reconstrucción sigue siendo una de las principales armas terapéuticas de que disponemos y su asociación a injertos vascularizados debe ser uno de los objetivos de los próximos años para disminuir su morbilidad, complicaciones y mejorar su supervivencia y su biomecánica para preservar la función y la supervivencia del huésped.

En el caso de este estudio que nos ocupa, consideramos un modelo animal habitual en la práctica clínica como es el conejo para llevar a cabo el estudio. Considerando las características del animal y la evolución y resultados del estudio, se debe considerar el modelo animal como un modelo válido para el estudio realizado.

El modelo animal del estudio se basa, como se ha comentado, en un modelo descrito previamente de resección segmentaria y reconstrucción con aloinjerto que se ha modificado mediante el aporte perióstico en este estudio. Además, se han realizado modificaciones del modelo en cuanto a anestesia previa, control postoperatorio y seguimiento del conejo, cosa que deriva en un modelo de características diferenciales importantes respecto al modelo de base. El hecho de realizar el estudio piloto previamente con dos conejos también ha supuesto la comprobación de la viabilidad del modelo expuesto en este trabajo.

Diversos estudios se han realizado teniendo como base a utilización de modelos animales diversos asociando injertos de periostio vascularizado a defectos segmentarios en diversas localizaciones, para el estudio de la consolidación y regeneración ósea, tal como se detallan a continuación

16,118,120,126;

| Autor                  | Animal                                | N  | Hueso              | Técnica IQ  | Resultados  |
|------------------------|---------------------------------------|----|--------------------|---|---|
| <b>Zhao<br/>2010</b>   | Conejo New Zealand<br>(8-10 semanas)  | 24 | Radio<br>bilateral | 3 grupos:<br>Aloinjerto aislado<br>Mucosa intestinal porcina<br>Tejido periostio-like (TEP)<br>Seguimiento:       | No diferencias entre Aloinjerto y TEP<br>Histológicamente TEP mejor que Aloinjerto<br>SIS no funciona |
| <b>Kaya<br/>2010</b>   | Conejo New Zealand<br>(14-21 semanas) | 16 | Radio Izq.         | 2 grupos:<br>Aloinjerto desperiostizado<br>Colgajo periostico + aloinjerto  | Mejoría de la consolidación radiológica en<br>constructos con periostio y aloinjerto                  |
| <b>Chang<br/>2008</b>  | Ovejas                                | 15 | Costilla           | 4 defectos segmentarios:<br>control, aloinjerto aislado, aloinjerto +<br>periostio vasc., aloinjerto + hueso vasc | 15 semanas mejor consolidación en constructo<br>periostio-aloinjerto que aloinjerto aislado.          |
| <b>Takato<br/>1988</b> | Conejo hembra                         | 23 | Costilla           | 2 grupos:<br>1 grupo control s<br>Evolución a 2,4,8 y 16 semanas  | Mejor tejido óseo regenerado, similar en grosor al<br>previo a las 4 semanas                          |

Tabla 15. Trabajos publicados basando el estudio de injertos de periostio y aloinjertos estructurales.

Dentro del cuadro se pueden observar los estudios previos y posteriores a éste realizados en animales que incorporan el estudio del periostio vascularizado asociado a injerto óseo alogénico. Como se puede observar, tratándose de estudios experimentales, son estudios con varios grupos de diferente tratamiento, con un bajo número de animales y que pueden dar lugar a errores metodológicos, en nuestro estudio nos hemos basado en valorar la técnica de periostio vascularizado asociado con respecto a no asociarlo y su evolución temporal a corto, medio y largo plazo, realizando un estudio simple que evite errores de muestreo de los animales y errores metodológicos.

## 7.2. VIABILIDAD DE LA TÉCNICA QUIRURGICA Y LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

Las técnicas de reconstrucción microquirúrgicas son un recurso a explotar en el tratamiento integral de los tumores óseos. El uso de técnicas microquirúrgicas esta hoy en día ampliamente extendido en la reconstrucción de defectos masivos óseos (además de musculares y cutáneos) generados en la resección tumoral en cirugía oncológica siendo una de las principales opciones en defectos que no afectan las epífisis y la superficie articular.

Los estudios presentes en la literatura que utilizan el periostio como medio para la regeneración ósea concuerdan en afirmar que este tejido promueve la osteoformación y la regeneración ósea respecto a diferentes situaciones, asociando o no injertos óseos. Nuestro estudio ha pretendido ir un paso más allá evaluando la capacidad de este periostio de revascularizar el injerto criopreservado alogénico y valorar su mecanismo, cosa que en la literatura no se ha descrito tal como se ha propuesto en el estudio aunque hay estudios similares valorando tejidos artificiales modificados y suplementados con células madre mesenquimales o materiales osteoinductores.

Nuestra propuesta incluye el uso del periostio como un colgajo libre, sin soporte estructural que preserva las capacidades y funciones propias del tejido que si bien como resultado no se ha podido objetivar la revascularización y revitalización del injerto entendida como la colonización del injerto por parte de células osteoblásticas derivadas del periostio y angiogénesis con neoformación de vasos, si que ha mostrado resultados favorables en cuanto a neoformación ósea estructurada y madura de hueso inmaduro y cartilago que se ha prolongado en el tiempo durante las primeras 10 semanas de evolución del constructo, además cabe añadir que la tasa de pseudoartrosis de los especímenes del grupo control (comparable a algunas series publicadas) es mucho mayor en la población control que en el grupo experimental.

Estudios preclínicos como el de Runyan et al <sup>135</sup>determinan la revitalización del injerto por el hecho de una tasa importante de regeneración ósea y osteoformación tras refracturas de injertos versus tibias nativas en

cerdos era sin un análisis profundo de definición de revitalización. En nuestro estudio se han observado indicios de que el periostio es capaz de iniciar un proceso de revitalización de osteocitos no necróticos y neoformación de vasos que se compagina con el proceso de resorción y neoformación ósea presente de manera habitual en la biología de reparación de defectos óseos. Debemos observar cierta discrepancia en la definición de revascularización y revitalización ósea de los injertos alogénicos en los diferentes estudios que tratan sobre la revascularización de injertos.

Otro estudio que ha valorado la terapia conjunta de periostio vascularizado asociado a injertos estructurales ha sido el de Lin et al en 2014<sup>136</sup>, que aleatoriza 3 grupos con 16 conejos cada uno mediante un control sin injerto, otro grupo con hueso autógeno y el último asociando el constructo periostio-aloinjerto, admitiendo como revascularizados los injertos que consolidan en interfase aunque sea a muy largo plazo. En este estudio se concluye que el constructo periostio-injerto tienen una integración similar a la de los autoinjertos sin profundizar en los aspectos de definición de revascularización.

De nuevo Runyan et al. muestran en 2014<sup>137</sup> un estudio en mandíbula de cerdos donde concluye que el proceso de revascularización de los aloinjertos, a semejanza de los resultados obtenidos en nuestro estudio, es debido a una sustitución del injerto alogénico por hueso vivo del huésped (en su estudio promueven la utilización de células madre mesenquimales adiposas asociando BMP-2 consiguiendo buenos resultados en cuanto a neoformación y neovascularización a nuestro parecer.

Barckman et al en 2013<sup>138</sup> publican un estudio en 12 perros adultos asociando una aumentación con tejido perióstico en implantes de titanio asociados a hueso alogénico no estructural obteniendo un aumento discreto de la neoformación ósea sin mejorar las propiedades mecánicas de los implantes.

Cabe comentar también diferentes estudios que han propuesto la revitalización de aloinjertos mediante membranas de ingeniería de tejidos mimetizando el periostio nativo combinando células mesenquimales, proteínas



morfogenéticas y diferentes sustancias osteoinductoras en una matriz (*carrier*) de hidrogel, que si bien poseen mejores resultados en tasas de neoformación ósea y menos índice de complicaciones respecto el uso de aloinjertos aislados pero que no han conseguido un potencial regenerador óseo como el periostio nativo. Este camino posiblemente representa uno de los futuros de la biomedicina aplicada, no obstante, a día de hoy la utilización de tejido perióstico nativo ofrece mejores resultados que los tejidos artificiales en las series y los estudios publicados a día de hoy en la literatura.

Podemos concluir que los estudios presentes en la literatura a día de hoy confluyen en afirmar que la membrana perióstica tiene un gran poder de osteoformación y osteoinducción, obteniendo una marcada consolidación y integración en las interfases de los aloinjertos asociando periostio.

No obstante, algunos estudios propugnan la revascularización y revitalización de dichos injertos, cosa que se puede corresponder parcialmente con nuestros resultados donde hemos observado una mejor tasa de consolidación y de neoformación ósea y se ha considerado indicios, por las muestras valoradas a nivel microscópico electrónico que el proceso de integración de los aloinjertos responde en cierta medida a un proceso de revascularización entendiendo el mismo como una revitalización celular (en células en fase apoptótica no avanzada) y una neovascularización en el injerto (IMHC) siendo el mecanismo por el cual “vitaliza” el hueso del injerto un mecanismo combinado de revitalización de osteocitos con viabilidad celular, neoformación de vasos (en zona de interfase próxima al injerto huésped) asociado a un proceso de resorción del injerto y neoformación ósea por parte del periostio y el hueso huésped (como se ha visto analizando la variable de longitud del injerto tanto macro como microscópicamente donde hemos observado una disminución significativa del injerto alogénico a lo largo del seguimiento de las muestras) que se potencia y prolonga en el tiempo con la inclusión del periostio vascularizado.

Aun considerando este matiz en cuanto a los resultados en la comparación entre nuestro trabajo y los publicados en la literatura, hay suficiente evidencia para afirmar que la asociación de periostio vascularizado en un modelo animal a injertos óseos estructurales criopreservados (IMHC) es

una técnica microquirúrgica válida, reproducible y factible para la reconstrucción de defectos óseos masivos pues los trabajos demuestran:

- Una mejor y más rápida consolidación de la interfase hueso huésped-injerto
- Una más ordenada consolidación y madurez del callo óseo.
- Una extensión temporal más larga del proceso de curación y integración ósea del injerto
- Una menor tasa de complicaciones asociadas al uso aislado de aloinjertos
- Una disminución de la morbilidad asociada a los injertos óseos vascularizados
- Una mayor efectividad, a día de hoy, del periostio respecto a membranas derivadas de la ingeniería tisular, aunque este camino podría mejorar en un futuro la morbilidad asociada del injerto nativo de periostio vascularizado.
- Un proceso de revitalización y regresión de osteocitos en fase apoptótica que presentan todavía viabilidad celular en la zona de interfase próxima al hueso huésped, no así en la zona central del aloinjerto.

### 7.2.1 Limitaciones del estudio

Al tratarse de un estudio experimental de carácter preclínico con animales de experimentación (en el caso que nos ocupa el conejo), como cualquier trabajo de esta índole se pueden detectar ciertas limitaciones en el estudio que a continuación se plasmarán:

1.- El animal elegido fue el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza New Zealand White por su tamaño y peso (aunque se considera un animal mediano con peso entre 3-5 kg) y nos permitía la disección aislada del periostio en el segmento de radio estudiado y mantener su viabilidad íntegramente. No obstante, al tratarse de un animal filogenéticamente distante de los humanos, la aplicabilidad clínica y la inferencia de los resultados obtenidos a la terapéutica humana puede resultar dificultosa. Cabe añadir, que si bien su

aclimatación, estabulación y manipulación ofrecen un beneficio respecto animales más grandes, su labilidad clínica puede ser un inconveniente en el trabajo con estos animales. A nivel de extrapolación de los trabajos en conejos a humanos, debemos considerar que el metabolismo óseo en estos animales es más acelerado que en el hueso humano por lo que su poder de regeneración es mucho mayor. Añadir también que el aporte de injerto óseo se encuentra en los límites del llamado *critical size defect* en conejos, cosa que puede influir en la progresión de consolidación de los polos proximal y distal del complejo hueso nativo-aloinjerto, no así influir en el regenerado óseo del aloinjerto criopreservado estructural (IMHC). Si el estudio es viable con estos animales, el camino a seguir es el desarrollo de proyectos en animales grandes más semejantes a los humanos y posteriormente en humanos.

2.- El tamaño muestral del estudio es relativamente pequeño, no obstante, la muestra obtenida es mayor que los estudios publicados que se han revisado. Además, los estudios preclínicos de investigación animal deben intentar ser lo más ajustados posible a la cantidad de animales mínima que puedan mostrar resultados positivos en el estudio. En nuestro caso cabe decir que se observan ciertas diferencias entre los grupos de estudio pese al pequeño tamaño muestral. Evidentemente aumentar el tamaño muestral puede ser un factor a tener en cuenta para obtener más diferencias entre los grupos.

3.- Los resultados obtenidos se han basado en la observación microscópica y macroscópica de las muestras, siendo este un estudio básico de investigación terapéutica sobre el periostio, evidentemente, este estudio muestra una visión básica de dicho proceso que considero, posteriormente debe dar pie a nuevos estudios a nivel de microestructura, más complejo en cuanto a bioquímica, marcadores moleculares y procesos biológicos que no eran aplicables en este trabajo por el coste que ello suponía y porque la realización del trabajo se encara a su vertiente quirúrgica y de revisión clínica.

4.- Este estudio se ha basado en focalizar la reconstrucción con periostio vascularizado en gazapos, basado en la población diana para la utilización de estas técnicas que es la edad infantil o adolescente temprana donde el periostio tiene unas características anatómicas que lo hacen disecable en bloque y con gran capacidad de osteoformación y osteoinducción. En edad

adulta, este tipo de injerto de periostio libre es menos viable y se recomienda asociar a injertos corticoperiosticos para mayor volumen estabilidad y cohesión en el lecho receptor (como por ejemplo un peroné vascularizado (IPV).

### 7.2.2 Aplicación clínica de los resultados obtenidos

Tal como ocurre en todo estudio preclínico, su realización tiene como objetivo el obtener resultados positivos para promover tanto nuevos estudios clínicos derivados de los hallazgos como obtener una trascendencia clínica.

Para objetivar esta trascendencia y aplicación clínica nos remitimos a su objetivo principal, evaluar la promoción de consolidación y revascularización de los injertos intercalares congelados masivos (IMHC) asociados a periostio vascularizado en grandes defectos óseos. Tras el estudio de las variables realizadas, se ha observado que la consolidación de dichos IMHC es más rápida, más organizada y con una evolución más constante en los sujetos del grupo experimental (periostio) respecto al grupo control, no obstante, no hemos objetivado un proceso de revascularización del hueso alogénico entendiendo dicho proceso como una reocupación de las osteonas y lagunas óseas con nuevos osteocitos-osteoblastos (procedentes por migración de la capa basal del periostio), si no que el mecanismo de integración ósea de estos injertos parece realizarse a través de la resorción, neoformación y osteoinducción del injerto por parte del hueso huésped, potenciado y organizado de manera más eficiente mediante el injerto de periostio vascularizado.

Como se ha comentado anteriormente, diversos estudios preclínicos han valorado la capacidad osteogénica del periostio, asociado o no a aloinjertos confirmando su potencial osteogenerador (inductor y formador). Nuestro estudio es el primero a valorar histopatológicamente la posible revascularización ósea de injertos estructurales en asociación de injertos de periostio vascularizado en un modelo animal.

Aunque no se puede concluir que hayamos obtenido resultados definitivos respecto el objetivo principal de la tesis, se han encontrado indicios

en la microscopia electrónica de revascularización de los aloinjertos, potenciados por la asociación con periostio vascularizado en este estudio, es por ello que se considera que el estudio tiene trascendencia clínica en cuanto a resultados secundarios obtenidos, ya que el injerto de periostio vascularizado nos aporta un potencial osteogénico de gran capacidad regenerativa que puede ser utilizado en la práctica clínica (como se ha visto en casos reportados por nuestro grupo en casos de necesidad de aporte biológico a defectos óseos) evitando la morbilidad de la zona dadora tras la obtención de injertos de peroné vascularizado y disminuyendo los riesgos clásicos de los aloinjertos masivos.

¿Porque hemos obtenido este resultado positivo aunque no concluyente en cuanto a la revascularización del injerto óseo por parte del periostio en toda la totalidad del aloinjerto y sólo encontrando esta revitalización celular en zona de interfase próxima al hueso huésped? Desde el punto de vista anatómico a nivel cortical, las lagunas óseas son cuevas estancas donde se aloja un osteocito, produciendo matriz osteoide que al calcificarlo lo engloba y aísla del resto a excepción de las prolongaciones citoplasmáticas de conexión entre osteonas. Al realizar el tratamiento de lavado, purga y congelación del injerto se realiza un proceso de muerte celular, manteniendo cerradas las lagunas óseas y osteonas cosa que evita la colonización de células precursoras pertenecientes al *cambium layer* y instruidas para su diferenciación a células productoras de hueso pero que a través de los calcóforos citoplasmáticos de conexión entre osteocitos pueden modular osteocitos quiescentes para su reactivación celular y su revitalización. Este proceso es factible a nivel de interfase pues hay más zona de contacto que no en zona cortical estructural en su tercio medio donde este proceso no se ha observado

Adicionalmente, el periostio ejerce una suplementación de la actividad osteoformadora en la interfase hueso huésped aloinjerto que provoca una mejor y mas organizada neoformación y remodelación ósea mediante el aloinjerto que parece actuar como sustrato para la consolidación de la interfase. Aunque el proceso se lleva a cabo de manera continuada, a largo plazo no hemos observado una total desaparición del injerto, si no que perdura integrado dentro del sustrato óseo neoformado, con osteonas vacías y

desvitalizadas, cosa que hace pensar que no presenta unas características biomecánicas similares al hueso nativo.

Se debe considerar en el futuro la realización de estudios preclínicos y clínicos en el contexto de asociaciones biológicas estructurales entre injertos criopreservados y injertos vascularizados de periostio de cara a conocer mejor la interacción entre ambos.

En la práctica clínica, su utilización por parte de cirujanos experimentados puede ser una alternativa o bien un procedimiento de rescate ante el fracaso de IPV u otro tipo de reconstrucciones (microquirúrgicas o no) con el objetivo de restaurar la función de la extremidad sin llegar a la amputación, disminuyendo las potenciales complicaciones, morbilidad y mejorando la calidad de vida de los sujetos diana a los que hace referencia este estudio (población infantil-adolescente) que deban precisar una reconstrucción anatómica por una resección masiva a nivel de las extremidades.



## 8.- Conclusiones





## 8.- CONCLUSIONES

La hipótesis de la que partía esta tesis: “*La asociación de la membrana perióstica vascularizada a los injertos masivos de hueso criopreservado en el tratamiento de grandes defectos óseos contribuye a la consolidación y revascularización del injerto óseo y su asimilación por el huésped.*” Tras ser evaluada y a colación de los resultados obtenidos en este estudio, se concluye que:

- La consolidación ósea de los injertos estructurales es sometida a un proceso de aceleración tras la asociación del periostio vascularizado cosa que conlleva a una mejor asimilación por el huésped.
- A nivel de microscopia electrónica, se han observado elementos de evidencia científica que pueden concluir que se produce un proceso de revitalización de osteocitos en fase apoptótica y de revascularización del injerto óseo por parte del hueso huésped y potenciado por la membrana perióstica. Este fenómeno se ha observado en la zona de interfase del hueso huésped-injerto, no así en la parte central del IMHC presentando lagunas vacías con ausencia de celularidad y neoformación de vasos.

Respecto a los objetivos previos que se postulaban en esta tesis y tras el estudio de los resultados obtenidos cabe concluir que:

- Se ha conseguido el objetivo de refinamiento del modelo de animal superior, creando una modificación del modelo descrito en la literatura que ha permitido una mejor cirugía, menos lesiva y agresiva, un mejor control del dolor postoperatorio y una alta viabilidad de los especímenes en el postoperatorio a corto, medio y largo plazo.
- El segundo objetivo como se ha comentado en la hipótesis se han observado indicios de revitalización, obteniendo resultados de consolidación ósea más rápida, madura y con mejor callo óseo del grupo experimental (GP) respecto el grupo control así como se ha

obtenido evidencia científica de indicios de revascularización del IMHC tras la asociación de periostio vascularizado a nivel periférico del aloinjerto, no así en la zona central en el tiempo de seguimiento estipulado.

- El tercer objetivo viene a continuación del previo, se ha considerado un inicio de revascularización del injerto pero también cabe matizar que se ha producido una resorción parcial del IMHC a largo plazo por lo que consideramos que el aloinjerto estructural es en parte revascularizado y en parte reutilizado para la regeneración ósea, tratándose de un proceso de neoformación ósea a través del sustrato que proporciona el aloinjerto. El periostio en este sentido actúa como catalizador de la formación ósea acelerando el proceso de regeneración observados en 3 mecanismos:
  - Disminuyendo el tejido inflamatorio (infiltrado celular macrófago - fagocítico y neutrofilico),
  - Mejorando la estructura y maduración del callo óseo del grupo experimental respecto el control
  - Mejorando la desdiferenciación de la zona de transición entre interfases hueso huésped – aloinjerto.

Ante estos resultados, creemos que este trabajo es el principio de un paso hacia el mejor conocimiento a nivel biológico y molecular de la asociación de periostio vascularizado y aloinjertos estructurales y abre la puerta a nuevos diseños y estudios experimentales terapéuticos sobre dicha asociación.

## 9.- Referencias bibliográficas



## 9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hornicek FJ, Gebhardt MC, Tomford WW, et al. Factors affecting nonunion of the allograft-host junction. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;(382):87-98.
2. Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allografts: a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A(7):971-986.
3. Bullens PHJ, Minderhoud NM, De Waal Malefijt MC, Veth RPH, Buma P, Schreuder HWB. Survival of massive allografts in segmental oncological bone defect reconstructions. *Int Orthop.* 2009;33(3):757-760. doi:10.1007/s00264-008-0700-2.
4. Alman BA, De Bari A, Krajbich JI. Massive allografts in the treatment of osteosarcoma and Ewing sarcoma in children and adolescents. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(1):54-64.
5. Mankin HJ, Hornicek FJ. The Use of Massive Allografts in the Treatment of Knee Tumors. *Tech Knee Surg.* 2004;3(3):170-179. doi:10.1097/01.btk.0000135885.84367.3e.
6. Brigman BE, Hornicek FJ, Gebhardt MC, Mankin HJ. Allografts about the Knee in Young Patients with High-Grade Sarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(421):232-239. doi:10.1097/01.blo.0000127132.12576.05.
7. Makley JT. The use of allografts to reconstruct intercalary defects of long bones. *Clin Orthop Relat Res.* 1985;(197):58-75. doi:10.1097/00003086-198507000-00008.
8. Capanna R, Campanacci DA, Belot N, et al. A New Reconstructive Technique for Intercalary Defects of Long Bones: The Association of Massive Allograft with Vascularized Fibular Autograft. Long-Term Results and Comparison with Alternative Techniques. *Orthop Clin North Am.* 2007;38(1):51-60. doi:10.1016/j.ocl.2006.10.008.
9. Friedrich JB, Moran SL, Bishop AT, Wood CM, Shin AY. Free Vascularized Fibular Graft Salvage of Complications of Long-Bone Allograft After Tumor Reconstruction. *J Bone Jt Surgery-American Vol.* 2008;90(1):93-100. doi:10.2106/JBJS.G.00551.
10. Hariri a, Mascard E, Atlan F, et al. Free vascularised fibular graft for reconstruction of defects of the lower limb after resection of tumour. *J Bone Joint Surg Br.* 2010;92(11):1574-1579. doi:10.1302/0301-

- 620X.92B11.23832.
11. Moran SL, Shin AY, Bishop AT. The use of massive bone allograft with intramedullary free fibular flap for limb salvage in a pediatric and adolescent population. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(2):413-419. doi:10.1097/01.prs.0000227682.71527.2b.
  12. Innocenti M, Abed YY, Beltrami G, Delcroix L, Manfrini M, Capanna R. Biological reconstruction after resection of bone tumors of the proximal tibia using allograft shell and intramedullary free vascularized fibular graft: Long-term results. *Microsurgery.* 2009;29(5):361-372. doi:10.1002/micr.20668.
  13. Abed YY, Beltrami G, Campanacci DA, Innocenti M, Scoccianti G, Capanna R. Biological reconstruction after resection of bone tumours around the knee: LONG-TERM FOLLOW-UP. *J Bone Jt Surg - Br Vol.* 2009;91-B(10):1366-1372. doi:10.1302/0301-620X.91B10.22212.
  14. Soldado F, Fontecha CG, Barber I. Vascularized Fibular Periosteal Graft : A New Technique to Enhance Bone Union in Children. 2012;32(3):308-313.
  15. Soldado F, Barrera-Ochoa S, Fontecha CG, et al. Vascularized periosteal graft from the first metatarsal bone: A new technique to prevent collapse of osteonecrosis of the talus in children. A case report. *Microsurgery.* 2013;33(1):56-59.
  16. Chang DW, Satterfield WC, Son D, et al. Use of Vascularized Periosteum or Bone to Improve Healing of Segmental Allografts after Tumor Resection: An Ovine Rib Model. *Plast Reconstr Surg.* 2009;123(1):71-78. doi:10.1097/PRS.0b013e3181904baf.
  17. Stevens A, Lowe J. *Human Histology.* 2nd editio. Hancourt; 1998.
  18. Gartner LP, Hiatt. JL. *Atlas de Histología.* 3rd ed. McGraw Hill; 2007.
  19. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1-17. doi:10.1155/2015/421746.
  20. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3 Suppl 3. doi:10.2215/CJN.04151206.
  21. Nakamura H. Morphology , Function , and Differentiation of Bone Cells. *J Hard Tissue Biol.* 2007;16(1):15-22. doi:10.2485/jhtb.16.15.
  22. Cowin S, Telega J. *Bone Mechanics Handbook, 2nd Edition.* -. Vol 56.; 2003. doi:10.1115/1.1579463.

23. Nakamura H. Morphology, Function, and Differentiation of Bone Cells. *J Hard Tissue Biol.* 2007;16(1):15-22. doi:10.2485/jhtb.16.15.
24. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423(6937):349-355. doi:10.1038/nature01660.
25. Athanasou N a. Current concepts review: cellular biology of bone-resorbing cells. *J Bone Jt Surg .* 1996;78-A:1096-1112.
26. van Leeuwen JPTM, van der Eerden BCJ, van de Peppel J, Stein GS, Lian JB. Osteoblast Biology. In: *Osteoporosis: Fourth Edition.* ; 2013:161-207. doi:10.1016/B978-0-12-415853-5.00009-1.
27. Aarden EM, Nijweide PJ, Burger EH. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem.* 1994;55(3):287-299. doi:10.1002/jcb.240550304.
28. Ross FP. Osteoclast Biology and Bone Resorption. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism: Seventh Edition.* ; 2009:16-22. doi:10.1002/9780470623992.ch3.
29. Roodman GD. Advances in bone biology: The osteoclast. *Endocr Rev.* 1996;17(4):308-332. doi:10.1210/er.17.4.308.
30. Väänänen K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption - Rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(7):959-971. doi:10.1016/j.addr.2004.12.018.
31. Miller MD. *Review of Orthopaedics.* 5th ed. Elsevier Ltd; 2008.
32. Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn.* 2013;242(8):909-922. doi:10.1002/dvdy.23992.
33. Mackie EJ, Tatarczuch L, Mirams M. The skeleton: A multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol.* 2011;211(2):109-121. doi:10.1530/JOE-11-0048.
34. Rivas R, Shapiro F. Structural Stages in the Development of the Long Bones and Epiphyses : A Study in the New Zealand White Rabbit. 2012. doi:10.2106/JBJS.K.00981.
35. Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periosteum: Biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone.* 2004;35(5):1003-1012. doi:10.1016/j.bone.2004.07.014.
36. Simpson AH. The blood supply of the periosteum. *J Anat.* 1985;140 ( Pt 4:697-704. doi:10.1097/00006534-198610000-00053.



37. O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS. The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;(391 Suppl):S190-S207. doi:10.1097/00003086-200110001-00019.
38. Augustin G, Antabak A, Davila S. The periosteum. Part 1: Anatomy, histology and molecular biology. *Injury*. 2007;38(10):1115-1130. doi:10.1016/j.injury.2007.05.017.
39. Orwoll ES. Toward an Expanded Understanding of the Role of the Periosteum in Skeletal Health. *J Bone Miner Res*. 2003;18(6):949-954. doi:10.1359/jbmr.2003.18.6.949.
40. Aaron JE. Periosteal sharpey's fibers: A novel bone matrix regulatory system. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3(AUG):1-10. doi:10.3389/fendo.2012.00098.
41. Augustin G, Antabak A, Davila S. The periosteum. Part 1: Anatomy, histology and molecular biology. *Injury*. 2007;38(10):1115-1130. doi:10.1016/j.injury.2007.05.017.
42. Canale ST, Beaty JH. *Campbell's Operative Orthopaedics*. 11th ed. Elsevier Ltd; 2008.
43. Kotz R, Dominkus M, Zettl T, et al. Advances in bone tumour treatment in 30 years with respect to survival and limb salvage. A single institution experience. *Int Orthop*. 2002;26(4):197-202. doi:10.1007/s00264-002-0365-1.
44. Bird JE. Advances in the surgical management of bone tumors. *Curr Oncol Rep*. 2014;16(7). doi:10.1007/s11912-014-0392-2.
45. Ortiz-Cruz E, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Mankin HJ. The results of transplantation of intercalary allografts after resection of tumors. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Am*. 1997;79(1):97-106.
46. Simon M, Springfield DS. Surgery for bone and soft tissue tumors. In: Lippincott-Raven, ed. Philadelphia; 1998.
47. Sissons HA. The WHO classification of bone tumors. *Recent results cancer Res Fortschritte der Krebsforsch Prog dans les Rech sur le cancer*. 1976;(54):104-108.
48. McCarthy E, Frassica E. Pathology of Bone and Joint Disorders. In: ; 1998.

49. Bechler JR, Robertson WW, Meadows AT, Womer RB. Osteosarcoma as a second malignant neoplasm in children. *J Bone Joint Surg Am.* 1992;74(7):1079-1083.
50. Enneking WF, Conrad EU. Common bone tumors. *Clin Symp.* 1989;41(3):1-32.
51. Franchi A. Epidemiology and classification of bone tumors. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2012;9(2):92-95.
52. Enneking WF. A system of staging musculoskeletal neoplasms. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;(204):9-24.
53. Enneking WF. Musculoskeletal tumor staging: 1988 update. *Cancer Treat Res.* 1989;44:39-49.
54. Unni KK. Classification of bone tumours. *Can J Surg.* 1977;20(6):504-509. doi:10.1016/S0720-048X(98)00046-1.
55. Jawad MU, Scully SP. Classifications in brief: Enneking classification: Benign and malignant tumors of the musculoskeletal system. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(7):2000-2002. doi:10.1007/s11999-010-1315-7.
56. Fleming I, Cooper J, Henson D. *American Joint Committee on Cancer: Bone.* 5th ed. Lippincott-Raven; 1997.
57. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours.* Vol 10.; 2009.
58. Wittig JC, Bickels J, Priebat D, et al. Osteosarcoma: A multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2002;65(6). doi:10.1111/j.1529-8019.2010.01352.x.
59. Caracciolo JT, Letson GD. Radiologic Approach to Bone and Soft Tissue Sarcomas. *Surg Clin North Am.* 2016;96(5):963-976. doi:10.1016/j.suc.2016.05.007.
60. Chan BY, Gill KG, Rebsamen SL, Nguyen JC. MR Imaging of Pediatric Bone Marrow. *Radiographics.* 2016;36(6):1911-1930. doi:10.1148/rg.2016160056.
61. Brien EW, Mirra JM, Luck J V. Benign and malignant cartilage tumors of bone and joint: their anatomic and theoretical basis with an emphasis on radiology, pathology and clinical biology. II. Juxtacortical cartilage tumors. *Skeletal Radiol.* 1999;28(1):1-20.

62. Brien EW, Mirra JM, Kerr R. Benign and malignant cartilage tumors of bone and joint: their anatomic and theoretical basis with an emphasis on radiology, pathology and clinical biology. I. The intramedullary cartilage tumors. *Skeletal Radiol.* 1997;26(6):325-353.
63. Bolling WS, Beauchamp CP. Presentation and evaluation of bone tumors. *Instr Course Lect.* 1999;48:607-612.
64. Barrientos-Ruiz I, Ortiz-Cruz EJ, Serrano-Montilla J, Bernabeu-Taboada D, Pozo-Kreilinger JJ. Are Biopsy Tracts a Concern for Seeding and Local Recurrence in Sarcomas? *Clin Orthop Relat Res.* 2017;475(2):511-518. doi:10.1007/s11999-016-5090-y.
65. Bickels J, Jelinek JS, Shmookler BM, Neff RS, Malawer MM. Biopsy of musculoskeletal tumors. Current concepts. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;1999(368):212-219. doi:10.1097/00001433-199712000-00010.
66. Mankin HJ, Mankin CJ, Simon MA. The hazards of the biopsy, revisited. Members of the Musculoskeletal Tumor Society. *J Bone Joint Surg Am.* 1996;78(5):656-663. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642021>. Accessed June 5, 2017.
67. Meyers PA, Gorlick R, Heller G, et al. Intensification of preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: results of the Memorial Sloan-Kettering (T12) protocol. *J Clin Oncol.* 1998;16(7):2452-2458. doi:10.1200/JCO.1998.16.7.2452.
68. Bacci G, Lari S. Current treatment of high grade osteosarcoma of the extremity: review. *J Chemother.* 2001;13(3):235-243. doi:10.1179/joc.2001.13.3.235.
69. Zehr RJ. Treatment options for orthopaedic oncologic entities. *Instr Course Lect.* 1999;48:591-602. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10098087>.
70. Bacci G, Ferrari S, Lari S, et al. Osteosarcoma of the limb. Amputation or limb salvage in patients treated by neoadjuvant chemotherapy. *J Bone Joint Surg Br.* 2002;84(1):88-92.
71. Bacci G, Ferrari S, Longhi A, et al. Preoperative therapy versus immediate surgery in nonmetastatic osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 2003;21(24):4662-4663. doi:10.1200/JCO.2003.99.157.

72. Ferrari S, Palmerini E, Staals EL, et al. The treatment of nonmetastatic high grade osteosarcoma of the extremity: review of the Italian Rizzoli experience. Impact on the future. *Cancer Treat Res.* 2009;152:275-287. doi:10.1007/978-1-4419-0284-9\_14.
73. Picci P, Mercuri M, Ferrari S, et al. Survival in high-grade osteosarcoma: improvement over 21 years at a single institution. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2010;21(6):1366-1373. doi:10.1093/annonc/mdp502.
74. Rosenberg SA, Tepper J, Glatstein E, et al. Prospective randomized evaluations of (1) limb-sparing surgery plus radiation therapy compared with amputation and (2) the role of adjuvant chemotherapy. *Ann Surg.* 1982;196(3):305-315.
75. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. Current concepts review. The surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *J Bone Joint Surg Am.* 1980;62(6):1027-1030.
76. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* (153):106-120.
77. Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;(324):86-97.
78. Dotan A, Dadia S, Bickels J, et al. Expandable endoprosthesis for limb-sparing surgery in children: Long-term results. *J Child Orthop.* 2010;4(5):391-400. doi:10.1007/s11832-010-0270-x.
79. Ruggieri P, Mavrogenis AF, Pala E, Romantini M, Manfrini M, Mercuri M. Outcome of Expandable Prostheses in Children. *J Pediatr Orthop.* 2013;33(3):244-253. doi:10.1097/BPO.0b013e318286c178.
80. Ward WG, Yang R-S, Eckardt JJ. Endoprosthetic bone reconstruction following malignant tumor resection in skeletally immature patients. *Orthop Clin North Am.* 1996;27(3):493-502.
81. Eckardt JJ, Safran MR, Eilber FR, Rosen G, Kabo JM. Expandable endoprosthetic reconstruction of the skeletally immature after malignant bone tumor resection. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;(297):188-202.
82. Lewis MM. The use of an expandable and adjustable prosthesis in the treatment of childhood malignant bone tumors of the extremity. *Cancer.*

1986;57(3):499-502.

83. Kenan S, DeSimone DP, Lewis MM. Limb sparing for skeletally immature patients with osteosarcoma: the expandable prosthesis. *Cancer Treat Res.* 1993;62:205-211.
84. Pala E, Trovarelli G, Calabrò T, Angelini A, Abati CN, Ruggieri P. Survival of modern knee tumor megaprotheses: failures, functional results, and a comparative statistical analysis. *Clin Orthop Relat Res.* 2015;473(3):891-899. doi:10.1007/s11999-014-3699-2.
85. Mavrogenis AF, Pala E, Angelini A, et al. Infected Prostheses after Lower-Extremity Bone Tumor Resection: Clinical Outcomes of 100 Patients. *Surg Infect (Larchmt).* 2015;16(3):267-275. doi:10.1089/sur.2014.085.
86. Enneking WF, Shirley PD. Resection-arthrodesis for malignant and potentially malignant lesions about the knee using an intramedullary rod and local bone grafts. *J Bone Joint Surg Am.* 1977;59(2):223-236.
87. Dunham WK, Calhoun JC. Resection arthrodesis of the knee for sarcoma: preliminary results. *Orthopedics.* 1984;7(12):1810-1818. doi:10.3928/0147-7447-19841201-06.
88. Santori FS, Folliero A, Ghera S, Manili M, Pistolesi R, Monticelli G. Segmental amputation with re-implantation in the treatment of malignant bone tumours of the limbs. *Ital J Orthop Traumatol.* 1986;12(1):13-23.
89. Donati D, Giacomini S, Gozzi E, et al. Knee arthrodesis with a temporary spacer performed in malignant tumor around the knee. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2002;122(2):123-128. doi:10.1007/s004020100327.
90. Ilizarov GA. The principles of the Ilizarov method. *Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst.* 1988;48(1):1-11.
91. Ilizarov GA. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res.* 1990;(250):8-26.
92. Cara JA, Cañadell J. Limb salvage for malignant bone tumors in young children. *J Pediatr Orthop.* 14(1):112-118.
93. Cañadell J, Forriol F, Cara JA. Removal of metaphyseal bone tumours with preservation of the epiphysis. Physeal distraction before excision. *J Bone Joint Surg Br.* 1994;76(1):127-132.
94. Böhm P, Springfield R, Springer H. Re-implantation of autoclaved bone segments in musculoskeletal tumor surgery. Clinical experience in 9

- patients followed for 1.1-8.4 years and review of the literature. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1998;118(1-2):57-65.
95. Manabe J, Ahmed AR, Kawaguchi N, Matsumoto S, Kuroda H. Pasteurized autologous bone graft in surgery for bone and soft tissue sarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(419):258-266.
96. Singh V, Nagalingam J, Saad M, Pailoor J. Which is the best method of sterilization of tumour bone for reimplantation? a biomechanical and histopathological study. *Biomed Eng Online.* 2010;9(1):48. doi:10.1186/1475-925X-9-48.
97. Roque PJ, Mankin HJ, Malchau H. Proximal femoral allograft: Prognostic indicators. *J Arthroplasty.* 2010;25(7):1028-1033. doi:10.1016/j.arth.2009.07.018.
98. Campanacci L, Manfrini M, Colangeli M, Ali N, Mercuri M. Long-term results in children with massive bone osteoarticular allografts of the knee for high-grade osteosarcoma. *J Pediatr Orthop.* 2010;30(8):919-927. doi:10.1097/BPO.0b013e3181fa7981.
99. Mavrogenis AF, Angelini A, Vottis C, et al. State-of-the-art approach for bone sarcomas. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2015;25(1):5-15. doi:10.1007/s00590-014-1468-2.
100. Salai M, Rahamimov N, Pritch M, Rotstein Z, Horoszowski H. Massive bone allografts in the treatment of pathologic fractures due to bone metastases. *J Surg Oncol.* 1997;66(2):93-96. doi:10.1002/(SICI)1096-9098(199710)66:2<93::AID-JSO4>3.0.CO;2-G.
101. Fuchs B, Ossendorf C, Leerapun T, Sim FH. Intercalary segmental reconstruction after bone tumor resection. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34(12):1271-1276. doi:10.1016/j.ejso.2007.11.010.
102. Bumbasirevic M, Stevanovic M, Bumbasirevic V, Lesic A, Atkinson HDE. Free vascularised fibular grafts in orthopaedics. *Int Orthop.* 2014;38(6):1277-1282. doi:10.1007/s00264-014-2281-6.
103. Zalavras CG. Reconstruction of Large Skeletal Defects Due to Osteomyelitis with the Vascularized Fibular Graft in Children. *J Bone Jt Surg.* 2007;89(10):2233. doi:10.2106/JBJS.E.01319.
104. Trigui M, de Billy B, Metaizeau J-P, Clavert J-M. Treatment of congenital pseudarthrosis of the fibula by periosteal flap. *J Pediatr Orthop Part B.* 2010;19(6):473-478. doi:10.1097/BPB.0b013e32833cb749.

105. El-Gammal TA, El-Sayed A, Kotb MM. Reconstruction of lower limb bone defects after sarcoma resection in children and adolescents using free vascularized fibular transfer. *J Pediatr Orthop B*. 2003;12(4):233-243. doi:10.1097/01.bpb.0000049577.53117.e7.
106. Duffy GP, Wood MB, Rock MG, et al. Vascularized free fibular transfer combined with autografting for the management of fracture nonunions associated with radiation therapy. *J Bone Jt Surg - Ser A*. 2000;82(4):544-554.
107. Ostrup LT, Fredrickson JM. Distant transfer of a free, living bone graft by microvascular anastomoses. An experimental study. *Plast Reconstr Surg*. 1974;54(3):274-285.
108. Doi K, Tominaga S, Shibata T. Bone grafts with microvascular anastomoses of vascular pedicles: an experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am*. 1977;59(6):809-815.
109. Doi K, Sakai K. Vascularized periosteal bone graft from the supracondylar region of the femur. *Microsurgery*. 1994;15(5):305-315.
110. Sakai K, Doi K, Kawai S. Free vascularized thin corticoperiosteal graft. *Plast Reconstr Surg*. 1991;87(2):290-298.
111. Del Piñal F, García-Bernal FJ, Regalado J, Ayala H, Cagigal L, Studer A. Vascularised corticoperiosteal grafts from the medial femoral condyle for difficult non-unions of the upper limb. *J Hand Surg Eur Vol*. 2007;32(2):135-142. doi:10.1016/J.JHSB.2006.10.015.
112. Soldado F, Diaz-Gallardo P, Sena-Cabo L, et al. Vascularized fibular grafts extended with vascularized periosteum in children. *Microsurgery*. April 2016. doi:10.1002/micr.30063.
113. Kanaya K, Wada T, Kura H, Yamashita T, Usui M, Ishii S. Valgus Deformity of the Ankle Following Harvesting of a Vascularized Fibular Graft in Children. *J Reconstr Microsurg*. 2002;18(2):091-096. doi:10.1055/s-2002-19888.
114. Houdek MT, Wagner ER, Stans AA, et al. What Is the Outcome of Allograft and Intramedullary Free Fibula (Capanna Technique) in Pediatric and Adolescent Patients With Bone Tumors? *Clin Orthop Relat Res*. 2016;474(3):660-668. doi:10.1007/s11999-015-4204-2.
115. González-Herranz P, del Río A, Burgos J, López-Mondejar JA, Rapariz



- JM. Valgus deformity after fibular resection in children. *J Pediatr Orthop.* 23(1):55-59.
116. Menendez ME, Fontecha CG, Mascarenhas V V., Knorr J, Soldado F. Unsuccessful vascularized fibular periosteal graft for treatment of femoral head osteonecrosis. *Eur J Plast Surg.* 2016;39(5):399-400. doi:10.1007/s00238-015-1168-0.
117. Houdek MT, Wagner ER, Stans AA, et al. What Is the Outcome of Allograft and Intramedullary Free Fibula (Capanna Technique) in Pediatric and Adolescent Patients With Bone Tumors? *Clin Orthop Relat Res.* 2016;474(3):660-668. doi:10.1007/s11999-015-4204-2.
118. Zhao L, Zhao J, Wang S, Wang J, Liu J. Comparative study between tissue-engineered periosteum and structural allograft in rabbit critical-sized radial defect model. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2011;97B(1):1-9. doi:10.1002/jbm.b.31768.
119. Fonseca C, Server A, Esteves M, et al. An ultrasound-guided technique for axillary brachial plexus nerve block in rabbits. *Lab Anim (NY).* 2015;44(5):179-184. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25897939>.
120. Kaya A, Tuncay C, Kaya U, Demirörs H. [The effect of periosteum on the union of the autoclaved bone graft-host bone: experimental study in rabbits]. *Eklem Hastalik Cerrahisi.* 2010;21(3):159-165.
121. Manfrini M, Bindiganavile S, Say F, et al. Is There Benefit to Free Over Pedicled Vascularized Grafts in Augmenting Tibial Intercalary Allograft Constructs? *Clin Orthop Relat Res.* 2017;475(5):1322-1337. doi:10.1007/s11999-016-5196-2.
122. Colnot C, Zhang X, Tate MLK. Current insights on the regenerative potential of the periosteum: Molecular, cellular, and endogenous engineering approaches. *J Orthop Res.* 2012;30(12):1869-1878. doi:10.1002/jor.22181.
123. Finley JM, Acland RD, Wood MB. Revascularized periosteal grafts--a new method to produce functional new bone without bone grafting. *Plast Reconstr Surg.* 1978;61(1):1-6.
124. Finley JM, Wood MB, Acland RD. Osteogenesis from periosteal autografts in ulnar defects in dogs. *J Microsurg.* 1(3):203-207.
125. Chang DW, Satterfield WC, Son D, et al. Use of Vascularized Periosteum or Bone to Improve Healing of Segmental Allografts after Tumor Resection: An Ovine Rib Model. *Plast Reconstr Surg.* 2009;123(1):71-78.



doi:10.1097/PRS.0b013e3181904baf.

126. Takato T, Harii K, Nakatsuka T. Osteogenic capacity of vascularised periosteum: experimental study using rib periosteum in rabbits. *Br J Plast Surg*. 1988;41(5):528-532.
127. Poussa M, Ritsilä V. The osteogenic capacity of free periosteal and osteoperiosteal grafts. A comparative study in growing rabbits. *Acta Orthop Scand*. 1979;50(5):491-499.
128. Camilli JA, Penteado C V. Bone formation by vascularized periosteal and osteoperiosteal grafts. An experimental study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1994;114(1):18-24.
129. Cavadas PC, Landín L. Treatment of Recalcitrant Distal Tibial Nonunion Using the Descending Genicular Corticoperiosteal Free Flap. *J Trauma Inj Infect Crit Care*. 2008;64(1):144-150.  
doi:10.1097/01.ta.0000249347.35050.3f.
130. Fuchs B, Steinmann SP, Bishop AT. Free vascularized corticoperiosteal bone graft for the treatment of persistent nonunion of the clavicle. *J Shoulder Elb Surg*. 2005;14(3):264-268. doi:10.1016/j.jse.2004.06.007.
131. Gonzalez-Herranz P, del Rio A, Burgos J, Lopez-Mondejar JA, Rapariz JM. Valgus deformity after fibular resection in children. *J Pediatr Orthop*. 2003;23(1):55-59. doi:10.1097/00004694-200301000-00011.
132. Kanaya K, Wada T, Kura H, Yamashita T, Usui M, Ishii S. Valgus deformity of the ankle following harvesting of a vascularized fibular graft in children. *J Reconstr Microsurg*. 2002;18(2):91-96. doi:10.1055/s-2002-19888.
133. Yachouh J, Breton P, Roux JP, Goudot P. Osteogenic capacity of vascularised periosteum: An experimental study on mandibular irradiated bone in rabbits. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2010;63(12):2160-2167. doi:10.1016/j.bjps.2010.01.015.
134. Bodde EWH, Spauwen PHM, Mikos AG, Jansen JA. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2008;85(1):206-217. doi:10.1002/jbm.a.31549.
135. Runyan CM, Vu AT, Rumburg A, et al. Repair of a Critical Porcine Tibial Defect by Means of Allograft Revitalization. *Plast Reconstr Surg*. 2015;136(4):461e-473e. doi:10.1097/PRS.0000000000001637.

136. Lin H, Huang D, Huang Y, et al. Efficacy of Combined Therapy of Periosteum and Bone Allograft in a Critical-Sized Defect Model in New Zealand White Rabbits. *Med Sci Monit.* 2014;20:2394-2403. doi:10.12659/MSM.891103.
137. Runyan CM, Ali ST, Chen W, et al. Bone Tissue Engineering by Way of Allograft Revitalization: Mechanistic and Mechanical Investigations Using a Porcine Model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72(5):1000.e1-1000.e11. doi:10.1016/j.joms.2014.01.017.
138. Barckman J, Baas J, Sørensen M, Bechtold JE, Soballe K. Periosteal Augmentation of Allograft Bone and its Effect on Implant Fixation - An Experimental Study on 12 Dogs. *Open Orthop J.* 2013;7(1):18-24. doi:10.2174/1874325001307010018.

