



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

**Análisis de la revitalización de injertos
estructurales de hueso criopreservado
asociados a colgajo perióstico
vascularizado.
Modelo animal en rata.**

Memoria presentada por

Irene Gallardo Calero

Para la obtención del grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Tutor:

Xavier Mir Bulló

Directores:

Sergi Barrera Ochoa

Xavier Mir Bulló

Roberto Vélez Villa

Barcelona, 2017

AGRADECIMIENTOS

Al Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH), al Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR) y a la Universidad Autònoma de Barcelona (UAB) por colaborar y apoyar la investigación.

A la Sociedad Catalana de Cirugía Ortopédica y Traumatología (SCCOT), por financiar la investigación experimental.

Al Dr. Roberto Vélez, por su devoción por la investigación, por sus incansables ganas de innovar, por confiar en mí aún sin casi conocerme y por ayudarme en cada paso de este trabajo.

Al Dr. Sergi Barrera, ante todo por ser mi gran amigo, el impulsor de este proyecto y el que me inició en la investigación preclínica y la microcirugía; por siempre tener un consejo valioso para mí y tener una paciencia infinita. Muchísimas gracias por todo.

Al Dr. Xavier Mir, por su papel como tutor y director de este proyecto, sus conocimientos y su orientación.

Al Dr. Màrius Aguirre, por la ilusión que pone en todos sus proyectos, por su preocupación constante en este trabajo, por liderar nuestro grupo con tanto entusiasmo.

Al gran equipo que forma el Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular Musculoesquelética, porque sin ellos no hubiera sido posible.

A la Dra. Andrea Sallent, por ser compañera y sobre todo amiga, por hacer más llevaderas todas las tardes de microcirugía y por su esfuerzo inagotable; porque no podría haber formado mejor equipo que contigo y porque gracias a ti todo ha sido infinitamente mejor.

Al Dr. Matías Vicente, principalmente por estos últimos meses, por resolver todas mis dudas de estadística con su paciencia interminable, por su amistad.

A Alba López, por su predisposición e inestimable ayuda en la preparación y revisión de las muestras histológicas, por las tardes invertidas en el estudio biomecánico, y sobre todo por hacerlo siempre con una sonrisa.

Al Dr. Alberto Blanco, porque él y su entusiasmo por la fotografía son los autores de la mayoría de imágenes de este trabajo.

Al Dr. Matías de Albert, por su gran colaboración en la planificación y evaluación de las pruebas radiológicas.

A Mónica Ortiz-Hernández y el grupo de Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos de la Universidad Politécnica de Catalunya, por su profesionalidad, su diligencia y transmitirnos su experiencia en el estudio biomecánico e histológico.

A la Dra. Cristina Manzanares, Manel Bosch y su equipo, por orientarme inicialmente y por su ayuda en la revisión y evaluación de los resultados histológicos.

A Marta Rosal, Alejandro Rojo y a todo el personal del estabulario, por su colaboración y consejos en relación al cuidado de los animales.

Al Dr. Joan Minguell, por su cercanía, confianza y los muchos consejos que da desde la humildad y el cariño.

Al Dr. Joan Bagó, por su ayuda y sus consejos en la revisión final de este trabajo.

Al Dr. Pablo Corona, por transmitirnos a los que empezamos sus incansables ganas de publicar, por todo lo que he aprendido de ti.

Al Dr. Daniel Pacha, por el entusiasmo que pone en todo lo que hace y por inspirarnos a todos los residentes.

A mis compañeros residentes de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Vall d'Hebron, porque trabajar con amigos es un placer.

A mis padres y mi hermana Alba y a Daniel, por su apoyo incondicional, quererme, ayudarme y animarme siempre.

A Danilo, por estar siempre ahí.

FINANCIACIÓN DEL PROYECTO

Beca de ayuda a la investigación Sociedad Catalana de Cirugía Ortopédica y Traumatología (SCCOT) 2012:

- Investigador principal: Màrius Aguirre Canyadell
- Investigadores asociados: Irene Gallardo Calero, Sergi Barrera-Ochoa, Alba López Fernández y Roberto Vélez Villa
- Financiación 12.000 euros.



ÍNDICE

ÍNDICE

1. Justificación del trabajo	13
2. Introducción	19
2.1. Defectos óseos segmentarios	21
2.2. Reconstrucción de defectos óseos segmentarios	23
2.2.1. Aloinjerto óseo intercalar	26
2.2.2. Autoinjerto óseo estructural no vascularizado	41
2.2.3. Técnica de membrana inducida (Masquelet)	45
2.2.4. Osteogénesis por distracción (Trasporte óseo)	52
2.2.5. Colgajo óseo vascularizado. Peroné vascularizado	57
2.2.6. Colgajo perióstico vascularizado	62
2.3. Modelos de defectos óseos animales	72
2.3.1. Aloinjerto óseo en rata	72
2.3.2. Colgajos vascularizados en rata	78
3. Hipótesis de trabajo	85
4. Objetivos	89
5. Material y métodos	93
5.1. Material	95
5.1.1. Animal	95
5.1.2. Instrumental para los procedimientos quirúrgicos	96
5.2. Métodos	100
5.2.1. Evaluación inicial, técnica de anestesia general y cuidados postoperatorios	100

5.2.2. Estudio mediante tomografía axial computarizada de la topografía del muslo de la rata	102
5.2.3. Estudio anatómico de la vascularización del colgajo perióstico	102
5.2.4. Estudio mediante resonancia magnética de la viabilidad del colgajo perióstico vascularizado a las 6 semanas.	104
5.2.5. Obtención, preparación y preservación del aloinjerto estructural óseo	106
5.2.6. Técnica de resección ósea	107
5.2.7. Técnica de reconstrucción con aloinjerto óseo estructural	109
5.2.8. Técnica de colgajo perióstico vascularizado	111
5.2.9. Protocolo de eutanasia y obtención de muestras	116
5.2.10. Protocolo de evaluación de pseudoartrosis clínica	118
5.2.11. Protocolo de evaluación mediante microtomografía computarizada (microCT)	118
5.2.12. Protocolo de estudio biomecánico	120
5.2.13. Protocolo de estudio de microscopía confocal	123
5.2.14. Protocolo de estudio mediante microscopia electrónica de barrido	126
5.2.15. Protocolo de análisis histológico	128
5.2.16. Análisis estadístico	130
5.2.17. Distribución de los animales	131
6. Resultados	137
6.1. Evaluación clínica	139

6.2.	Peso	143
6.3.	Supervivencia/Mortalidad	144
6.4.	Viabilidad del pedículo vascular del colgajo	144
6.5.	Exploración del fémur intervenido	146
6.6.	Evaluación mediante microtomografía computarizada	149
6.7.	Estudio biomecánico	158
6.8.	Estudio de microscopía confocal	170
6.9.	Estudio mediante microscopía electrónica de barrido	174
6.10.	Estudio histológico	179
7.	Discusión	187
7.1.	Capacidad de osteointegración y revitalización del colgajo perióstico vascularizado	189
7.2.	Limitaciones del estudio	206
7.3.	Trascendencia clínica del estudio	209
8.	Conclusiones	211
9.	Bibliografía	215

1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El salvamento de extremidad se ha convertido en el estándar de tratamiento en pacientes afectos de tumor óseo maligno, consiguiendo reemplazar actualmente a la amputación sin comprometer el pronóstico oncológico. En gran parte, esto ha sido gracias al avance en los tratamientos adyuvantes, las técnicas quirúrgicas y los implantes de reconstrucción [1]. Además, la mejoría de las tasas de supervivencia de estos pacientes exige una alta calidad de las técnicas reconstructivas para mejorar la funcionalidad y disminuir las complicaciones de la extremidad intervenida.

Una de las herramientas utilizadas en la actualidad para la reconstrucción de grandes defectos óseos son los aloinjertos óseos estructurales. Los injertos óseos estructurales permiten una reconstrucción anatómica y biológica con la propiedad de consolidación al hueso huésped mediante la formación de callo óseo. Funcionan como un espaciador biológico que se integra lentamente al huésped mediante osteoconducción, y una vez integrados ofrecen una longevidad a la reconstrucción. El injerto óseo alogénico, habitualmente extraído de cadáver, tratado y almacenado en bancos de tejidos, presenta como principal ventaja su mayor disponibilidad en cantidad y la ausencia de morbilidad asociada para al propio paciente, en comparación al injerto autólogo. El injerto óseo alogénico suele ser procesado y congelado, lo cual elimina las células y deteriora otros componentes, incluidas ciertas proteínas como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Por ello, el injerto óseo alogénico procesado no presenta características osteogénicas pero sí retiene sus características osteoconductoras y aún ciertas osteoinductivas [2].

Se ha descrito una tasa de fracaso a largo plazo de un aloinjerto masivo del 25%, debido a no unión, fractura o infección [3,4]. En concreto, se han descrito tasas de no unión de entre el 12% y el 57%, de fractura del 7% al 30% y de infección del 5% al 21% en cirugías de salvamento de extremidad [5-11].

Se podría pensar en una opción no biológica para evitar todas las complicaciones derivadas de las reconstrucciones biológicas. No obstante, a pesar de que las prótesis segmentarias pueden aportar estabilidad inmediata y buenos resultados funcionales a corto plazo, están asociada a problemas a largo plazo, con un aflojamiento reportado a los 10 años del 63% [12], con el consecuente requerimiento de recambio protésico, especialmente en aquellos casos con una mayor esperanza de vida como los pediátricos. Existe, pues, una necesidad real de desarrollar un método de reconstrucción óptimo en este tipo de casos.

En los últimos años se han descrito buenos resultados a largo plazo en la reconstrucción de defectos óseos estructurales con injertos vascularizados. En comparación con los injertos óseos no vascularizados, los vascularizados poseen un mayor potencial osteogénico y una mayor resistencia a la resorción [13], y favorecen también la penetración de los antibióticos a nivel del aloinjerto así como la respuesta inmune [2]. Sin embargo, no están exentos de inconvenientes; entre otros, la morbilidad del área donante o restricciones debido a las dimensiones y a la anatomía regional del tejido donante. Capanna y cols. [14] describieron en el año 1993 una nueva técnica que combinaba un injerto de peroné vascularizado con un aloinjerto convencional para la reconstrucción de grandes defectos diafisarios, con el objetivo de combinar las propiedades mecánicas del aloinjerto, así como la posibilidad de adaptarlo mejor a la anatomía del defecto, con la actividad biológica del peroné vascularizado, acelerando la consolidación de las

osteotomías. Otra opción de reconstrucción biológica es la asociación de un colgajo perióstico vascularizado a un aloinjerto óseo estructural. Actualmente en la práctica clínica los colgajos periósticos vascularizados se han usado de forma novedosa y en casos muy específicos. El colgajo perióstico es mas versátil y adaptable a las diferentes anatomías de los defectos generados y aporta una superficie osteogénica mayor que el colgajo de peroné vascularizado [15–19]. A pesar de sus resultados prometedores, existe poca literatura al respecto, y se resume principalmente en cortas series clínicas. Se desconocen los efectos reales y objetivos del colgajo perióstico en cuanto a consolidación y revitalización. No hemos hallado ningún estudio comparativo que estudie el papel de los colgajos periósticos vascularizados en reconstrucciones de defectos óseos segmentarios, y de cómo intervienen en la consolidación de las osteotomías y la revitalización del aloinjerto óseo. Es por ello que consideramos de una enorme importancia iniciar una línea de investigación experimental en este campo, lo que aportaría resultados objetivos y con suficiente potencia estadística que actualmente no están presentes en la literatura, sin olvidar la enorme aplicabilidad y utilidad clínica y quirúrgica que llevaría consigo. Estos datos facilitarían el planteamiento correcto de nuevas hipótesis y posibles alternativas terapéuticas para disminuir la tasa de no unión y de infección en la gran cantidad de trabajos experimentales que este ámbito genera actualmente. Constituiría una referencia en todos ellos, y crearía un gran impacto bibliométrico en el ámbito oncológico, experimental, y de cirugía reconstructiva.

Varios injertos basados en costilla o peroné han sido utilizados en la literatura como fuente de colgajo vascularizado experimental en estudios en especies superiores como perros o cerdos, los cuales necesitan una estabulación

relativamente complicada y conllevan un coste elevado. Debemos buscar modelos igualmente fiables pero más accesibles para la investigación, pudiéndolos trasladar a especies superiores si los resultados son alentadores. Es por este motivo que creemos que la rata representa el animal idóneo, ya que dado su pequeño tamaño es fácil de estabulizar, sencilla de monitorizar, y la disección es relativamente asequible, lo que constituye un modelo económico y reproducible.

Para llevar a cabo nuestro estudio hemos utilizado un colgajo perióstico vascularizado de cóndilo femoral medial descrito recientemente [20], preservando así la vascularización distal del miembro, disminuyendo el riesgo de devascularización de la extremidad inferior y, de esta manera, la morbilidad del animal. Además, al ser un colgajo pediculado no precisa de técnicas de sutura microvascular y aumenta sus posibilidades de viabilidad. Por último, los estudios sobre infección ósea y formación ósea precisan de un hueso manipulable en cuanto a tamaño óseo, características óseas, diámetro del canal endomedular y radio de curvatura óseo. El fémur de la rata comparte gran parte de las características anatómicas con el ser humano en cuanto a las variables anteriormente mencionadas, y carece del radio de curvatura que presenta la tibia, por ejemplo, lo que facilita su disección y osteosíntesis. La descripción de nuestro modelo animal y sus resultados prometedores ofrece ventajas únicas para el estudio experimental de neoformación ósea.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Defectos óseos segmentarios

El hueso es el único tejido del organismo, junto con el hígado y la córnea, que tiene capacidad de regenerarse tras ser lesionado en un tejido con la misma calidad, estructura y arquitectura. Tiene un potencial de reparación muy elevado a través de un proceso dinámico de remodelación que incluye la neoformación y reabsorción ósea, caracterizado por la casi completa ausencia de cicatriz. La cirugía oncológica o séptica, la corrección de deformidades o los traumatismos de alta energía pueden conllevar pérdidas óseas muy importantes creando defectos masivos con un pobre potencial de regeneración intrínseca [21]. La reconstrucción de un defecto óseo traumático es un proceso que incluye cascadas celulares, humorales, y eventos biomecánicos que culminan en la restauración del hueso [22].

Un defecto óseo crítico se define como el defecto óseo de menor tamaño en un hueso y especie concreta que no puede curar espontáneamente [23–25], o presenta una regeneración menor del 10% a lo largo de toda su vida [23,26,27], o su longitud excede de 2.5 veces su diámetro [28,29]. Los defectos óseos críticos requieren por lo tanto, de técnicas reconstructivas para conseguir su reparación completa. No obstante, no es solo el tamaño de un defecto óseo lo que lo caracteriza como crítico. Variables como la localización, problemas de partes blandas o biomecánicos asociados, la edad y alteraciones metabólicas o sistémicas afectan al potencial curativo del hueso [30]. La complejidad de las comorbilidades que pueden presentar estos pacientes así como la gran variedad de causas del

defecto (tumoral, séptico, postraumático o del desarrollo), hacen que no exista una única técnica establecida como tratamiento de elección.

Un defecto óseo pequeño con una adecuada cobertura de partes blandas se puede tratar con métodos estándar de fijación y autoinjerto o sustitutos óseos [31]. Sin embargo, esto no es aplicable cuando se trata de defectos que exceden los 4-5 cm. A pesar de que en la literatura hay descritos casos de curación espontánea de defectos de hasta 15 cm tras únicamente la fijación con un clavo endomedular [32], no está exento de complicaciones. En la reconstrucción de grandes defectos óseos segmentarios, habitualmente asociados a un estado cutáneo subóptimo, el potencial de regenerativo se encuentra disminuido y frecuentemente requieren de técnicas quirúrgicas más especializadas para su manejo. En los últimos años, los métodos más utilizados son: los aloinjertos óseos masivos, los injertos de peroné vascularizado y las técnicas de osteogénesis por distracción y transporte óseo con fijador externo [22,33].

2.2. Reconstrucción de defectos óseos segmentarios

Son muchas las técnicas descritas para la reconstrucción de defectos óseos masivos, desde el uso de reconstrucciones no biológicas como prótesis segmentarias, hasta las reconstrucciones biológicas como los aloinjertos o autoinjertos óseos, la técnica de membrana inducida (técnica de Masquelet), la osteogénesis por distracción o las técnicas de ingeniería tisular (factores de crecimiento, células osteogénicas y matrices biológicas) [34].

El método de reconstrucción utilizado depende del escenario clínico ante el que nos encontramos así como de los resultados que esperamos. Los injertos óseos combinan una función mecánica y biológica. Dependiendo del requerimiento clínico, una función puede tener más peso que la otra. Además, también se deben tener en cuenta las propiedades del lecho receptor.

Las aplicaciones clínicas de cada tipo de injerto óseo están dictadas por su estructura y propiedades biomecánicas. Es necesario, por lo tanto, entender bien las características que aportará cada uno con el fin de obtener un resultado óptimo.

La osteogénesis consiste en el proceso de síntesis de hueso nuevo por células derivadas tanto del injerto como del huésped. Se ha demostrado que con un adecuado manejo de los autoinjertos, pueden sobrevivir las células en su superficie [35,36]. Esta propiedad es especialmente importante en las primeras fases de la reparación ósea. El hueso esponjoso, con una estructura trabecular que le aporta una mayor superficie recubierta de osteoblastos, es especialmente atractivo cuando el objetivo es la formación ósea. De la misma manera, el injerto de médula ósea aporta proteínas osteoinductivas y células con potencial osteogénico. Se

conocen dos tipos de osteogénesis según la forma de osificación: la intramembranosa y la endocondral [37–39]. En la intramembranosa el hueso se forma directamente del mesénquima, mientras que en la endocondral es una osificación indirecta, inicialmente formando cartílago hialino que posteriormente es reabsorbido y reemplazado por hueso. La primera es característica de los huesos planos y de la consolidación del hueso esponjoso, y requiere una estabilidad absoluta así como una buena vascularización y un ambiente rico en oxígeno. A diferencia de esta, en la osificación endocondral los requerimientos biológicos y biomecánicos son menores, siendo característica de los huesos largos de las extremidades y del hueso cortical. Es importante recalcar que la formación de callo óseo es inherente a una vía de osificación indirecta de tipo endocondral [38]. El resultado final de ambas es la osteointegración del aloinjerto con el hueso huésped (Tabla 1).

Injerto	Osteo- génesis	Osteo- inducción	Osteo- conducción	Propiedades mecánicas	Vascu- larización
Autoinjerto					
Médula ósea	++	+/-	+	-	-
Esponjosa	++	++	+	+	-
Cortical	+	+	+/-	++	-
Vascularizado	++	++	+	++	++
Aloinjerto					
Esponjosa	-	++	+	+	-
Cortical	-	+/-	+/-	++	-
Desmineralizado	-	++	+++	-	-

Tabla 1. Actividad de los injertos óseos según el tipo. “-”, “+”, “++”, “+++” simboliza la intensidad de actividad, siendo “-” sin actividad, y “+++” actividad máxima.

La osteoinducción es la capacidad del material implantado para promover la transformación fenotípica de células progenitoras a osteoblastos y condroblastos. Este proceso está regulado por los factores de crecimiento, entre los que se

incluyen BMP-2, -4 y -7, mitógenos como factores de crecimiento derivados de plaquetas, factor transformante beta, e interleuquinas y factores angiogénicos, presentes en la matriz ósea. Esta propiedad no es exclusiva de los autoinjertos, sino que también ha sido descrita en aloinjertos, siendo máxima en los injertos no mineralizados, y menor en los injertos estructurales [40–42].

La osteoconducción es un proceso mediante el cual se ordenan en el espacio tridimensional el crecimiento de los capilares, tejido perivascular y las células madre mesenquimales. La matriz implantada permite la formación de hueso nuevo a lo largo de un patrón predecible determinado por la biología del injerto y el ambiente mecánico de la interfase huésped-aloinjerto [43,44].

Más recientemente, se ha desarrollado el concepto de osteopromoción, con el cual se define la capacidad de inducir la formación ósea mediante la utilización de barreras (membranas). Este mecanismo se conoce como “regeneración tisular guiada”, popularizada por Masquelet [45].

A continuación analizamos las técnicas reconstructivas más comunes para el tratamiento de defectos óseos segmentarios.

2.2.1. Aloinjerto óseo intercalar

Los aloinjertos óseos estructurales son una de las principales alternativas para el tratamiento de defectos óseos segmentarios masivos. Se ha ido incrementando su uso en la práctica clínica desde que Macewen reportó el primer caso en un defecto de humero proximal en una niña de 4 años en 1881 [46]. Años más tarde, en 1908, Lexter publicó el primer caso de trasplante de una articulación [47]. Son numerosos los trabajos que encontramos en la literatura estudiando el papel que juegan los aloinjertos óseos intercalares en la reconstrucción de defectos óseos masivos, la gran mayoría en el campo de la cirugía oncológica. La gran ventaja de este tipo de injertos es que permite reparar defectos óseos grandes recuperando el stock óseo, ofreciendo una reconstrucción funcional a largo plazo [5,48]. Sin embargo, la tasa de fracaso a largo plazo de un aloinjerto masivo es del 25% [3,4], estando las complicaciones que puede presentar íntimamente relacionadas con el estado avascular del injerto así como la carencia de potencial osteogénico de este.

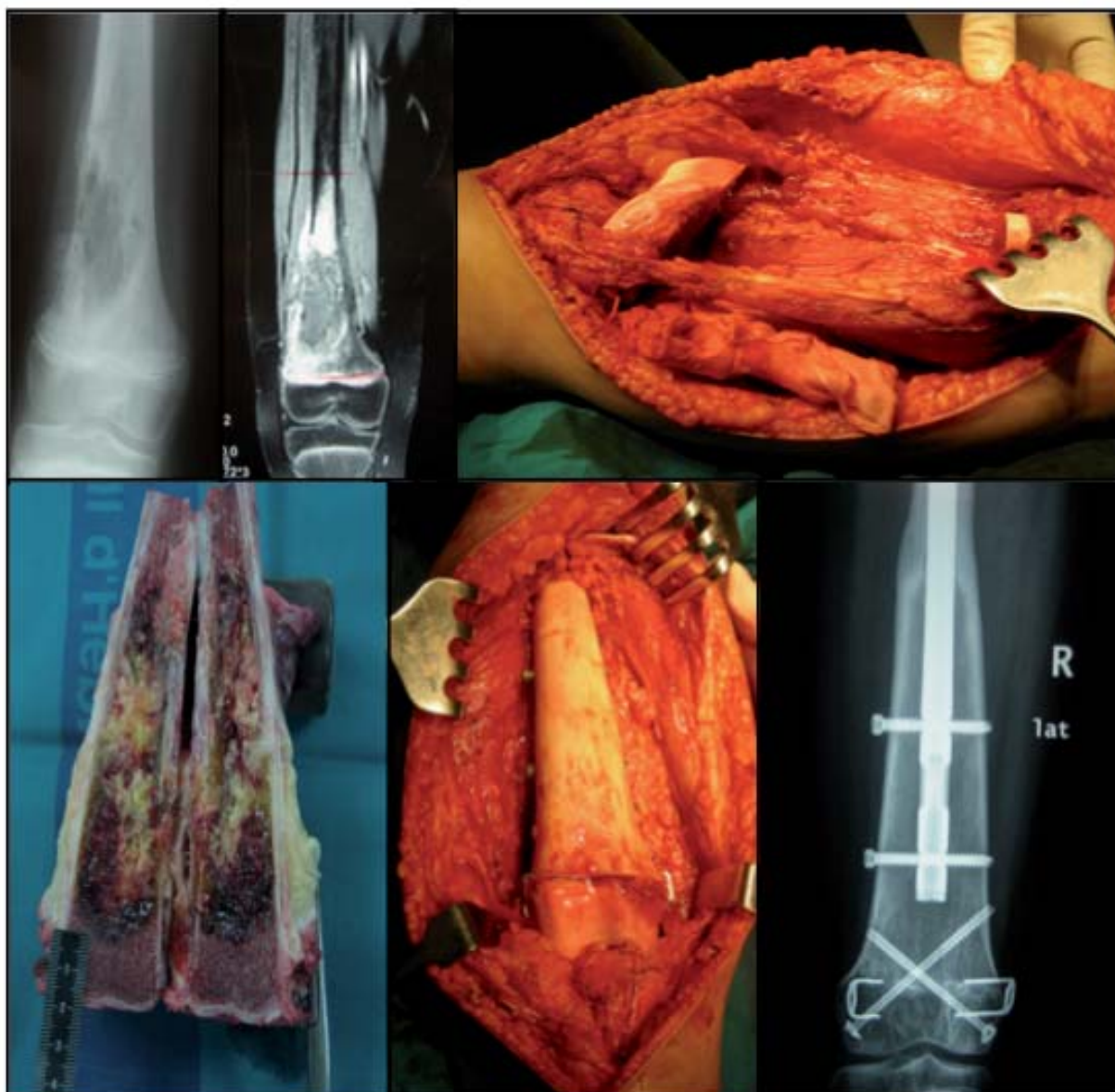


Figura 1. Osteosarcoma de fémur distal. Resección amplia y reconstrucción con aloinjerto óseo intercalar. Consolidación completa de ambas interfases hueso huésped-aloinjerto. Cortesía del Dr. Pérez (Hospital Vall d'Hebron).

Una de las primeras series que encontramos reportadas fue la publicada por Makley en 1985 [49]. En ella se recogía a 24 pacientes intervenidos de reconstrucción de grandes defectos óseos intercalares mediante un aloinjerto óseo. En la mitad de los casos el defecto era secundario a una resección tumoral, mientras que el resto incluían lesiones óseas benignas, traumatismos, o enfermedad de Paget entre otras. Para la fijación se usaron placas o clavos endomedulares, con un tiempo medio de seguimiento fue de 34.7 meses. Trece de los pacientes (54%) presentaron complicaciones, la mayoría menores. Entre las complicaciones mayores se recogían dos casos de infección, un caso de fractura y dos de no unión.

Una de las controversias que existe alrededor de los aloinjertos óseos es si con el paso del tiempo se acaba revitalizando, entendiendo como tal la revascularización, incorporación y remodelación del aloinjerto, convirtiéndose en un hueso viable, no necrótico, con las propiedades biomecánicas y la capacidad reparativa de un hueso normal [50–52]. En la literatura anglosajona se conoce como *creeping substitution*, que se podría traducir por sustitución por invasión. En el hueso esponjoso se produce en primer lugar la aposición de tejido óseo neoformado y a continuación una fase resortiva. En el hueso cortical es necesaria una resorción inicial del hueso necrótico y, posteriormente, se produce la invasión por vasos y tejido óseo neoformado[53,54].

Enneking [55] fue uno de los primeros en reportar resultados histológicos tras la utilización de aloinjertos óseos para la reconstrucción de defectos óseos masivos. Seleccionó 16 especímenes, con defectos secundarios a tratamientos de salvamento de extremidad por tumores musculoesqueléticos. Se llevaron a cabo estudios radiológicos, macro y microscópicos, correlacionándolos con parámetros

clínicos. Ocho especímenes estaban reconstruidos con aloinjertos osteoarticulares, 3 con aloinjertos intercalares y los 5 restantes con alo-prótesis, con longitudes que oscilaban entre los 17 y 26 cm. En los exámenes radiológicos se reflejaban los procesos biológicos que observaron micro y macroscópicamente. Cuando se trataba de hueso cortical, la consolidación de las osteotomías se llevaba a cabo desde un callo externo que se extendía desde el hueso huésped hacia la superficie externa del aloinjerto, propia de la osificación endocondral. En ningún caso el callo se extendía desde una de las superficies de la interfase hacia la otra. Observaron que a pesar del paso de los años, la orientación inicial de los canales haversianos, perpendicular al eje longitudinal del hueso, se remodelaban volviéndose paralelos a éstos, tal como se encuentran en la cortical del aloinjerto óseo o del hueso huésped. La unión en interfases de hueso esponjoso se produjo más rápidamente, a los 4 meses, sin formarse callo óseo externo, sino a través de tejido fibrovascular reparativo que invadía la cavidad medular del aloinjerto y se diferenciaba en células osteoblásticas. Con el tiempo, este tejido se tornaba en hipocelular y fibroso, actuando de barrera para la penetración del tejido reparativo hacia el resto del aloinjerto, sólo permitiendo la entrada de pocos milímetros de este tejido en el aloinjerto. Observaron que la distribución y cantidad de revascularización estaba íntimamente ligada con la reparación interna del aloinjerto. Se llevaba a cabo lentamente, produciéndose únicamente la incorporación del 20% del aloinjerto a los 5 años. En el lugar donde se producía neovascularización, predominantemente en la superficie y en las osteotomías, el hueso adyacente sufría un proceso de resorción osteoclástica y aposición osteoblástica posterior, a excepción del canal medular, donde el tejido reparativo fibrovascular maduraba a tejido fibroso conectivo. El resto del injerto permanecía avascular y necrótico. Si

esta revascularización no es suficiente, se aumenta el riesgo de fractura del aloinjerto. De los 16 especímenes evaluados, 6 habían sufrido una fractura. En 4 de los casos en los que la fractura se produjo de forma precoz, no se evidenciaron signos de reparación interna, al contrario de los otros dos casos en los que la fractura se produjo a los 14 y 15 meses de la intervención.

Diez años más tarde, Enneking [4] completó el estudio con 57 especímenes nuevos, sumando un total de 73 casos con el anterior estudio. El 90% de ellos se trataba de aloinjertos masivos entre los que encontrábamos 37 osteoarticulares y 21 intercalares. Evidenciaron que en las uniones de hueso cortical el callo óseo se originaba del periostio del hueso huésped, y se extendía 3 cm por encima de la superficie del aloinjerto. En tres especímenes en los que la fijación se había llevado a cabo con placa, no se había formado callo óseo, sino que un puente de hueso esponjoso se había extendido desde el canal medular del hueso huésped, rellenó la zona de osteotomía y penetró el aloinjerto 2-3 cm. Al analizar la revitalización del aloinjerto, observaron que la incorporación media de los aloinjertos se mantenía entre el 20 y 30%. No obstante, existía una gran variabilidad, con un caso de incorporación de 5% a los 5 años, otro de 20% a los 13 años y otro del 70% a los 8 años. Raramente se producía una penetración mayor de 10 mm en la cortical. En la Tabla 2 se muestran factores que influyen la incorporación del aloinjerto. La tasa de fractura fue del 18%, con los mismos hallazgos que en el estudio anterior. La mayor parte de las fracturas se produjeron durante el segundo año de seguimiento. Este estudio contaba con especímenes con reconstrucciones más longevas, y se observó una mayor variabilidad en estos casos, lo que sugería que la interacción entre el hueso huésped y el aloinjerto estaba influenciada por otros factores.

Factores	Favorables	Desfavorables
Local	Buen aporte vascular Gran superficie de contacto Estabilidad mecánica Carga mecánica (compresiva) Factores de crecimiento	Irradiación Tumores Inestabilidad mecánica Pérdida de aporte vascular Falta de contacto de los extremos Infección
Sistémico	Hormona de crecimiento Hormona tiroidea Somatomedinas Vitamina A y D Insulina Hormona paratiroides	Quimioterapia Corticoides AINEs Tabaquismo Sepsis Diabetes Malnutrición proteica Enfermedad metabólica ósea

Tabla 2. Factores locales y sistémicos que influyen en la incorporación del aloinjerto

En el año 1996, Mankin y cols. [5] reportaron la serie más larga del uso de aloinjertos en el manejo de tumores óseos. Recogieron un total de 718 con un seguimiento mayor de dos años. Las edades de los pacientes estaban comprendidas entre los 4 y 80 años. El 25% de los pacientes recibieron quimioterapia o radioterapia adyuvante. En 386 pacientes se usó aloinjerto osteotarticular, en 163 aloinjerto intercalar, en 98 alo-prótesis y en 71 alo-artrodesis. La reconstrucción fracasó en 107 pacientes (14.9%), de los cuales más del 75% se salvaron tras reintervenirlos. En más del 85% de los casos de fracaso estaban implicadas la infección, la fractura o la no unión del aloinjerto. El 11% de los pacientes presentaron infección postoperatoria, y en el 43% de los casos se comprometió el aloinjerto. Se registró una tasa de fractura del 19%, y del 17% de no unión, aunque ninguna de ellas tan devastadora como la primera. La supervivencia de la reconstrucción se estabilizó a los 3 años, sugiriendo un estado de equilibrio entre el huésped y el aloinjerto. La tasa de fractura del aloinjerto fue

similar al 16% reportado años antes en un trabajo junto a Berrey, entre un total de 274 pacientes intervenidos [56], donde sólo correlacionaban el riesgo de fractura con la presencia de no unión a nivel de las interfases.

Un año después, conjuntamente con Ortiz-Cruz y cols. [10] revisaron los resultados de 104 aloinjertos intercalares en 100 pacientes tras resecciones tumorales, con un seguimiento medio de 5.6 años. Los sistemas de fijación utilizados fueron el clavo endomedular en 7 pacientes, y placa en 97. El 84% de los pacientes mantuvieron el injerto a pesar alguno de ellos de sufrir complicaciones y retornaron a su actividad diaria. La no unión se produjo en el 30% de los casos (31 pacientes), 10 en la osteotomía proximal, 10 en la distal y 11 en ambas. A pesar de que la tasa de no unión en las osteotomías metafisarias era la mitad que en las diafisarias y metafiso-diafisarias, no se encontraron diferencias significativas (posiblemente por falta de potencia estadística). Por otra parte, tampoco se evidenciaron diferencias en relación al implante utilizado, probablemente porque el tratamiento con clavo se había llevado a cabo en pocos pacientes. Se produjo fractura en 18 pacientes (17%), 14 de ellos antes de los 3 años. La infección se produjo el 12% de los pacientes, todas en los primeros 3 años. Todas las complicaciones se produjeron con mayor frecuencia en los 25 pacientes que habían recibido radioterapia o quimioterapia adyuvante. La tasa de éxito de la reconstrucción en estos casos fue del 60%, en comparación al 91% de los casos en los que no se habían llevado a cabo estas terapias.

Esta mayor tasa de no unión en osteotomías diafisarias también la objetivó años después Muscolo y cols. [9]. En un estudio en 59 pacientes con aloinjertos intercalares de fémur y tibia por defectos tras resección tumoral (un total de 118 osteotomías, 69 diafisarias y 49 metafisarias), la tasa de no unión fue del 9% con

diferencias en función de si la osteotomía era diafisaria (14.5%) o si era metafisaria (2%). A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas (posiblemente por el escaso tamaño de las muestras), también observaron diferencias en la tasa de consolidación en función de si se había utilizado clavo endomedular (22%) o placa (8%) en la reconstrucción. La tasa de supervivencia de la reconstrucción fue del 79%, sin diferencias a pesar de haber recibido o no quimioterapia adyuvante. Tuvieron una tasa de infección y fractura menor que en trabajos previos (del 5% y 7% respectivamente), y todas las fracturas se produjeron en la metáfisis distal, en zonas no protegidas por el implante.

En la misma línea, Aponte-Tinao y cols. [57] reportaron unos resultados muy similares. Recogieron los resultados de 83 pacientes con reconstrucciones con aloinjerto de fémur intercalar tras resecciones tumorales intervenidos entre 1987 y 2008, con un seguimiento medio de 61 meses. Tuvieron una tasa de supervivencia del 85% a los 5 años, que disminuyó al 76% a los 10 años. El 46% de los pacientes requirieron reintervención, con retirada del aloinjerto el 15 de ellos. La tasa de fractura fue del 17%, la mayoría a nivel del a metáfisis distal y también en relación a áreas del aloinjerto no cubiertas por el sistema de fijación. El 13% de las osteotomías no consolidaron. Las tasas de no unión fueron mayores a nivel diafisario (19% diafisario vs. 3% metafisario) y cuando se fijó la reconstrucción con clavo endomedular (28% clavo vs. 15% placa), pero sin encontrar diferencias significativas en estos últimos. Quince de los pacientes en los que no consolidaron las osteotomías recibieron quimioterapia postoperatoria, y 3 radioterapia, sin hallar diferencias significativas al realizar es análisis estadístico.

También identificaron la localización de la osteotomía así como el sistema de fijación del aloinjerto como factores de riesgo en este tipo de reconstrucción Bus y cols. [58] realizaron un estudio multicéntrico recogiendo 87 casos de defectos óseos intercalares a lo largo de 10 años, el 90% localizados en fémur y tibia. Ocurrieron complicaciones en el 76% de los pacientes, reportando una tasa de no unión del 40%, de fractura del 29% y de infección del 14%, que comprometió la reconstrucción requiriendo retirada o recambio del aloinjerto en 17% de los pacientes. La edad superior a 18 años, la localización diafisaria y las reconstrucciones mayores a 15 cm se evidenciaron como factores de riesgo de fracaso de la reconstrucción. Asimismo, la fijación con clavo y la longitud del aloinjerto mayor de 10 cm se evidenciaron como factores de riesgo de no unión. Todas las reconstrucciones con clavo endomedular requirieron reintervención, y no se encontró relación entre el riesgo de fractura del aloinjerto y la longitud de este.

En el 2012, Frisoni y cols. [59] recogieron un total de 131 reconstrucciones intercalares de fémur con aloinjerto masivo, en 121 pacientes oncológicos. En 30 de ellas el aloinjerto fue suplementado con un colgajo de peroné vascularizado. La fijación se llevó a cabo con placa en el 90% de los casos, y el resto con un clavo endomedular. Reportaron una tasa de no unión en una o ambas osteotomías del 46.5%, hallando en estos casos una tasa de fractura del aloinjerto fue del 15% y de fallo de la osteosíntesis del 22% (8 casos en los clavos endomedulares y 17 en la reconstrucción con placa). Como factores relacionados con la no unión con diferencias estadísticamente significativas encontraron el uso de clavo endomedular, la quimioterapia postoperatoria, y la realización de la osteotomía por encima de 5 cm de la interlínea articular (no en la zona metafisaria). Como

factores protectores encontraron la asociación de colgajo de peroné vascularizado y el uso de placa. La tasa de fractura del aloinjerto en el total de casos evaluados fue del 27%. Los dos factores de riesgo que se encontraron fueron el uso de clavos endomedulares y la reconstrucción de defectos mayores de 17 cm.

En la literatura encontramos también otras series más cortas de casos pero con resultados similares. De esta manera, Salai y cols. [60] reportaron los resultados del uso de aloinjertos óseos masivos en el tratamiento de fracturas patológicas por metástasis óseas en 17 pacientes, con defectos de entre 5 y 22 cm, obteniendo 14 de ellos una funcionalidad completa al final del seguimiento. Voggenreiter y cols. [61] recogieron 21 pacientes que habían recibido un aloinjerto óseo intercalar entre los años 1981 y 1993. Al tratarse de reconstrucciones diafisarias, se prefirió la fijación con un clavo endomedular, y se añadió una placa de compresión dinámica (DCP) para aportar estabilidad rotacional al montaje. Reportaron una tasa de unión a los 15 meses del 86%, aunque se presentaron complicaciones en el 43% de los pacientes, 6 de ellas relacionadas con el aloinjerto y 3 de ellas con el sistema de fijación. Tras la reintervención, todos excepto dos de los pacientes obtuvieron buenos resultados. No se relacionó la quimioterapia adyuvante como factor de riesgo de no unión, sí con la radioterapia. En el 2006 Matejovsky [62] reportó su experiencia con el uso de aloinjertos masivos en la cirugía ortopédica oncológica. Recogió 71 pacientes intervenidos entre los años 1961 y 1990, con aloinjertos tanto osteoarticulares (23), intercalares (28) como de peroné (20). La supervivencia global de todas las reconstrucciones fue del 60%. De los aloinjertos intercalares, el 57% sobrevivieron a los 15 años, cuya tasa de infección fue del 21%, todas en pacientes en los que se había realizado quimioterapia postoperatoria. Por otra parte, Farfalli [63] recogió 26 casos de

aloinjertos intercalares en tibia entre el 1990 y 2008 tras una resección oncológica. Se utilizó placa en 21 de los pacientes, y clavo endomedular en el resto. La tasa de supervivencia fue del 84% a los 5 años y del 79% a los 10. Diez de los pacientes presentaron complicaciones, con un 11.5% infecciones profundas, un 11.5% fracturas y un 7.6% de no uniones.

En el artículo publicado por Wheeler y Enneking en el 2005 [64], se analizaban las propiedades biomecánicas de 13 especímenes con fracaso de la reconstrucción de defectos óseos con aloinjerto, con un tamaño mínimo de 50 mm. Se evidenció una pérdida de resistencia del 50% tras 10 años de seguimiento. Ésta se relacionó con el incremento del 600% de microfracturas acumuladas (posiblemente por la carencia de capacidad reparativa del aloinjerto), un aumento del 20% de la porosidad cortical, y una disminución del 10% de la densidad mineral ósea a nivel cortical, lo que sugiere una degradación del tejido del aloinjerto que disminuye sus propiedades mecánicas. Thompson y cols. [65] analizaron los factores asociados a la fractura del aloinjerto. Se centraron en aquellas fracturas no secundarias a la reabsorción de éste (Tipo II y III según la clasificación de Berrey [56]). Incluyeron 74 paciente en el estudio, de los cuales el 42% se fracturaron, en un tiempo medio de 26 meses tras la intervención. La tasa de fractura de los casos fijación endomedular y sin penetración cortical fue del 13%, en comparación al 69% de los casos en los que se requirió penetración cortical. El análisis estadístico mostró una fuerte relación entre la fractura del aloinjerto y la penetración de su cortical con los implantes utilizados, sin encontraron diferencias en las tasas de no unión a nivel de las interfases con los diferentes sistemas de fijación utilizados.

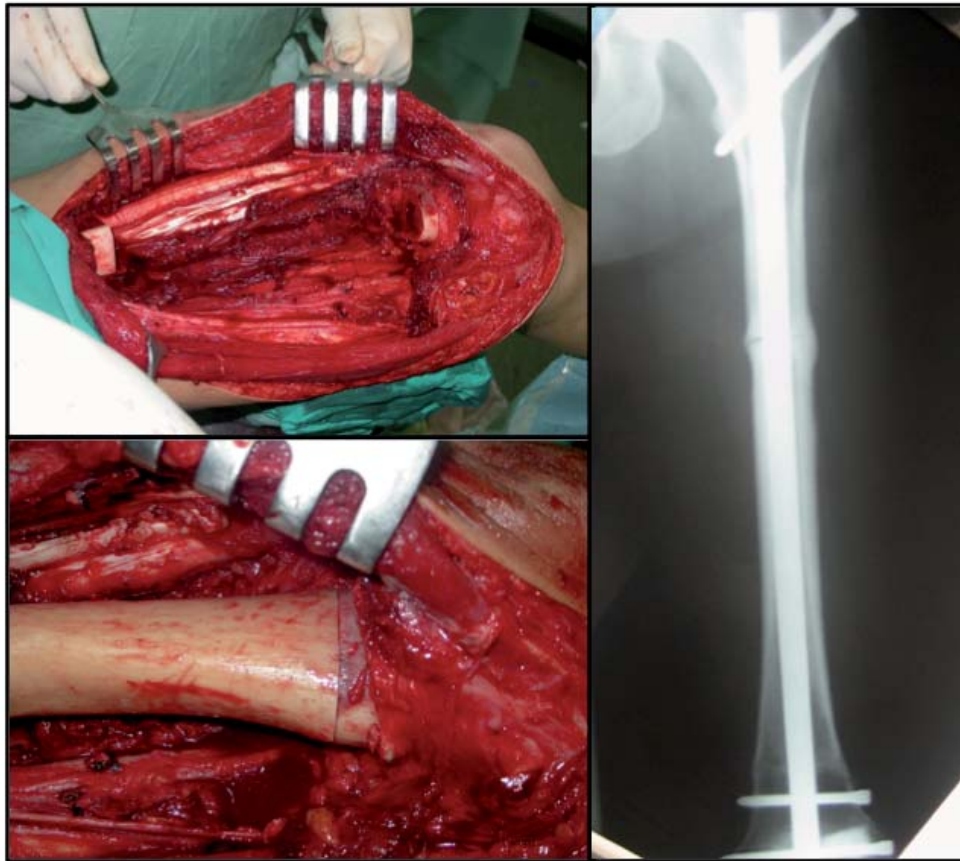


Figura 2. Osteosarcoma diafisario de fémur. Resección amplia y reconstrucción con aloinjerto óseo intercalar y estabilización con clavo endomedular. Puede observarse la congruencia a nivel de la interfase distal entre el aloinjerto y el fémur distal. Consolidación completa al año de seguimiento. Cortesía del Dr. Pérez (Hospital Vall d'Hebron). Cortesía del Dr. Pérez (Hospital Vall d'Hebron).

También en el 2005, Mankin y cols. [66] publicaron un artículo centrándose en el papel que jugaba la infección en los aloinjertos masivos. Recogieron 945 pacientes que habían recibido aloinjertos óseos entre el año 1971 y 2001. La tasa global de éxito fue del 74%. Esta tasa de éxito disminuía hasta el 44% si se producía una fractura del aloinjerto (18% de los casos), y hasta el 61% si se producía una no unión (16% de los casos). La tasa de infección de la cirugía primaria fue del 7.9%, aumentando hasta el 12.8% al tener en cuenta las reintervenciones. Como factores de riesgo de infección se alzaron el estar afecto de un tumor de partes blandas, radioterapia preoperatoria, tumores de alto grado o la asociación de artrodesis. La infección se presentó como una complicación

devastadora, con una tasa de amputación posterior del 25%. También con el objetivo de evaluar la tasa de infección y sus factores de riesgo, Lord y cols. [67] reportaron 283 casos de defectos óseos masivos tratados con aloinjertos (188 osteoarticulares, 47 intercalares, 27 alo-prótesis y 21 alo-artrodesis). Se desarrolló infección en el 11.7% de los casos. En el análisis de factores de riesgo, se evidenciaron diferencias significativas en cirugías extensas (mayor defecto óseo, partes blandas o defecto cutáneo) y tasa de reintervención.

Si nos respaldamos en la bibliografía publicada hasta el momento, entre las causas de no unión tras la cirugía de aloinjertos óseos masivos estarían implicados varios factores, entre los que se incluyen la respuesta inmunológica del huésped al aloinjerto [5]. Aranguren y cols. [68] analizaron la influencia de diversos factores en la consolidación de aloinjertos masivos. De esta manera, se objetivó que el tiempo medio de consolidación de las osteotomías metafisarias fue significativamente menor que las de las diafisarias (6.5 meses vs. 16 meses). Identificaron la edad del receptor, la localización de la osteotomía y el tratamiento con quimioterapia como factores de riesgos. No obstante, sólo encontraron correlación estadística cuando las osteotomías eran diafisarias, no en las metafisarias. No observaron diferencias significativas con el uso de radioterapia, el tipo de osteotomía ni la localización de la reconstrucción. Con el mismo objetivo, Hornicek [69] recogió 945 pacientes intervenidos de aloinjertos masivos, con una tasa de no unión de 17.3%, aún tras tres reintervenciones. Identificó la quimioterapia como un factor de riesgo de no unión (27% vs. 11% en paciente que no habían recibido tratamiento adyuvante), así como asoció la no unión con una tasa superior de infección y fractura del aloinjerto. Estudios experimentales ya habían mostrado previamente el papel de la quimioterapia decreciendo la

formación ósea así como sus efectos prolongados [70,71]. Además, identificó una mayor tendencia a la no unión en pacientes en los que la reconstrucción llevada a cabo era una alo-artrodesis, seguida del aloinjerto intercalar. La alo-prótesis es la que presentó una tasa de no unión más baja.

Uno de los puntos controvertidos cuando se lleva a cabo una reconstrucción de un defecto óseo segmentario con un aloinjerto óseo intercalar es el sistema de fijación. No existe un dispositivo de fijación ideal para los aloinjertos. Con los resultados de las primeras series publicadas, inicialmente se popularizó la fijación con placa en este tipo de reconstrucciones. Vander Griend y Gainesville [11] publicaron en 1994 los resultados de reconstrucciones de defectos óseos con aloinjertos masivos en 120 pacientes (183 interfases huésped-aloinjerto), comparando los resultados obtenidos al usar diferentes dispositivos de fijación interna. En 63 casos se trataba de aloinjertos intercalares, 23 en defectos diafisarios y 40 en alo-artrodesis. Del total de reconstrucciones, el 89% consolidó de forma primaria. En el 90% de los casos que no consolidaron se observó una mala reducción o una fijación inestable. Las fijaciones diafisarias consolidaron más lentamente que las metafisarias, independientemente del método de fijación. No encontraron diferencias en cuanto a la tasa de unión en función si se utilizaba un clavo endomedular o una placa, aunque sí que encontraron relación significativa entre la no unión y el no alcanzar una fijación estable, independientemente del dispositivo utilizado. Los autores destacaban que un contacto óptimo a nivel de las interfases así como una fijación más estable era más fácil de obtener con el uso de placas, aunque también reportaron que existía un aumento significativo de la tasa de fractura del aloinjerto con ellas, lo que sugiere una gran sensibilidad del aloinjerto al estrés mecánico producido por la placa. La mayoría de autores

proponían, por este motivo, la fijación con clavo endomedular en las reconstrucciones de defectos óseos intercalares, aunque advertían de la mayor dificultad en obtener una fijación estable, y, como consecuencia, el posible aumento en la tasa de no unión.

Buecker y cols. [72] compararon la fijación con placa estándar vs. placa bloqueada en reconstrucciones con aloinjertos masivos. El 55.6% de los pacientes en los que se utilizó placa de compresión estándar se alcanzó la consolidación, en comparación al 75% cuando se usó placa bloqueada, con una menor tasa de fractura, sugiriendo las placas bloqueadas como un sistema de fijación óptimo.

El uso de aloinjertos masivos en defectos postraumáticos es menos común en la literatura. En este tipo de defectos se prefieren otro tipo de reconstrucciones, como el transporte óseo, la técnica de membrana inducida, el injerto autólogo no vascularizado o los injertos óseos vascularizados [73]. Jaffe y cols. [74] recogieron pacientes con defectos óseos masivos postraumáticos entre los años 1979 y 1988. De aproximadamente 500 aloinjertos utilizados, sólo 11 eran secundarios a traumatismo (6 por fracturas abiertas y 4 por accidente de tráfico), principalmente en fémur y tibia, con resultados aceptables. McAndrew y Nelson [75] habían reportado años antes 3 casos utilizando también aloinjerto masivo. Los autores coinciden en que, aunque no es un procedimiento recomendado de rutina en esta indicación, puede ser una alternativa en la cirugía de salvamento de extremidad, siempre poniendo especial atención en la planificación preoperatoria, la elección del implante y la esterilidad del campo.

2.2.2. Autoinjerto óseo estructural no vascularizado

El autoinjerto óseo consiste en el trasplante de hueso obtenido de otra región anatómica del mismo individuo. Este injerto posee propiedades osteogénicas, osteoinductivas y osteoconductivas, con una biocompatibilidad completa y sin riesgo de transmisión de enfermedades. En este caso, tanto el huésped como el injerto aporta células osteogénicas [76]. Por todos estos motivos, los autoinjertos son el injerto más favorable para llevar a cabo reconstrucciones de defectos óseos segmentarios. No obstante, no está exento de inconvenientes, entre los que se incluyen la morbilidad de la zona donante (infección, dolor, hemorragia, lesión nerviosa,...), la limitación de volumen del injerto disponible, el aumento del tiempo quirúrgico y la pérdida sanguínea y el coste adicional.

Para la reconstrucción de defectos intercalares, el autoinjerto cortical aporta propiedades mecánicas necesarias de las que el de esponjosa carece, aunque por el contrario su capacidad biológica es menor. Además, en estudios se ha objetivado la reabsorción sustancial de autoinjerto de esponjosa en reconstrucciones de defectos masivos [77,78]. Inicialmente tras la cirugía, el autoinjerto de esponjosa o cortical no vascularizado tienen un comportamiento similar, sin embargo, el grado de revascularización y osteoinducción es distinto [76]. La revascularización se ve obstaculizada por la densa arquitectura del injerto cortical y el escaso número de células endósticas disponibles, a diferencia del injerto de esponjosa. La incorporación se inicia con los osteoclastos, que realizan una reabsorción extensa a las 2 semanas de la cirugía, que va en aumento hasta los 6 meses. Posteriormente, el grado de reabsorción disminuye progresivamente hasta niveles normales al año postquirúrgico. Tanto la revascularización como la

reabsorción se localizan preferiblemente en la periferia de los canales haversianos y las laminillas intersticiales. La reabsorción cesa cuando se alcanza una cavidad central del canal osteonal de suficiente tamaño, aparecen los osteoblastos y empieza a depositarse hueso nuevo. El crecimiento aposicional de hueso se lleva a cabo durante las siguientes tres semanas. El resultado final es la reabsorción completa del injerto y su reemplazo por nuevo hueso viable. En los injertos corticales, este proceso de substitución se lleva a cabo predominantemente a nivel de las interfases entre el injerto y el hueso receptor, y avanza desde los extremos hasta el centro del injerto [79]. A diferencia de los autoinjertos de esponjosa, los corticales se mantienen como una combinación de hueso necrótico y nuevo durante un largo periodo. Tras la remodelación, se puede producir hasta la reducción del 75% de la resistencia mecánica del injerto. Esta debilidad persiste durante meses o años tras la cirugía, en función del tamaño del injerto utilizado. En el autoinjerto cortical vascularizado el proceso de consolidación de las interfases se lleva a cabo como en un hueso normal, por lo que la debilidad residual de la reconstrucción es mucho menor [80].

Enneking y cols. [81] reportaron 40 pacientes con reconstrucciones intercalares con autoinjerto cortical. La consolidación primaria se consiguió en 25 pacientes en una media de 12 meses, sin encontrar relación entre esta y la longitud del injerto. Casi la mitad de los pacientes presentaron fractura del injerto tras conseguir la consolidación, la mayoría asociadas a injertos de gran tamaño, 3 de ellas si llegar a consolidar a pesar de múltiples intervenciones. Objetivaron que la mayoría se producían entre los 6 y los 18 meses, lo cual sugiere una mayor fragilidad del injerto durante este tiempo, que alcanza niveles normales a partir de los dos años. En el estudio histológico evidenció una revascularización precoz, con

una reabsorción inicial asociada a una mayor fragilidad, seguida de una remodelación posterior con la que se producía la consolidación así como la recuperación de la resistencia inicial. Tras este proceso se observó que la mayoría mantenía el tamaño del injerto, algunos se hipertrofiaban y muy pocos se atrofiaban. Más recientemente, Krieg y Hefti [82] publicaron los resultados de reconstrucciones con autoinjerto de peroné no vascularizado en 31 pacientes. Demostraron una actividad biológica en el 70% de los casos, con una hipertrofia de más del 20% en el 40% de las osteotomías. A pesar de lo que cabría esperar, estos datos no difieren mucho de los obtenidos con injertos vascularizados, con tasas de hipertrofia de entre el 37 y 70% [83,84]. La tasa de unión fue del 89%, en una media de 24 semanas. Los injertos remodelaron total o parcialmente en el 69% de los casos, predominantemente en pacientes jóvenes. La tasa de fractura fue del 15%, principalmente en reconstrucciones mayores de 12 cm, y el 16% de los pacientes presentaron complicaciones en la zona donante. En dos de los pacientes que presentaron fractura, se objetivó una formación de callo óseo, demostrando el funcionamiento del injerto como un hueso vascularizado con excelente actividad biológica, como ya había observado Yadav en un estudio previo [85]. En los últimos años se ha publicado un estudio retrospectivo comparando reconstrucciones intercalares con autoinjerto no vascularizado y vascularizado [86], y no se observaron diferencias radiológicas ni funcionales entre los dos grupos. Reportaron tasas de consolidación primaria del 41.5% en el grupo vascularizado, y del 34.0% en el no vascularizado. No obstante, el grupo vascularizado fue más propenso a requerir reintervenciones, principalmente por problemas con la herida quirúrgica con el uso de colgajos miocutáneos asociados.

El uso de los autoinjertos estructurales para la reconstrucción de defectos óseos masivos se ve limitado por el pequeño tamaño del injerto (costilla, cresta ilíaca o peroné). En defectos menores de 10 cm, se ha propuesto el uso de varios autoinjertos estructurales colocados paralelamente sobrepasando la osteotomía 3 cm por cada extremo, y asociados a autoinjerto de esponjosa de cresta ilíaca entre ellos [87]. En los últimos años, dada la limitada disponibilidad de injertos en países asiáticos donde la donación de tejidos no está muy aceptada, han aumentado las publicaciones de autoinjertos reciclados en resecciones tumorales. El hueso extraído es tratado extracorpóreamente mediante criotratamiento con nitrógeno líquido [88][89], autoclave [90], irradiación [91,92], o pasteurizado [93-95], para posteriormente se reimplantados, teniendo como gran ventaja la congruencia perfecta con el defecto así como la compatibilidad biológica con el huésped [96]. Se requiere una integridad estructural del injerto para poderse realizar, consistente en una continuidad axial en al menos tres de las cuatro columnas en las radiografías anteroposterior y lateral, sin adelgazamiento cortical. Las tasas de no unión (4-32%) [94,97], fractura (10-17%) [91,94,98,99], e infección (0-41%) [94,98,100], son comparables a las obtenidas de reconstrucciones intercalares con aloinjertos. Parece, no obstante, que estas difieren según la técnica de desvitalización del aloinjerto. Así, por ejemplo, los resultados reportados con autoinjerto tratado con nitrógeno líquido tienen una menor tasa de complicaciones de aquellos que son pasteurizados [89][94].

En un estudio [101] se compararon los resultados con el uso de autoinjertos pasteurizados con aloinjertos en reconstrucciones intercalares. Los resultados evidenciaron una mayor tasa de no unión en los autoinjertos tratados, aunque no se encontraron diferencias en las tasas de fractura o infección. A pesar de no

encontrar significación estadística, en los resultados se sugería también una mayor supervivencia de los aloinjertos. Estos resultados podrían justificarse por el compromiso microscópico del injerto causado por la hipertermia así como de las propiedades osteoinductivas del hueso, a pesar de lo objetivado en estudios previos [102][103][104]. Comparando reconstrucciones intercalares con autoinjertos irradiados extracorpóreamente con aloinjertos [91], se observó una menor tasa de no unión con el uso de autoinjertos irradiados, pero una mayor tasa de fractura, posiblemente por una destrucción cortical previa por el tumor.

2.2.3. Técnica de membrana inducida (Masquelet)

La técnica de membrana inducida descrita por Masquelet [45] combina una pseudomembrana inducida y autoinjerto de hueso esponjoso. Su indicación es la reconstrucción de defectos segmentarios de huesos largos. Masquelet ha reportado la reconstrucción de defectos de hasta 25 cm [105].

Es un procedimiento que está compuesto de dos fases. En la primera se inserta un espaciador de cemento de polimetilmetacrilato (PMMA) en el defecto que induce la formación de una pseudomembrana a su alrededor. Tras un mínimo de 4 semanas se lleva a cabo la segunda fase, que consiste en la retirada del espaciador de PMMA y el relleno la cavidad que se ha formado con autoinjerto de hueso esponjoso. Esta pseudomembrana neoformada favorece la vascularización y corticalización del injerto protegiéndolo de la reabsorción [106]. Esto se consigue también gracias a la ausencia de células inflamatorias en membranas inducidas por

cemento [107], a diferencia de lo que sucede con las membranas inducidas por silicona [108].

En un estudio experimental que valoraba las características histológicas y biomecánicas de la membrana se demostró que esta estaba ricamente vascularizada, y presentaba altas concentraciones de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y factor de crecimiento transformador B (TGFB) [106]. También se han observado altas concentraciones de BMP-2 en el interior de la membrana con un pico a las 4 semanas [105]. Estos datos sugieren el papel de la pseudomembrana como liberador de factores de crecimiento, estimulando la regeneración ósea.

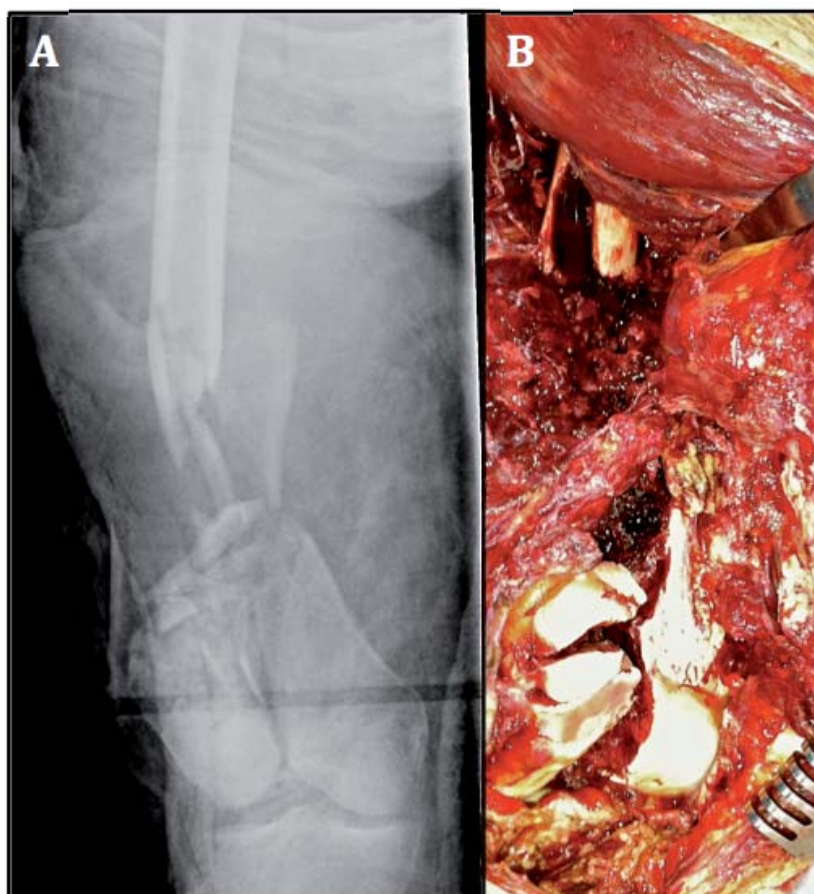


Figura 3. Reconstrucción de defecto intercalar postraumático en fémur distal mediante la técnica de membrana inducida. Imagen radiográfica y fotografía del defecto óseo inicial (A-B). Cortesía del Dr. Corona (Hospital Vall d'Hebron).

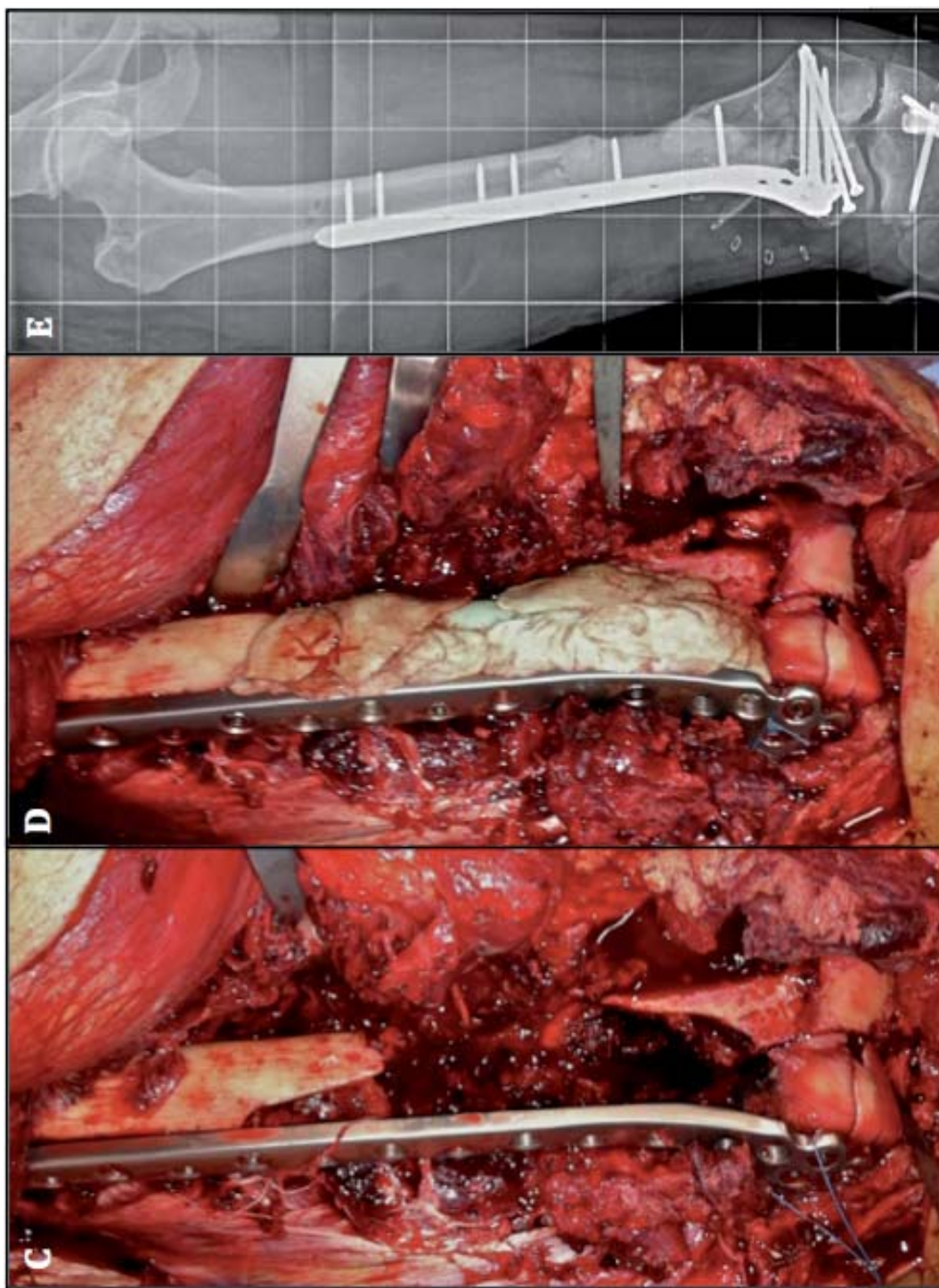


Figura 3 (C-E). Primer tiempo de la técnica de membrana inducida. Estabilización del defecto con una placa y espaciador de cemento. Cortesía del Dr. Corona (Hospital Vall d'Hebron).

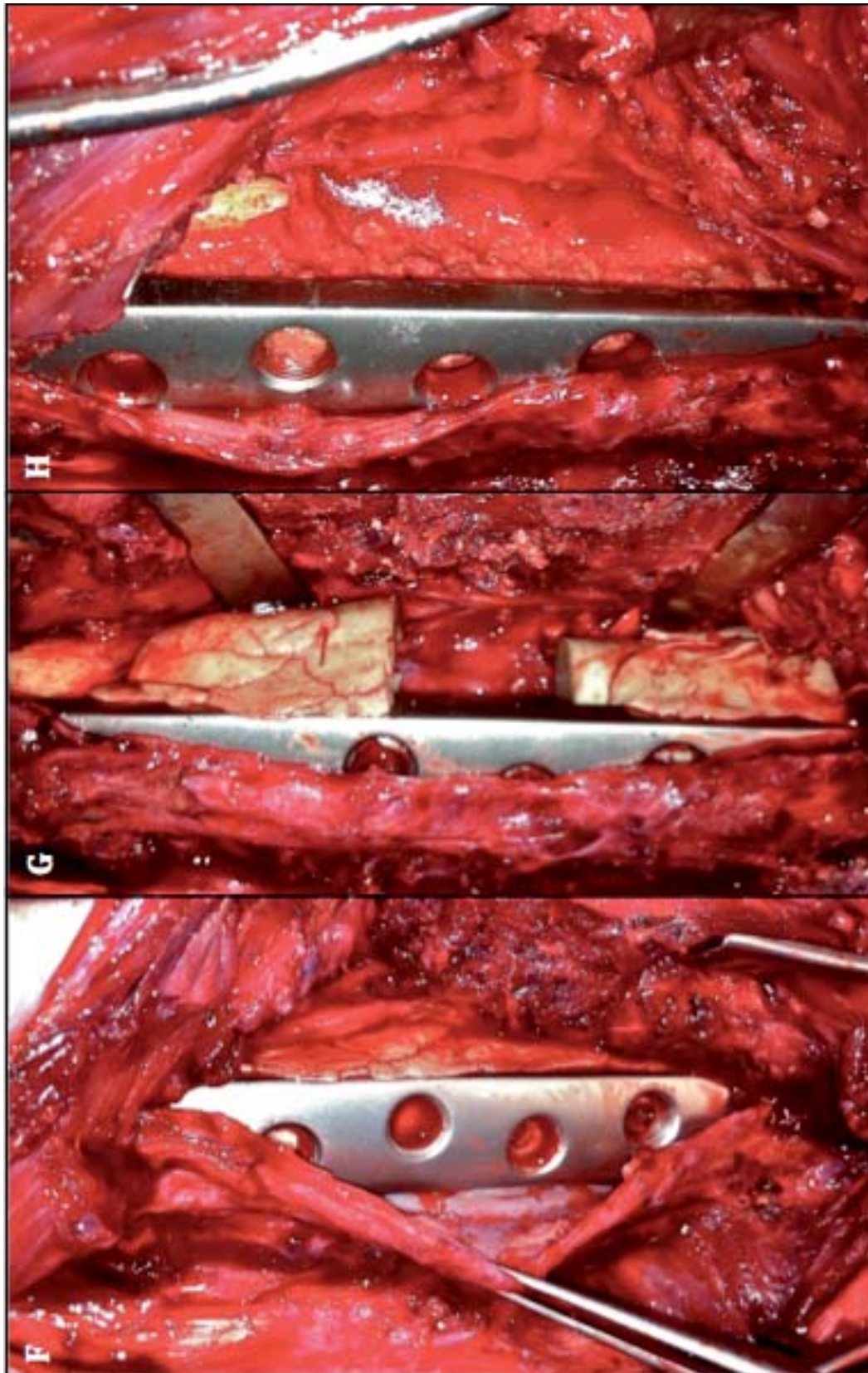


Figura 3 (F-H). Segundo tiempo de la técnica de membrana inducida . Se observa la formación de la pseudomembrana (F). Se retira el espaciador de cemento (G) y se rellena con autoinjerto de hueso esponjoso). Cortesía del Dr. Corona (Hospital Vall d'Hebron).

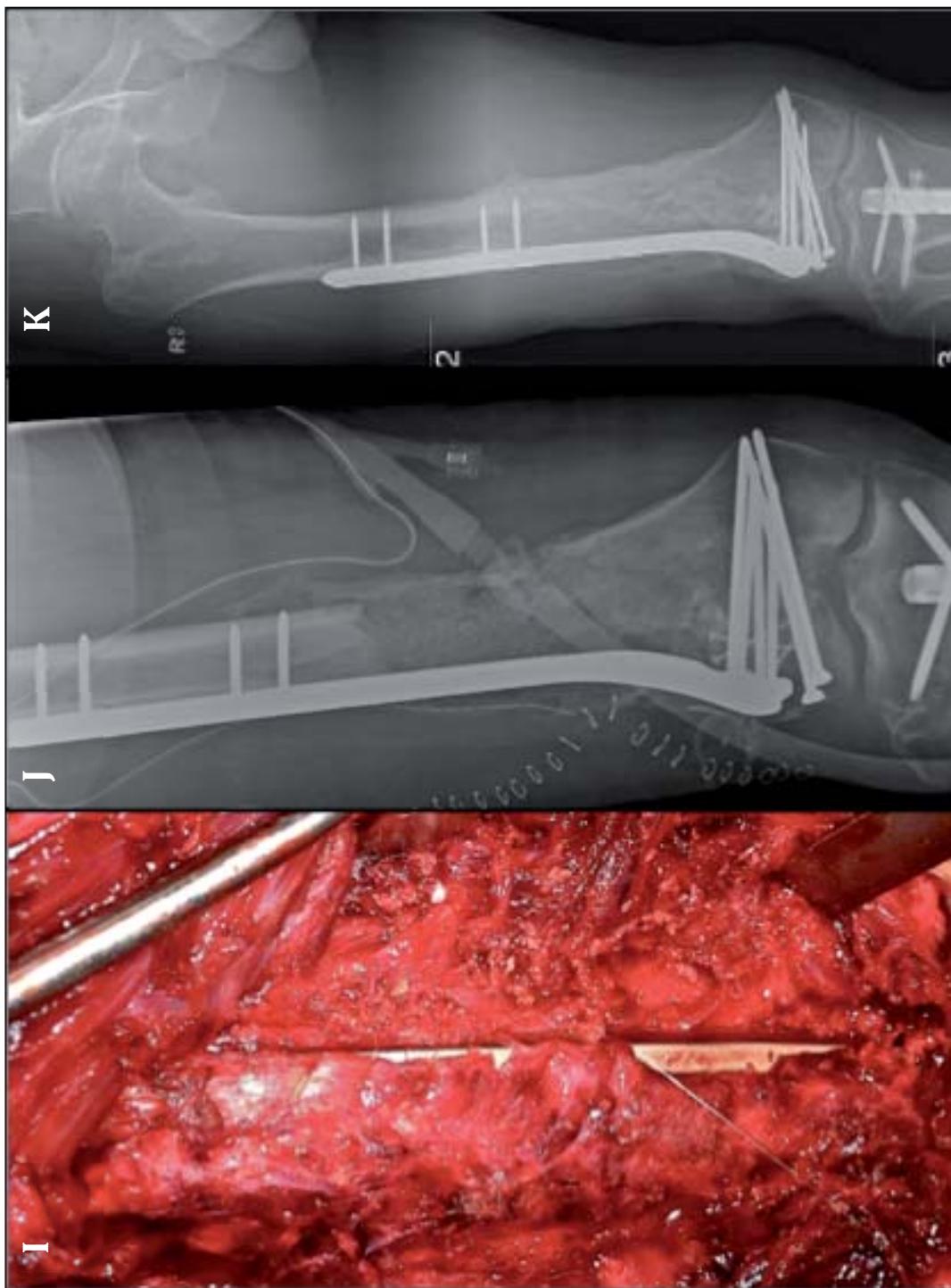


Figura 3 (I-K). Segundo tiempo de la técnica de membrana inducida. Recubrimiento del autoinjerto de esponjosa con la pseudomembrana (I). Radiografías en el postoperatorio inmediato (J) y a las 9 semanas postoperatorias (K), observándose una consolidación completa del defecto. Cortesía del Dr. Corona (Hospital Vall d'Hebron).

El objetivo del espaciador de PMMA es mecánico, evitando la invasión del defecto por tejido fibroso, y biológico, induciendo la formación de la membrana que aportará la vascularización al injerto óseo posteriormente [109].

Una de las ventajas de este tipo de reconstrucción es que el tiempo de curación es independiente de la longitud del defecto. Además, técnicamente no es muy demandante, no requiriendo procedimientos microquirúrgicos. Los tiempos quirúrgicos son menores que otras técnicas como el peroné vascularizado o la técnica de Capanna [110]. En estudios publicados, a diferencia de reconstrucciones masivas con aloinjerto óseo o colgajo de peroné vascularizado, encontraron tasas de infección menores, de entre 0-8% [105,110–113], lo que relacionaban con un tiempo quirúrgico menor así como con el uso de espaciadores de cemento con antibiótico [114,115]. Las fracturas se han reportado hasta los 2 años tras la intervención [105,113], previamente a la completa corticalización del hueso neoformado. Además, con la técnica de Masquelet se disminuían considerablemente el tiempo de descarga de la extremidad (8.5 meses [45], 3 en pacientes pediátricos [110]), en comparación con el aloinjerto (12 meses [5,116]) y el colgajo de peroné vascularizado (5 meses [117]). En el primer trabajo que publicó sobre esta técnica [45], Masquelet reportó una tasa de consolidación del 100% en los 35 pacientes intervenidos. Según los autores, esta era independiente de la longitud del defecto óseo reconstruido. Resultados similares se reportaron en estudios posteriores [111–113]. Los resultados no fueron tan favorables en un estudio en pacientes en edad pediátrica donde la fijación con clavo endomedular o placas se ve limitada, reportando tasas de no unión en más del 90% de los casos, todas tratadas exitosamente mediante reintervenciones con nuevo aporte de

injerto [110]. En el mismo estudio reportaban una tasa de fractura del regenerado del 33%, la mayoría en los primeros 2 años postoperatorios.

Entre las desventajas de esta técnica encontramos la limitación de volumen de autoinjerto óseo. En los últimos años se recomienda obtener el autoinjerto intramedular del fémur mediante el sistema RIA (Reamer-Irrigator-Aspirator; Synthes, Westchester, PA), obteniendo volúmenes de hasta 80mL de cada fémur con una menor tasa de complicaciones en comparación a la obtención de injerto de cresta ilíaca [112,118,119]. Por otra parte, el hueso neoformado tiene menor resistencia a la torsión y flexión que otro tipo de reconstrucciones. Además, al tratarse de una reconstrucción en dos tiempos, se asocian los riesgos derivados de dos procedimientos anestésicos así como de la hospitalización, aunque en casos oncológicos podría tener su ventaja al poder demorar el segundo tiempo evitando así los efectos adversos de la quimioterapia [69].

2.2.4. Osteogénesis por distracción (Transporte óseo)

La osteogénesis por distracción se define como la técnica de formación ósea *de novo* entre los extremos de las superficies de una corticotomía a través de una distracción progresiva del callo óseo [120]. El transporte óseo implica movilizar un segmento libre de hueso vivo, previamente corticotomizado, para rellenar defectos óseos segmentarios con hueso viable, permitiendo reconstruir grandes defectos de huesos largos. Es un método poco invasivo que permite tratar defectos metafisarios y diafisarios tanto de extremidades superiores o inferiores.

Este tipo de reconstrucción requiere del uso de un fijador externo que permita la movilización del segmento óseo transportado y aporte estabilidad al montaje. Clásicamente se había usado el fijador externo circular de diseñado por Ilizarov, que permite controlar todos los planos de movimiento, corrigiendo cualquier deformidad que se presente durante el proceso [120]. En los últimos años se ha impuesto como alternativa el fijador externo monolateral con pines de hidroxiapatita, disminuyendo gracias a esta incorporación la tasa de infección y aflojamiento de los pines [121]. La gran ventaja de este tipo de fijador es la posibilidad de un mejor manejo de defectos de partes blandas, que es más dificultosa con el uso de fijadores externos circulares. Además, se puede combinar con un clavo endomedular (Figura 4), adicionando estabilidad al montaje durante las fases de regeneración y consolidación, asegurando así una correcta alineación al final de la reconstrucción y permitiendo la carga precoz [122,123].

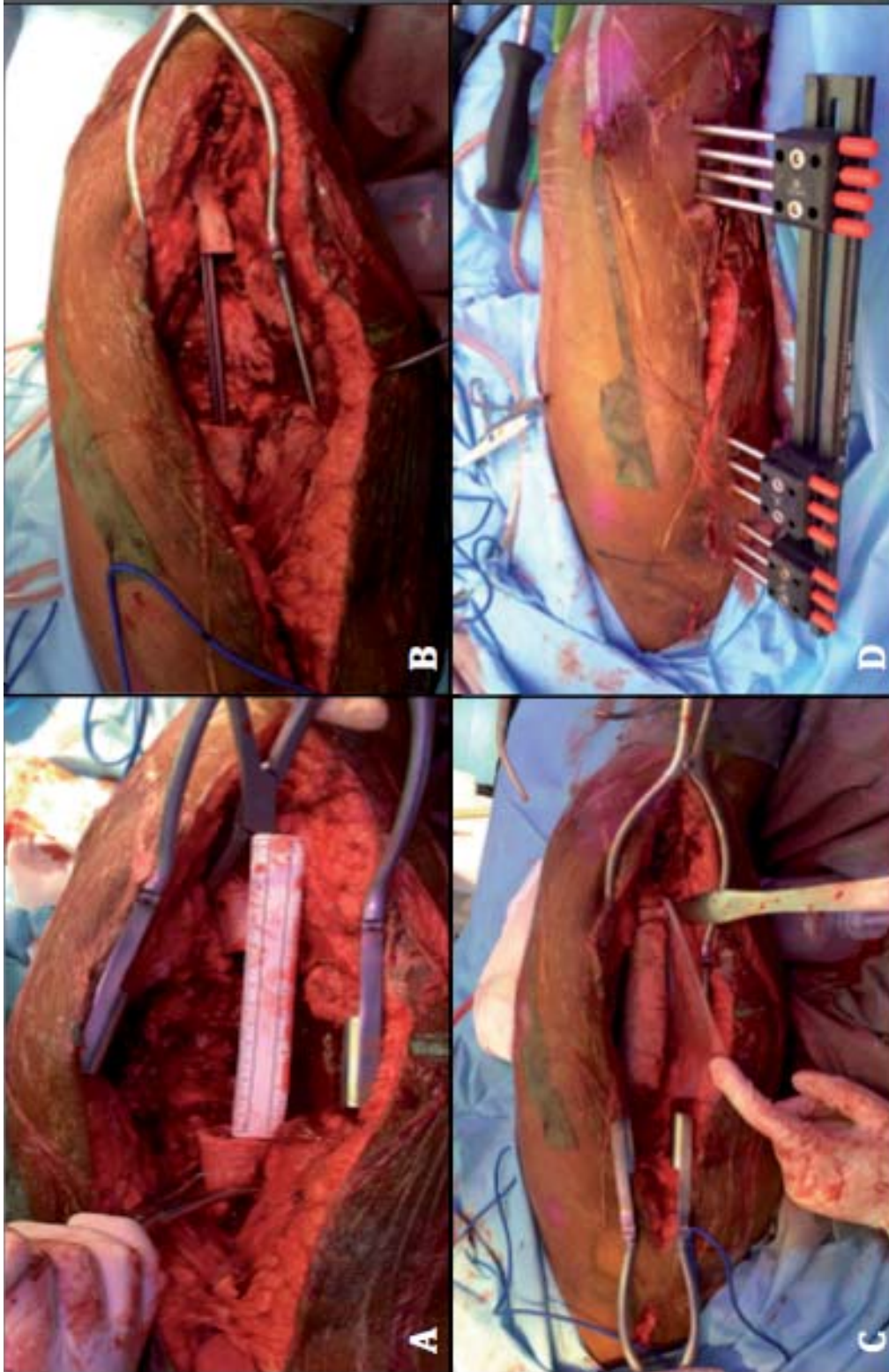


Figura 4. Reconstrucción de defecto óseo intercalar de fémur por osteítis crónica mediante transporte óseo sobre clavo. Tras el desbridamiento del tejido séptico (A), se procede a la estabilización del defecto con un clavo endomedular (B) y posteriormente se rellena el defecto óseo con cemento. Para finalizar se coloca el fijador externo preparado para transporte óseo. Cortesía del Dr. Corona (Hospital Vall d'Hebron).

El proceso está compuesto por tres etapas. En primer lugar un periodo de latencia tras la corticotomía de 7 días, en el cual el hematoma se organiza para que se forme el callo óseo antes de iniciar la distracción. En segundo lugar, un periodo durante el cual se realiza la distracción a una velocidad de 1 mm al día a un ritmo de 0.25 mm cada 6 horas. La duración de esta etapa dependerá de la longitud del defecto óseo a reconstruir. Por último, una fase de consolidación. Esta fase es la más larga del proceso, durante la cual se forman puentes óseos en el hueso neoformado y se corticaliza [124] (Figura 5). Es necesario mantener el fijador externo hasta asegurar la estabilidad biomecánica de la reconstrucción.

Los tiempos de curación dependen de varios factores como la edad del paciente o comorbilidades que presente, la longitud del defecto óseo y el número de corticotomías, disminuyendo el tiempo de reconstrucción si se realizan dos niveles de corticotomía en vez de uno [125]. Por otra parte, se ha evidenciado que la neoformación ósea no se ve afectada por tratamientos quimioterápicos adyuvantes [126][127][128][129].

Además de la osteogénesis por distracción, algunos autores han reportado la reconstrucción simultánea de defectos de partes blandas mediante la expansión cutáneo por un proceso de histogénesis por distracción, similar al de osteogénesis [130][131].

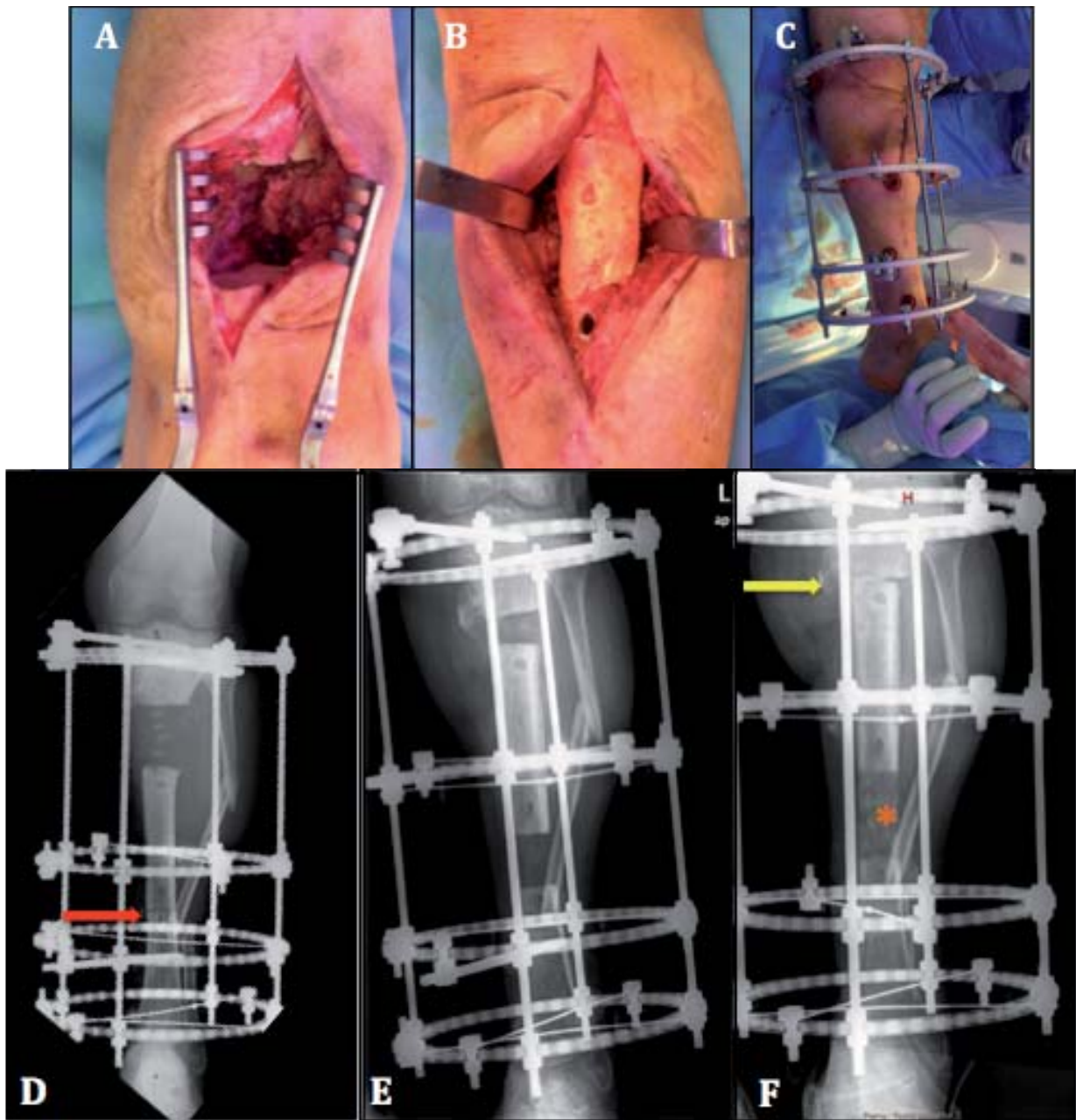


Figura 5. Reconstrucción de defecto intercalar en tibia proximal tras osteítis crónica mediante transporte óseo con fijador externo circular. Tras el desbridamiento del tejido séptico (A), se procede a rellenarlo con cemento (B) y la colocación del fijador externo preparado para transporte óseo (C). En las imágenes D-F se observan las radiografías de las diferentes etapas del tratamiento. Podemos observar la corticotomía al inicio del transporte (flecha roja), y la formación del regenerado óseo (*) una vez se ha finalizado el tratamiento y el hueso transportado ha entrado en contacto con el punto de atraque (Flecha amarilla). Cortesía del Dr. Corona (Hospital Vall d'Hebron).

Knothe y cols. [132] describieron en 2005 una técnica novedosa de transporte óseo en un tiempo, que consistía transportar un segmento óseo diafisario sano al defecto óseo adyacente en el mismo hueso a lo largo de un clavo endomedular, manteniendo su periostio y las partes blandas adheridas a éste en el lugar de origen. Esta técnica la validaron más tarde en un estudio preclínico, observando hueso neoformado puenteando el defecto a las 16 semanas en todas las ovejas del grupo experimental [133].

A pesar de ser una buena alternativa para la reconstrucción de grandes defectos segmentarios con buenos resultados, el gran inconveniente es la larga duración del tratamiento, convirtiéndose en una técnica demandante tanto para el cirujano como para el paciente. La colaboración del paciente es uno de los aspectos indispensables de este tipo de tratamiento. Complicaciones como infecciones de los pines, roturas de estos, aflojamiento por el excesivo estrés local, contractura de las articulaciones adyacentes y dolor durante el transporte no son infrecuentes [120]. Además, habitualmente requiere del aporte de autoinjerto en el punto de atraque para conseguir la consolidación final [134–136].



Figura 6. Intolerancia de los pines del fijador externo durante un procedimiento de transporte óseo en tibia. Cortesía del Dr. Corona (Hospital Vall d'Hebron).

2.2.5. Colgajo óseo vascularizado. Peroné vascularizado

Los colgajos óseos vascularizados libres fueron descritos en el años 1975 por Taylor y colaboradores, en el tratamiento de defectos óseos mayores de 6 cm [137,138]. Su indicación principal es la reconstrucción de defectos intercalares de extremidades superiores [139,140]. En la literatura encontramos varias localizaciones para obtener el injerto, como son la costilla [141–145], la cresta ilíaca [146], la escápula [146], y el peroné [147–150]. También se puede utilizar en quimera, con piel o músculo asociado al peroné (p.ej. *latissimus dorsi* o *serratus anterior* en colgajos de costilla vascularizado [151,152]). El colgajo de peroné vascularizado es el preferido para la reconstrucción de defectos óseos segmentarios de huesos largos, por su mejor adaptabilidad al carecer de la curvatura característica de otros huesos [147,148,153–155]. Los colgajos de costilla o cresta ilíaca no ofrecen la resistencia, la longitud, la configuración ni la posibilidad de osteotomías del peroné vascularizado. Además, la morbilidad de la zona donante es menor en el caso de este último [156].

Las propiedades biológicas que le aporta la vascularización a este tipo de colgajo lo capacita de propiedades osteogénicas, que se traduce en una menor tasa de no unión y reabsorción, así como mecánicas, confiriéndole mayor resistencia en comparación a aloinjertos convencionales [157–159]. Por otra parte, los colgajos óseos vascularizados, con una mayor vascularización, serían teóricamente más resistentes a la infección, y favorecerían la penetración de los antibióticos así como la respuesta inmune [2,160]. La longitud del colgajo debe ser 4 cm mayor al defecto que queremos reconstruir, para que esté sobredimensionado 2 cm a nivel de las osteotomías proximal y distal favoreciendo la consolidación de éstas [73]. El

tiempo medio de unión oscila entre los 3 y 6 meses [161–163]. En reconstrucciones postraumáticas, se ha reportado una tasa de consolidación de hasta el 90% con esta técnica [161].

Una de las series más largas de reconstrucción de defectos con peroné vascularizado que encontramos actualmente en la literatura es la publicada por Hilven y cols. [164]. Se trata de un estudio multicéntrico en el que se incluyeron 74 pacientes. Reportaron una tasa de unión del 81%, en un tiempo medio de 28 semanas en extremidades superiores y 44 en inferiores. A pesar de las complicaciones presentadas, entre las que destacan un 15% de fractura, un 4% de infecciones y una tasa de reintervención del 35%, la tasa de éxito final fue del 93%. Destacaron una hipertrofia del colgajo en el 94% de los casos, más frecuente en extremidades superiores (100% vs. 86%), aunque al realizar el análisis estadístico sólo relacionaron un mayor tamaño del defecto con una menor hipertrofia. Las diferencias en cuanto a la hipertrofia en función de la localización del defecto se explicaría por el mayor tiempo de restricción de la movilidad en las extremidades inferiores [83]. Campanacci y cols. [147] reportaron los resultados de uso de esta técnica en reintervenciones como tratamiento de salvamento en reconstrucciones intercalares que habían fracasado previamente. En el 83% de los pacientes se obtuvo la consolidación de las dos osteotomías, con una funcionalidad del 90% al final del seguimiento.

Con el uso de colgajo de peroné vascularizado se han conseguido reconstrucciones de hasta 25 cm de hueso cortical en defectos tras resecciones tumorales [155]. Además, permite reconstrucciones de huesos de gran tamaño al poderse dividir el colgajo en dos o tres fragmentos preservando el pedículo vascular [165]. Así, este colgajo se ha utilizado en múltiples cirugías

reconstructivas con diferentes conformaciones. Puede usarse de forma aislada, en reconstrucciones de húmero; en doble-cañón (*double-barrel fibula flap*), en reconstrucciones femorales; o combinado con aloinjerto (técnica de Capanna), confiriéndole una mayor resistencia en huesos de carga [166].

A pesar de sus múltiples ventajas y que permite reducir las complicaciones a nivel de la zona del defecto, la morbilidad de la zona donante no es despreciable, reportándose una tasa de 19% de complicaciones en la zona donante en una serie de 247 casos [167]. Entre otras, complicaciones como parálisis temporales del nervio peroneo común, contractura del *flexor hallucis longus*, deformidad en valgo del tobillo, disminución de fuerza a nivel del tobillo o síndrome compartimental han sido descritas [22]. Además, cuando el objetivo es la reconstrucción en una extremidad de carga, el colgajo es sometido a una mayor exigencia mecánica, con una tasa de fractura de entre 30-40%, la mayoría durante el primer año postoperatorio, a pesar de alcanzar la consolidación en la mayoría de los casos [168,169]. Por este motivo, algunos autores han propuesto que la reconstrucción debe ser protegida durante el primer año, aunque la carga sobre la extremidad debe ser aumentada progresivamente para mejorar la remodelación y la hipertrofia del injerto [84]. Esta protección se puede conseguir mediante un sistema de fijación interna o externa [170], lo cual permite mantener la alineación y controlar la transmisión de fuerzas a través del injerto, lo que disminuye la posibilidad de fractura de éste. Finalmente, no se puede obviar que este tipo de reconstrucción es técnicamente más demandante que otras, requiriendo procedimientos microvasculares [161].

Técnica de Capanna

Capanna y colaboradores describieron en el año 1993 [14] una nueva técnica que combinaba un injerto de peroné vascularizado con un aloinjerto convencional para la reconstrucción de grandes defectos diafisarios. A pesar de que se conocía la hipertrofia progresiva del peroné transferido cuando se realizaba un colgajo de peroné vascularizado de forma aislada, y con ello su aumento de resistencia, la tasa de fractura durante el primer año no era despreciable, y tenía como consecuencia largos periodos de inmovilización. El objetivo de usar estas dos técnicas reconstructivas conjuntamente fue combinar las propiedades mecánicas del aloinjerto con la actividad biológica del peroné vascularizado, explotando así las ventajas de cada una de ellas. Gracias a esta última, se conseguía una más rápida consolidación de las osteotomías [171]. El colgajo de peroné vascularizado además de experimentar una hipertrofia progresiva, se ha descrito que promueve la osteointegración y revascularización del segmento diafisario del aloinjerto [169], que se mantiene avascular en reconstrucciones con aloinjerto intercalar aislado, representando la zona de menor resistencia y con mayor riesgo de fractura [4,56,172]. Se han descrito dos diseños de reconstrucción. El primero, preferido por la mayoría de autores, consiste en colocar el colgajo de peroné en el canal medular del aloinjerto (técnica intramedular [6,169,173]) (Figura 7); y el segundo coloca el peroné externamente paralelo al aloinjerto (*técnica onlay* [171]), y está indicada principalmente en la reparación de no uniones de aloinjertos.

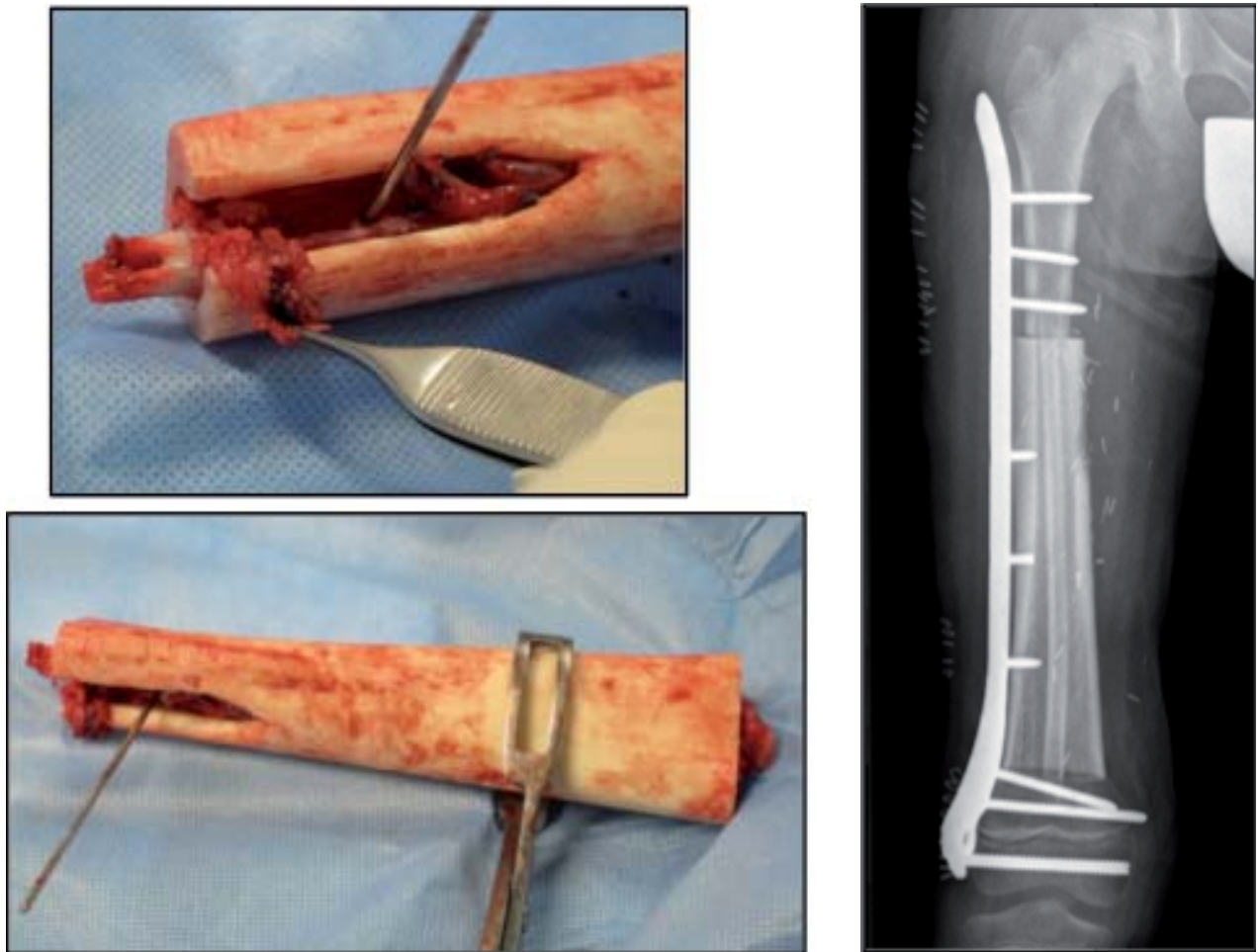


Figura 7. Técnica de Capanna. Preparación de constructo de aloinjerto óseo estructural con colgajo de peroné vascularizado endomedular. Cortesía del Dr. Vélez (Hospital Vall d'Hebron).

Los resultados reportados con esta técnica reconstructiva son muy favorables. Chang y Weber [171] reportaron una tasa de 100% de consolidación en un tiempo medio de 6 meses en los 6 casos intervenidos. Li y cols. [174] obtuvieron resultados similares, con una tasa de consolidación del 91% en una media de 5.4 meses en la unión peroné-huésped y 11.8 meses en la interfase aloinjerto-huésped, sin ninguna fractura ni infección del aloinjerto. En la población

pediátrica, la asociación de estas dos técnicas ha resultado en la disminución del riesgo de no unión desde el 34% al 8.8% [33,175–177].

En los últimos años, se han publicado estudios en los que utilizan autoinjerto desvitalizado en vez de aloinjerto en este tipo de reconstrucciones [97,171,178,179]. Shigura y cols. [97] consiguieron una tasa de consolidación del 87% en un tiempo medio de 13.5 meses tras la reconstrucción de un defecto intercalar mediante la asociación de peroné vascularizado y autoinjerto pasteurizado. Krieg y cols. [178] reportaron 13 casos con el autoinjerto irradiado extracorpóreamente, con una tasa de no unión del 16%, en un tiempo de 7.5 meses en osteotomías metafisarias y 11.1 meses en diafisarias. Ogura y cols. [180] fueron los primeros en utilizar esta técnica con autoinjerto tratado con crioterapia. Reportaron 11 casos usando esta técnica (6 tratados mediante pasteurización y 5 crioterapia) en defectos tras resección tumoral en extremidades inferiores. Tuvieron una tasa de consolidación del 91%, con un 27% de complicaciones postoperatorias, comparable a estudios previos [97,178]. A pesar de la muestra insuficiente para obtener resultados significativos, sugerían mejores resultados con autoinjerto criotratado dada la probable consolidación más precoz.

2.2.6. Colgajo perióstico vascularizado

Tal como evaluó Enneking [4], la consolidación de las interfases se consigue gracias a la osteogénesis derivada del hueso y periostio huésped. Toda la actividad reparativa parece ocurrir a este nivel, con una mínima neoformación ósea a lo largo de la diáfisis del aloinjerto. Se cree entonces que la no unión de los

aloinjertos intercalares es el resultado de un contacto insuficiente de estos con el tejido osteogénico a nivel de la interfase. En esta línea, asociar tejido con propiedades osteogénica y angiogénica añadiendo otros gestos quirúrgicos podría mejorar los resultados [181]. Los métodos para prevenir y tratar la no unión de las interfases aloinjerto-hueso huésped son un tema recurrente en la literatura [182].

Los colgajos periósticos vascularizados fueron introducidos por primera vez por Finley y colaboradores en 1978 [183]. Su vascularización se basa en la circulación perióstica ósea. Está conformado por dos capas: una más externa que contiene fibroblastos y fibras de Sharpey, y otra capa más profunda. La capa más profunda del colgajo, la denominada *cambium*, rica en células madre mesenquimales, tapiza el aloinjerto y potencia la consolidación de las osteotomías [183–187]. Existe controversia en cuanto al tipo de osificación mediante el cual se lleva a cabo el proceso reparativo. Algunos autores abogan por una osificación endocondral [188,189] y otros por una osificación intramembranosa [185]. En estudios experimentales se ha observado que cuando se retira el periostio de un autoinjerto en reconstrucciones de defectos masivos, la formación ósea del injerto se reduce entre un 63 y 73%, similar a un aloinjerto, así como una reducción del 75% del número de osteoclastos, lo que se correlaciona con la escasa capacidad de remodelación [54,190]. Además, se ha sugerido que posee capacidad de revascularización [191], y teóricamente cabría esperar que su estado vascular previniera de la infección local, aunque este punto no ha sido estudiado. Todo ello sin provocar una desestructuración de la zona donante debido a que únicamente se levanta un colgajo perióstico, preservando la reserva ósea subyacente y su circulación endóstica.

Diversos estudios se han llevado a cabo en periostio para evaluar su capacidad osteogénica [188,192–194]. Se ha evidenciado que dicha capacidad está directamente relacionada con su vascularización [195,196]. A pesar de que un colgajo perióstico no vascularizado es capaz de producir hueso [197], algunos autores han sugerido que dicha capacidad es mejor si se encuentra en un lecho vascularizado [193]. Ortak y colaboradores demostraron que el colgajo perióstico vascularizado mostraba actividad osteogénica a partir del séptimo día tras la intervención [185,198]. Por otra parte, se ha visto que no es necesario el contacto del periostio con el hueso para que exista actividad osteogénica. Son varios los estudios que han evidenciado neoformación ósea con colgajos periósticos vascularizados sin tejido óseo a su alrededor, a pesar de que aparentemente esta es mejor cuando este está presente [193,195,196,199]. Incluso cuando se asocia con injerto de esponjosa es capaz de neoformar hueso cortical con escasa reabsorción del injerto inicial [200].

Como se ha mencionado previamente, la capa osteogénica del periostio es la más profunda, en contacto con el hueso. Este hecho hace que el uso de un colgajo periostio de forma aislada pueda tener algunas controversias, ya que dicha capa podría verse dañada al levantar el colgajo si no se realiza de forma cuidadosa. Por este motivo Sakai y cols. [201] describieron un colgajo corticoperióstico de cóndilo femoral medial, que mantenía la capa más externa de la cortical del cóndilo y garantizaba así la preservación del *cambium* del periostio y sus propiedades en comparación a un colgajo perióstico aislado. Esta técnica se ha usado para el tratamiento de no uniones en adultos con excelentes resultados. No obstante no estaría indicada en niños por la presencia de la fisis de crecimiento [181,191]. Su

éxito ha sido confirmado en el tratamiento de no uniones recalcitrantes, con una tasa de consolidación primaria de entre el 73% y el 91% de los casos [202–204].

En comparación con el colgajo óseo vascularizado, en el que el potencial osteogénico está sólo en los extremos, el colgajo perióstico aporta una mayor área de contacto entre el *cambium* con sus células osteogénicas y la zona de no unión, y promueve una mayor revascularización y consolidación ósea [187]. Además, la flexibilidad de este tipo de colgajos permite que pueda ser moldeado alrededor de huesos tubulares a nivel del defecto que queremos tratar [204].

En estudios anatómicos en humanos, se han descrito colgajos periósticos vascularizados de cresta ilíaca, peroné, escápula, húmero distal, radio distal, cúbito, segundo metacarpiano y hueso timporo-parietal [205–209]. El uso de colgajos periósticos vascularizados en la práctica clínica ortopédica es una técnica en progresivo aumento en los últimos años. Actualmente, la mayoría de los casos los encontramos en niños, dado que la capacidad osteogénica así como el grosor del periostio disminuye con la edad, y, por lo tanto, es técnicamente más sencillo su levantamiento sin dañarlo [187,210]. Inicialmente se trataba de colgajos locales pediculados. Qi y cols. [211] describieron colgajo de periostio de trocánter mayor para el tratamiento adyuvante de fracturas cervicales de fémur en pacientes pediátricos, previniendo la necrosis de la cabeza femoral. Trigui y cols. [212] usaron un colgajo de periostio de peroné pediculado para el tratamiento de pseudoartrosis congénitas de peroné. Por su parte, Soldado y cols. [213] describieron un colgajo perióstico pediculado de primer metatarsiano para el prevenir el colapso de una osteonecrosis de calcáneo en un niño, consiguiéndose una revascularización ósea así como la deambulaci3n con carga a los 2 meses de la intervenci3n Los mismos autores [214] usaron un colgajo perióstico de tibia

descrito previamente en estudios anatómicos [215], pediculándolo para tratar una pseudoartrosis supracondílea de fémur y de tibia. Se trataba de dos casos pediátricos con no uniones complejas. Los resultados obtenidos fueron excelentes, mostrando una osificación completa del callo perióstico así como una consolidación de la no unión a los 2 y 3.5 meses tras la intervención respectivamente, sugiriendo una capacidad osteogénica mayor que la del periostio de peroné.

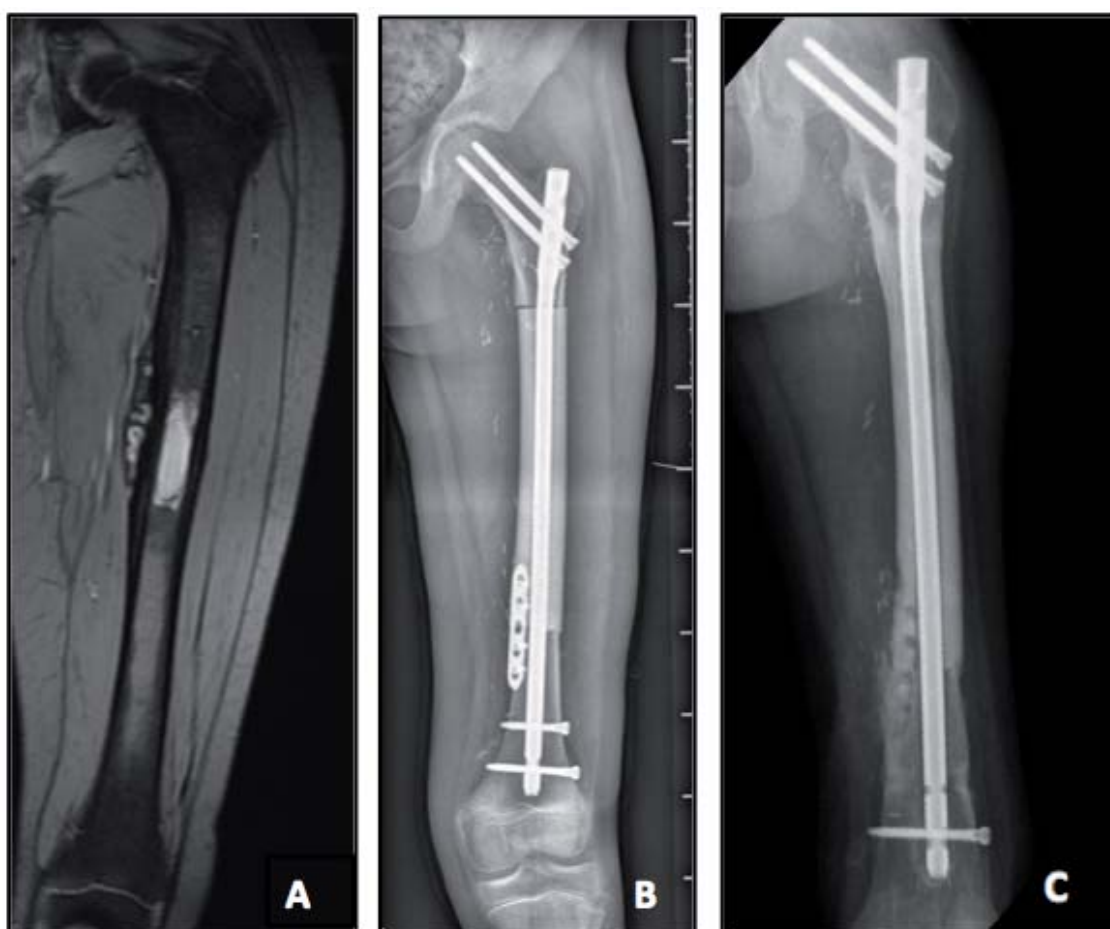


Figura 8. Evolución radiológica de paciente con sarcoma de Ewing en fémur izquierdo. Se realizó una resección en bloque y reconstrucción con aloinjerto intercalar y periostio vascularizado (B). La imagen C se corresponde con la radiografía de control actual, tras retirar la placa distal y dinamizar el clavo por no consolidación de la osteotomía distal. Actualmente se observa una consolidación completa de ambas interfases. Cortesía del Dr. Vélez (Hospital Vall d'Hebron).

El uso del periostio como colgajo libre fue reportado por primera vez por Satoh y cols en el año 1983 [216], que transfirió un colgajo musculo-perióstico de ilíaco a tibia para el tratamiento de una fractura abierta. Desde entonces, son escasas las publicaciones al respecto, aunque con buenos resultados que ratificaban su capacidad osteogénica [217–220]. En los últimos años, vuelven a estar en auge desde que Soldado y cols describieron el colgajo perióstico vascularizado libre de peroné en el 2012 [187], la primera publicación de colgajos periósticos libres en la niños. Su uso se destinó a la prevención de no uniones del aloinjerto en reconstrucciones de grandes defectos y tratamiento de pseudoartrosis complejas. Su aplicabilidad en la edad pediátrica, al contrario de lo que sucedía con el colgajo corticoperióstico descrito por Sakai, constituía una de las ventajas de esta técnica. En la publicación recogían 13 casos de niños tratados con esta técnica, en 9 casos libre y en 4 pediculado a tibia ipsilateral. El tamaño del colgajo oscilaba entre los 11.5 y 16.4 cm, significativamente superior a los 6 cm del colgajo corticoperióstico. Se objetivó callo óseo palpable a las 2-3 semanas postoperatorias, y los estudios radiográficos mostraron osificación en todos los casos excepto uno a las 4 semanas. En este caso ya se había observado una interrupción del flujo arterial con el estudio mediante ECO-doppler en el postoperatorio inmediato, y a los 14 meses tras la intervención fue rescatado con otro colgajo perióstico del peroné contralateral con éxito. Algunos autores [15–17,221] han publicado una modificación de la técnica del trasplante de peroné vascularizado añadiendo un faldón perióstico en el extremo distal del colgajo con el objetivo de aprovechar sus propiedades para estimular la osteo y angiogénesis, mostrando una reducción del tiempo de consolidación de la interfase aloinjerto-huésped respecto al colgajo de peroné convencional (8.4 semanas [16] vs 3.5-9

meses de media que están reportados en casos pediátricos [222][175]). El grupo de Soldado [18] describió el primer colgajo perióstico libre de tibia para el tratamiento de un caso de no unión recalcitrante con acortamiento de 6 cm, consiguiendo la consolidación a los 5.5 meses de la intervención y una disimetría residual de 2 cm. Como ventaja respecto al colgajo descrito por Sakai cuya superficie no suele superar los 35 cm² [201], la superficie del colgajo fue de 60 cm². Además, se autorizó la carga a partir de las dos semanas tras la intervención, a diferencia del protocolo postoperatorio cuando se opta por un peroné vascularizado, donde se protege la carga durante meses [222]. Esta técnica reconstructiva también se ha aplicado en el tratamiento de pseudoartrosis congénita de tibia [19], consiguiendo resultados excelentes con una consolidación completa a los tres meses de la cirugía, sin la alta tasa de fracturas que se encuentra con otros tratamientos, la cual se asocia al reemplazo de dos tercios del periostio patológico durante la intervención [223].

A pesar de que la capacidad osteogénica del periostio vascularizado está claramente establecida, todavía quedan muchos aspectos en cuanto a su papel como colgajo que están sin resolver. Como hemos explicado, encontramos literatura muy limitada al respecto, principalmente resumiéndose en cortas series clínicas. No hemos hallado ningún estudio comparativo que estudie el papel de los colgajos periósticos vascularizados en reconstrucciones de defectos óseos segmentarios asociados a un aloinjerto óseo, y de como intervienen en la consolidación de las osteotomías y la revitalización de éste.

En la Tabla 3 se recogen las características de cada técnica de reconstrucción de defectos óseos masivos descritos previamente.

	Indicaciones	Ventajas	Inconvenientes	Complicaciones
Aloinjerto óseo intercalar	- Resección tumoral. - Defecto postraumático. - Defectos hasta 26 cm.	- Recuperación del stock óseo. - Injerto de banco de tejidos. - Propiedades mecánicas.	- Supervivencia 75% a los 5 años. - Tiempo consolidación osteotomías diafisarias 16 meses, metafisarias 6.5 meses. - 20-30% Revitalización. - Sólo osteoconductor. - 12 meses de descarga.	- No unión 12-57%. - Fractura aloinjerto 7-30%. - Infección 5-21%. - ++ <3 años de seguimiento.
Autoinjerto óseo estructural no vascularizado	- Resección tumoral. - Defecto postraumático. - Defectos pequeños (limitación de tamaño).	- Osteogénico + Osteoinductivo + Revitalización 70%	- Morbilidad zona donante (16%). - Limitación volumen injerto. - Tiempo de consolidación: 12 meses.	- No unión 11%. - Fractura injerto 15% (++ 6-18 meses).
Autoinjerto óseo tratado extracorpóreamente	- Resección tumoral. - Defecto postraumático.	- Congruencia con defecto. - Compatibilidad biológica con huésped.	- Sólo osteoconductor. - Peores resultados que aloinjertos.	- No unión 4-32%. - Fractura injerto 10-17%. - Infección 0-41%.
Técnica de membrana inducida (Masquelet)	- Defecto postraumático. - Defectos tumorales. - Osteomielitis crónica. - Defectos hasta 25 cm.	- Tiempo de curación independiente del tamaño del defecto. - Poco demandante.	- Procedimiento en dos tiempos. - Limitación de autoinjerto. - Hueso pero calidad. - 8.5 meses de descarga.	- No unión 9%. - Fractura regenerado 33% (++ <2 años). - Infección 0-8%.
Osteogénesis por distracción (Transporte óseo)	- Osteomielitis crónica. - Defecto postraumático. - Resección tumoral. - Sin limitación por tamaño del defecto.	- Reconstrucción guiada. - Poco invasivo. - Regenerado de hueso vital. - Carga inmediata. - Histogénesis por distracción.	- Larga duración. Tiempo de reconstrucción en relación a tamaño del defecto (1 mm/día). - Demandante para el paciente.	- Infección, rotura, aflojamiento pines. - Contracción de las articulaciones adyacentes. - Dolor durante el transporte. - Pseudoartrosis punto de atraque.

Colgajo óseo vascularizado (peroné vascularizado)	- Resección tumoral. - Osteomielitis crónica. - Defectos donde se requiere aportar vascularización. - Defectos hasta 25 cm.	- Vascularizado. - Propiedades mecánicas. - Osteogénico ++ - Osteoinductivo ++ - Consolidación en 3-6 meses. - Puede incluir colgajo cutáneo y muscular.	- Morbilidad zona donante (19%). - No carga completa hasta 1 año. - Requiere habilidades microquirúrgicas. - Tiempo quirúrgico aumentado. - Incongruencia tamaño en extremidades inferiores.	- No unión 0-19%. - Fractura injerto 10-32% (30-40% en extremidad de carga, ++ <1 año). - Infección 4-10%. - Zona donante: parálisis nervio peroneo común, contractura flexor hallucis longus, síndrome compartimental.
Técnica de Capanna	- Resección tumoral. - Defecto postraumático.	- Propiedades mecánicas aloinjerto + biológicas - peroné vascularizado. - ++ Consolidación de las osteotomías (100% a los 6 meses). - Mayor revascularización aloinjerto.	- Inconvenientes de peroné vascularizado.	- No unión 0-14%. - Fractura injerto 0-13%. - Infección 0-13%.
Colgajo perióstico vascularizado	- Revascularización necrosis avascular. - Tratamiento y prevención pseudoartrosis. - Defectos donde se requiere aportar vascularización.	- Osteogénico +++ (toda la superficie). - Consolidación precoz. - Reduce tiempos de descarga respecto a peroné vascularizado.	- Morbilidad zona donante (menor que colgajo óseo). - Requiere habilidades microquirúrgicas. - Tiempo quirúrgico aumentado.	- Zona donante (*en función de localización).

Tabla 3. Tabla resumen de las técnicas de reconstrucción de defectos óseos segmentarios masivos.

2.3. Modelos de defectos óseos animales

2.3.1. Aloinjerto óseo en rata

En la literatura encontramos muchos trabajos experimentales que estudian el papel de los injertos óseos así como técnicas para potenciar sus propiedades biológicas. Asimismo, existe un elevado interés en determinar los factores que influyen en la reparación de defectos óseos críticos así como el desarrollo de nuevas técnicas que la promuevan.

Existen diversos modelos experimentales de defectos óseos críticos, tanto en animales grandes (perro, oveja, cerdo), como en animales pequeños (rata, ratón). Cada modelo animal tiene sus particularidades que lo convierten en el más adecuado para un determinado objeto de estudio. A pesar de que los primeros poseen ventajas biomecánicas y dimensionales respecto a los segundos, la experimentación es más costosa tanto en términos temporales, de trabajo como económico. La rata es el animal de experimentación más utilizado en modelos de reparación ósea [224]. Además de su manejabilidad y fácil mantenimiento y estabulación dado su pequeño tamaño, tienen características como su alta prolificidad o la buena supervivencia tras complicados procesos quirúrgicos, con un potencial de curación mayor, que los convierte en el animal idóneo para realizar investigación básica así como estudios de cribaje iniciales [54,224–229]. La rata también es el modelo animal más utilizado en microcirugía. Estos modelos permiten el estudio comparativo de diferentes técnicas reconstructivas de defectos óseos masivos con el objetivo de determinar cual ofrece mejores resultados. Poser y cols. [230] describieron y validaron un modelo de defecto óseo crítico en rata. Se

trataba de un defecto de 5 mm en el tercio medio femoral. Dadas las ventajas que ofrece la experimentación con animales pequeños como las ratas, así como la accesibilidad del fémur en este animal, este fue el modelo escogido para llevar a cabo nuestro estudio.

A pesar de que se conoce ampliamente las ventajas biológicas que ofrecen los autoinjertos con respecto a los aloinjertos [54,228], dado su stock limitado, en la actualidad las líneas de estudio se basan en técnicas de ingeniería tisular que promuevan la integración de un aloinjerto [54,231].

En estudios experimentales en rata se ha objetivado la ausencia de neoformación ósea ni remodelación de un aloinjerto óseo intercalar en reconstrucciones de defectos críticos a las 6 semanas de la intervención [227]. Estos hallazgos también han sido documentados aún tras 8 [231] y 12 semanas de seguimiento [228], con datos biomecánicos que confirmaban la no consolidación. Contrariamente a lo que sugieren los estudios anteriores, Amorosa y cols. [232] objetivaron formación de callo óseo en reconstrucciones de defectos intercalares críticos con aloinjerto a los 4 meses de seguimiento, sin diferencias significativas con el grupo de reconstrucción con autoinjerto intercalar. Ambos grupos mostraron buenos resultados en el estudio biomecánico a baja frecuencia, aunque en frecuencias de 5 Hz o superior el grupo de autoinjerto mostro más rigidez elástica, así como las diferencias respecto al fémur contralateral no tratado fueron menores en el grupo de autoinjerto óseo. Seo y cols. [233] observaron consolidación de la osteotomía distal metafisaria en únicamente 25% de las ratas intervenidas con aloinjerto intercalar en reconstrucciones de defectos óseos críticos en a las 12 semanas de seguimiento, y del 0% en la proximal diafisaria. A pesar de que no hemos encontrado un límite de tiempo consensuado a partir del

cual se defina la no unión, en estudios de estimulación de la consolidación ósea en rata, en la mayoría se objetivan puentes óseos a las 6 semanas de seguimiento [227–229,234].

Uno de los factores determinantes en los resultados de los estudios son los sistemas de fijación. En la literatura se han publicado numerosos sistemas de fijación para defectos óseos críticos en rata. No obstante, en muchos casos resulta difícil obtener una fijación reproducible y que permita una carga sobre la extremidad de manera fiable. Se han diseñado sistemas de placas con guías de brocado y para realizar las osteotomías, con los que se han obtenido reconstrucciones estables y seguras [230]. A pesar de que la fijación con placa ofrezca una fijación más estable, en algunos estudios experimentales, por su idiosincrasia, estos sistemas interferirían en el objeto de estudio, como sucede en el caso de los colgajos periósticos. Es por este motivo que algunos autores optan por la fijación mediante un sistema de enclavado endomedular bien sea anterógrado o retrógrado [227,228,232,235,236]. Jager y cols. [226] compararon diferentes sistemas de fijación interna en defectos óseos críticos de fémur en modelo animal en rata. Al evaluar la fijación con enclavado endomedular anterógrado destacaron la dificultad técnica así como la gran variabilidad interindividual que existía en la anatomía del fémur proximal, con lo que les resultaba imposible determinar un punto de entrada para la aguja a nivel del trocánter. Este problema se solucionaba si se llevaba a cabo un enclavado retrógrado, sin embargo ambas técnicas tenían un alto riesgo de perforación cortical y consiguiente fractura por la gran anteversión que presenta el fémur de la rata. Además, destacaban que la fijación con aguja endomedular no aportaba estabilidad rotacional. Estos resultados contrastaban con Gebauer y cols. [237],

quienes en su estudio recomendaban el uso de enclavado endomedular en el tratamiento de defectos en fémur de rata. El otro sistema de fijación que Jager y cols. [226] evaluaron fue el fijador externo. Valoraban favorablemente la posibilidad de estandarizar y protocolizar el procedimiento, así como la estabilidad que se conseguía. Para cualquiera de los implantes utilizados, siempre recomendaban el abordaje lateral tanto para la creación del defecto crítico como para su reconstrucción, que permitía una excelente exposición con una mínima lesión de partes blandas.

Técnicas de estimulación de aloinjertos en rata

En la actualidad, las líneas de estudio de reconstrucciones de defectos óseos segmentarios masivos se centran en técnicas de estimulación de la reparación ósea, habitualmente asociadas a aloinjertos intercalares que en ocasiones sirve de matriz osteoconductora. El aloinjerto de forma aislada carece de propiedades osteogénicas, con lo que la incorporación al hueso huésped se encuentra significativamente retardada, lo cual frecuentemente desemboca en no uniones o secuestros del aloinjerto [238]. No obstante, comparado con constructos diseñados en ingeniería tisular con materiales duros, los aloinjertos estructurales poseen mejores propiedades mecánicas así como de resistencia a la fractura, por lo que siguen siendo actualmente la mejor opción para la reparación de grandes defectos segmentarios que requieren soporte inmediato [239,240]

Para estimular el bajo potencial osteogénico de los aloinjertos, algunos estudios se han centrado en la utilización de moléculas osteoinductivas [241–243]. La proteína morfogenética ósea recombinante humana (rhBMP)-2, y en menor

medida BMP-7, son probablemente los factores de crecimiento más importantes para la regeneración ósea y cartilaginosa [244], y se ha demostrado el aumento de capacidad reparativa aportando potencial osteogénico que tienen tanto sobre los aloinjertos como los autoinjertos desvitalizados [228,245–248]. Se conoce que la expresión de BMP-2 se produce a nivel del callo perióstico inicial [249]. Se ha sugerido que existe una dosis óptima de BMP, dado que se ha observado que a pesar de que una dosis alta forma un callo óseo de mayor tamaño, este es mecánicamente más débil, posiblemente porque su remodelación a un hueso con propiedades biomecánicas óptimas precise más tiempo [228], o porque existe una reabsorción ósea mayor en estos casos [250]. La desventaja del uso de BMP es su corta vida media así como que en humanos la dosis efectiva necesaria es muy alta [251]. Además, se han reportado numerosas complicaciones mayores asociadas al uso de BMP/INFUSE (*Bone Morphogenetic Protein, Medtronic, Memphis, TN, USA*) en cirugía de columna en indicaciones no aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*), entre las que se encuentran osificaciones heterotópicas, disfagia tras cirugía cervical anterior, infección, un aumento de la tasa de déficit neurológico postoperatorio, inmunosupresión y cáncer [252]. Por estos motivos, actualmente se está investigando el papel que podrían tener las terapias genéticas en conseguir transferir un vector que contenga BMP o factores estimuladores como la activin receptor-like kinase-2 (ALK2) a una célula madre mesenquimal, con la que posteriormente se recubrirían aloinjertos estructurales, con resultados esperanzadores [227,234,253].

Por otra parte, se ha reportado el efecto favorable que tiene la administración de protaglandina E2 (PGE2) [254], aumentando la actividad inflamatoria derivada de la actividad de la ciclooxygenasa (COX-2), en las fases

iniciales del proceso reparativo, así como la inhibición de éste cuando la COX-2 se encuentra inhibida o deficiente [254–256]. Estudios recientes sugieren que la administración intermitente de hormona paratiroidea (PTH) favorece la reparación ósea, demostrándose su efecto en varios modelos animales de fractura e injertos óseos [257–260]. El mecanismo a través del cual la hormona estimula la reparación ósea no se conoce exactamente. Se ha sugerido su acción anabólica al inicio y final del proceso [258], así como la alteración de factores de crecimiento *Insulin-like* y *Wnt* en los modelos preclínicos de fractura [261]. Recientemente, también se ha demostrado la capacidad osteogénica y regenerativa del factor de crecimiento tisular conectivo (CTGF) tanto en estudios in vitro como en modelo animal defecto femoral segmentario [262,263].

Dado que las propiedades del periostio ampliamente conocidas, existen líneas de estudio de ingeniería tisular para el diseño de un periostio sintético [54]. Estudios en modelos animales han proporcionado información acerca del control de la diferenciación y expansión de células progenitoras periósticas. De esta manera, en los últimos años se han publicado algunos trabajos en los que utilizan células madre mesenquimales que simulan la respuesta del periostio durante las fases iniciales de reparación ósea [264,265]. Para el diseño de un periostio sintético no es suficiente con tener células osteogénicas capaces de neoformar hueso [266–268], que comúnmente son células estromales obtenidas de médula ósea, sino que también son necesarios factores osteoinductivos, mencionados previamente, así como una matriz biomimética osteoconductiva, flexible y adaptable a la superficie del aloinjerto, que permita la infiltración celular con una mínima respuesta fibrótica [231,269,270]. La mayoría de autores coinciden en que los mecanismos de control del periostio así como de las fases iniciales de

reparación ósea todavía se conocen muy superficialmente, y que aunque los resultados de los estudios publicados son esperanzadores, todavía queda mucho recorrido para el diseño de un periostio sintético aplicable a la práctica clínica.

2.3.2. Colgajos vascularizados en rata

En los últimos años, se ha aumentado la aplicación de injertos vascularizados en el campo de la cirugía ortopédica y traumatología, como técnicas para el tratamiento de no uniones o reconstrucciones de defectos masivos [147,148,171]. Para aumentar el conocimiento que se tiene sobre estos injertos y clarificar las incógnitas que los rodean, son imprescindibles los estudios en modelos animales. Uno de los animales más usados para el estudio de técnicas microquirúrgicas es la rata.

Se han descrito varios modelos de injerto óseo vascularizado en rata. Mizumoto y cols. [271] describieron un modelo de injerto tibio-peroneo vascularizado, y demostraron, además, su capacidad osteogénica así como de remodelación, lo que sugirió una necesidad de estrés mecánico sobre el injerto para que se favorezca su hipertrofia. Resultados similares se reportaron en el modelo de injerto vascularizado de cúbito descrito por Yamaoka, aunque no publicado hasta más tarde por Mizumoto [272]. Sempuku y cols. [273] describieron un modelo de injerto corticoesponjoso vascularizado utilizando hueso de la cola de la rata. Demostraron una consolidación significativamente más rápida en el grupo en el que se usó injerto vascularizado respecto al no vascularizado (4 semanas vs. 16 semanas, respectivamente). En el año 2004, Chen

y cols. [274] publicaron un modelo de colgajo de peroné vascularizado en rata, con una tasa de supervivencia del 100% en su estudio, alzándose así como un modelo fiable de colgajo óseo vascularizado.

En la literatura también encontramos modelos de colgajos óseos vascularizados en rata asociados a otros tejidos. Linsell y cols. [275] describieron el primer colgajo osteomiocutáneo en rata. Estaba compuesto por el fémur, la musculatura del muslo y una isla cutánea de la zona inguinal. Más tarde algunos autores [276] lo criticaron por no tratarse realmente de un colgajo osteomiocutáneo, ya que la vascularización cutánea era independiente de la del músculo y hueso, por lo que en la actualidad no lo consideran un auténtico modelo de colgajo osteomiocutáneo. Años más tarde, Mutaf y cols. [277] describieron un colgajo osteomiocutáneo de tibia basado en el pedículo vascular safeno que trasplantaron a la región abdominal microanastomosándolo al paquete femoral. Ozkan y cols. [278] propusieron un colgajo osteomiocutáneo ilíaco con musculatura abdominal y una isla cutánea del flanco. Nasir y cols. [279] también describieron un colgajo osteomuscular ilíaco, pero utilizando musculatura de glúteo mayor y tensor de la fascia lata. Chen y cols. [280] publicaron un modelo de colgajo osteomuscular acromio-trapecio, con una tasa de supervivencia del 93.3% a los 7 días.

Finley y cols. fueron los primeros en describir colgajo perióstico vascularizado, haciéndolo en un modelo animal en perro [183]. Con el creciente interés en la utilización de colgajos periósticos vascularizados en la práctica clínica, en los últimos años se han descrito modelos experimentales en rata. Romana y Masquelet [200][281] reportaron una mayor capacidad de neoformación ósea al asociar un colgajo musculoperióstico vascularizado de tercio

distal de fémur basado en la arteria genicular descendente, con aloinjerto de esponjosa en comparación a los dos procedimientos por separado. Camilli y Penteado [185] obtuvieron resultados similares al usar el mismo modelo de colgajo perióstico. Asimismo evidenciaron que si existe contacto entre el colgajo y hueso vital todavía se favorece más la neoformación. Bayramiçli y cols. [199] describieron un colgajo periostio-fasciocutáneo de tibia basado en la arteria safena, como una variante del pedículo que ya había descrito Mustaf y cols. [277]. Objetivaron una tasa de neosteogénesis del 80% y de neoangiogénesis del 93.3%. Este modelo fue usado por Ersoy y cols. [282] para valorar la capacidad osteoconductiva y osteoinductiva de diferentes biomateriales asociados a un colgajo perióstico. Recientemente, se han reportado los resultados de un estudio en el que se reconstruía un defecto óseo segmentario de fémur con un colgajo perióstico de cóndilo femoral medial de forma aislada y asociado a matriz de fosfato tricálcico, añadiendo en uno de los grupos células madre mononucleares y en otro ligando el pedículo del colgajo perióstico. Se evidenció que en los en los que el colgajo perióstico estaba vascularizado, la osteogénesis y angiogénesis era mayor, consiguiendo resultados óptimos al combinarlo con una matriz de fosfato tricálcico y células madre [20]. En la Tabla 4 se recogen las características de los modelos en rata de colgajo óseos y periósticos vascularizados descritos en la literatura.

Autor (Año)	Tipo de injerto	Localización	Características
Mizumoto (1986)	Óseo	Tibio-peroneo	- Pedículo femoral. - Demuestran actividad osteogénica del periostio.
Mizumoto/Yamaoka (1988)	Óseo	Cúbito	* <i>Artículo no disponible.</i>
Linsell (1988)	Osteomiocutáneo	Muslo (fémur, zona inguinal)	- Pedículo epigástrico. - No verdadero osteomiocutáneo (vascularización osteomuscular diferente de la cutánea, sin monitorización). - 90% de supervivencia.
Romana/Masquelet (1990)	Musculoperióstico	Fémur distal	- Pedículo genicular descendente. - Tamaño del colgajo: 5 x 3 mm. - Colgajo pediculado. - Demuestran neoformación ósea al asociarlo a injerto de esponjosa.
Sempuku (1993)	Corticoesponjoso	Cola	- Pedículo con vasos caudales. - Hueso esponjoso (a diferencia del resto de modelos).
Mustaf (1995)	Osteomiocutáneo	Tibia	- Pedículo safeno, menor morbilidad. - Isla cutánea (monitorización). - Pedículo: Art.: 0.6-0.8 mm; Ven.: 0.8-1.0 mm; Long.: 20mm. - Posibilidad de colgajo libre. - 90% de supervivencia.

Chen (2000)	Osteomuscular	Acromio-Trapecio	- Pedículo en continuidad con tronco cervical. - Forma triangular: 38 x 39 x 32 mm. - Pedículo: Art.: 0.5 mm; Ven.: 0.6 mm; Long.: 12mm. - Posibilidad de colgajo libre. - 93.3% de supervivencia.
Ozkan (2001)	Osteomiocutáneo	Ilíaco (musculatura abdominal)	- Pedículo iliolumbar. - Isla cutánea (monitorización) - Pedículo: Art.: 0.3-0.4 mm; Ven.: 0.5-0.6 mm; Long.: 20mm. - Posibilidad de colgajo libre. - 90% de supervivencia.
Nasir (2003)	Osteomuscular	Ilíaco (glúteo mayor y tensor fascia lata)	- Pedículo circunflejo femoral lateral. - Pedículo: Art.: 0.1-0.2 mm; Ven.: 0.2-0.4 mm; Long.: 30mm. - Forma triangular: 32 x 29 x 27 mm. - Puede ser disecado sin microscopio. - Puede ser disecado sin microscopio.
Chen (2004)	Óseo	Peroné	- Mayor similitud con el colgajo de peroné vascularizado utilizado en la clínica. - Pedículo: Art.: 0.9 mm; Ven.: 0.9 mm; Long.: 14mm. - Posibilidad de colgajo libre. - 100% de supervivencia.
Byaramiçli (2012)	Periostio-fasciocutáneo	Tibia	- Pedículo safeno, menor morbilidad. - Hueso intacto, menor morbilidad. - Isla cutánea (monitorización). - 100% de supervivencia. - Osteoneogénesis 80%; Neoangiogenesis 93.3%.
Nau (2016)	Perióstico	Cóndilo femoral medial	- Pedículo genicular descendente. - Tamaño del colgajo: 5 x 4 mm. - Demuestran capacidad osteogénica del colgajo aislado y asociado a técnicas de ingeniería tisular.

Tabla 4. Modelos de colgajos óseos y periósticos vascularizados en rata.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El colgajo perióstico vascularizado estimula la revitalización y osteointegración del aloinjerto estructural masivo en una reconstrucción de un defecto óseo segmentario en un modelo preclínico en rata.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

1. Valorar la capacidad del colgajo perióstico vascularizado de promover la osteointegración de un aloinjerto estructural óseo.
2. Valorar la capacidad osteogénica del colgajo perióstico vascularizado en las reconstrucciones con aloinjerto estructural óseo.
3. Valorar la capacidad de revitalización del colgajo perióstico vascularizado de un aloinjerto estructural óseo.
4. Generar los resultados preclínicos necesarios para la evaluación de la eficacia de la asociación de colgajo perióstico vascularizado a aloinjerto estructural óseo para su aplicación clínica en la reconstrucción de defectos óseos segmentarios.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Material

5.1.1. Animal

Como modelo experimental utilizamos ratas Sprague-Dawley (laboratorios Janvier, Roubaix, Francia). Todas ellas eran machos adultos y con un peso comprendido entre los 300-400 g. Se utilizaron un total de 64 ratas divididas en 6 grupos, y no hubo ninguna rata excluida.

Ninguno de los animales se había utilizado en estudios previos. Se alimentaron con pienso estándar para ratas y agua *ad libitum*. Los animales fueron estabulados en jaulas de roedores en grupos de 3 ratas. Se mantuvieron bajo temperatura constante (22°C) y con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas.

Todos los procedimientos experimentales se adhirieron a las recomendaciones de las leyes locales, nacionales y europeas (Decreto 214 de 1997, Real Decreto 223 de 1988 y Directiva Europea 86/609/CEE de 1986), y a los estándares de atención establecidos por *National Institutes of Health (Guide for Care and Use for Laboratory Animals, publication No. 80-23, revised 1985)*. Nuestro proyecto también recibió la aprobación del Comité de Ética de Experimentación animal del Institut de Recerca del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Núm. registro: 11/14 CEEA).

5.1.2. Instrumental para los procedimientos quirúrgicos

- Microscopio Carl-Zeiss OPMI 9 – FC (Aumentos: 0.6, 1, 1.6).



Figura 9. Microscopio Carl-Zeiss OPMI 9-FC. Fotografía tomada durante un procedimiento de colgajo perióstico en el estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona.

- Sierra de osteotomía (Dremel 200-5).



Figura 10. Sierra de osteotomía Dremel 200-5.

- Agujas roscadas de 1.6mm totalmente roscadas Stryker® (referencia 45-80100).
- Chuck y llave de chuck.
- Cortafríos.



Figura 11. De izquierda a derecha, cortafríos, aguja roscada estéril, chuck y llave chuck.

- Caja de microcirugía:



Figura 12. Caja de microcirugía en el estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona

- Micro tijera.
 - Micro porta-agujas.
 - Micro pinza recta.
 - Micro pinza curva.
- Sutura Braun Surgical Dafilon-Poliamida Monofilamento 8.0 6" – 15 cm Aguja DRm6.
- Caja de cirugía básica (Figura):
 - Porta-agujas.
 - Tijera Metzenbaum.
 - Tijera Mayo curva.
 - Pinza Adson dentada.
 - Sutura Braun Surgical Dafilon-Poliamida Monofilamento 4.0 18" – 45cm Aguja DSMP19.
 - Sutura Braun Surgical Novosyn-Poly(glycolide-co-L-lactide) Trenzada 3.0 28" – 70cm Aguja DS24.



Figura 13. Caja de cirugía básica y suturas utilizadas en el estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona

- Balanza precisa BJ1100D.
- Manta térmica con sonda rectal (rata).
- Lámpara portátil quirófano Martin (Chromophare C-450).
- Suero fisiológico.
- Jeringuillas 10ml.

5.2. Métodos

5.2.1. Evaluación inicial, técnica de anestesia general y cuidados postoperatorios

Una vez ingresados los animales en el estabulario del quirófano experimental del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR; Número de Registro Departamento de Medio Ambiente y Vivienda: B9900062) permanecían durante una semana para su aclimatación en la sala de cuarentena. Aquí se verificaba su estado de salud y su peso. Una vez realizados todos los controles, el animal se trasladaba al quirófano experimental.

Los procedimientos anestésicos se llevaron a cabo en los siguientes puntos del estudio:

- Cirugía de resección ósea segmentaria y reconstrucción posterior.
- Control radioscópico postoperatorio a la semana.
- Sacrificio con obtención de muestras del fémur intervenido.

La anestesia general se llevaba a cabo mediante una inyección intraperitoneal de Ketamina (75mg/Kg) y medetomidina (0.5 mg/Kg), repitiéndose la mitad de la dosis cada 30min. Una vez dormidos, se registró el peso de la rata. Durante la anestesia los animales respiraron espontáneamente.

Tras la anestesia, se administraron 5 ml de solución de Ringer lactato por vía subcutánea para evitar la deshidratación, y una dosis única de meloxicam (1mg/Kg, vía subcutánea) como analgesia, que se repitió diariamente durante los 3 primeros días postoperatorios.

Todos los animales fueron evaluados clínicamente por veterinarios independientes del centro de estabulación. Eran evaluados diariamente durante la primera semana tras la intervención, y posteriormente semanalmente hasta su eutanasia.



Figura 14. Evaluación clínica por veterinarios independientes en el estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona

Durante la evaluación postoperatoria se evaluaban los siguientes parámetros: aspecto general, postura, movilidad, aspecto, cantidad de heces, temperatura rectal, frecuencia respiratoria, tipo de respiración, frecuencia cardíaca, estado ocular, estado del pelaje, conducta, estado de la herida quirúrgica y presencia de automutilaciones. Los animales además fueron pesados semanalmente hasta el final del estudio. Se realizó un control radioscópico tras finalizar los procedimientos quirúrgicos el día de la intervención así como a la semana postoperatoria para verificar la no movilización del implante. Asimismo,

también se realizaba un control radioscópico si se objetivaba alguna desviación de los parámetros clínicos respecto al postoperatorio habitual de las ratas.

5.2.2 Estudio mediante tomografía axial computarizada de la topografía del muslo de la rata

Se realizó una anestesia general de la rata según el protocolo establecido. Se trasladó al animal a la Unidad de Radiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Una vez allí se introdujo en el interior de la máquina de TAC. El protocolo de las imágenes se obtenía en una proyección axial, que posteriormente eran reconstruidas. De esta manera, se objetivó la profundidad, características y localización del paquete vasculonervioso del muslo de la rata. Asimismo, se realizó un estudio morfométrico del fémur de la rata, determinando el sistema de fijación más adecuado para nuestro estudio (Figura 15).

5.2.3. Estudio anatómico de la vascularización del colgajo perióstico

Este procedimiento se realizó tras la anestesia general de la rata según protocolo y su posterior eutanasia. Previamente al sacrificio se había inyectado látex pigmentado intravascularmente. Se realizó una disección por planos hasta llegar al periostio del cóndilo femoral medial. Una vez finalizada la disección, se pudo observar el pedículo principal en el cual se basará nuestro colgajo (Figura 16).

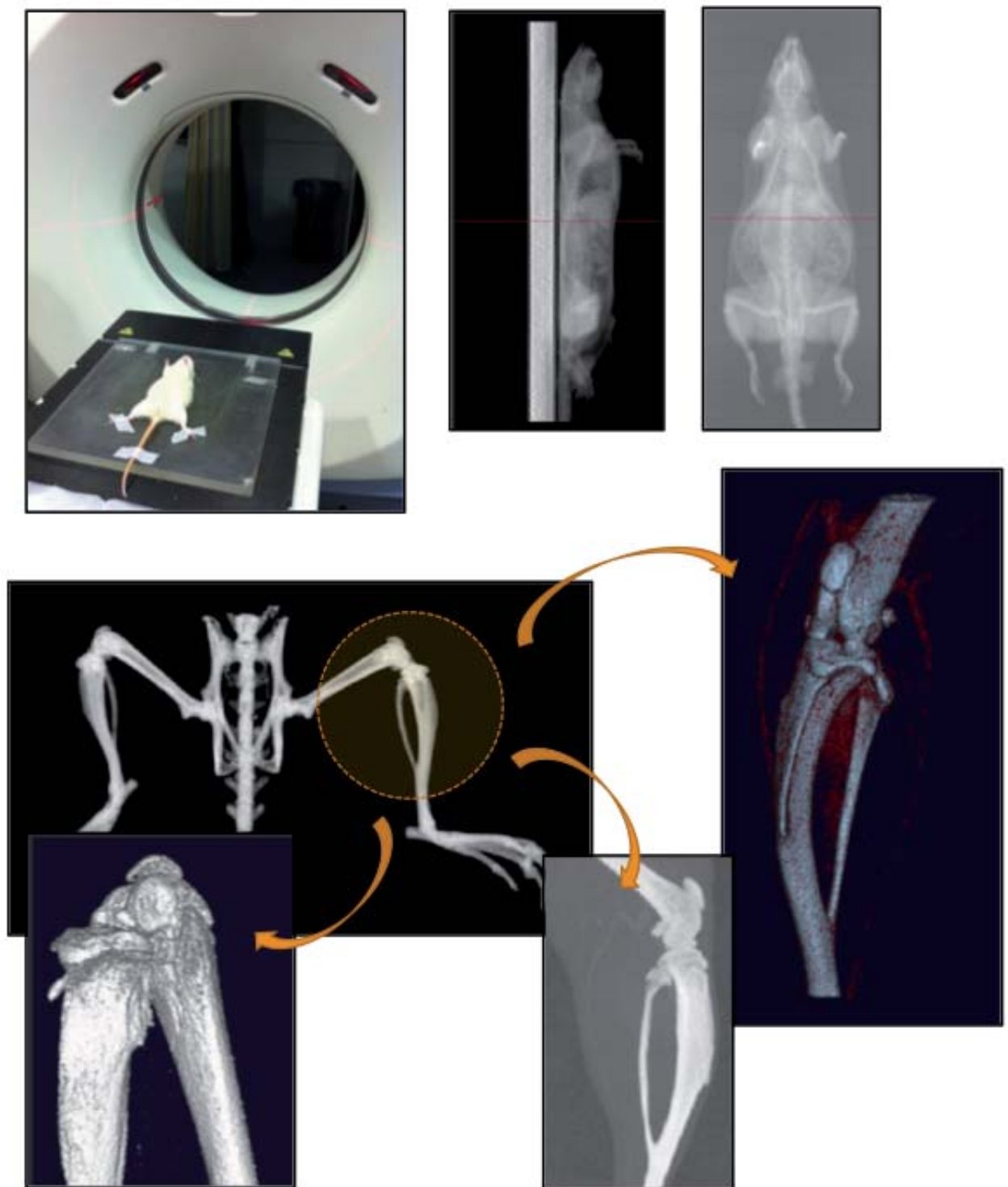


Figura 15. Estudio morfométrico del fémur de la rata mediante Tomografía Computerizada la Unidad de Radiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona.

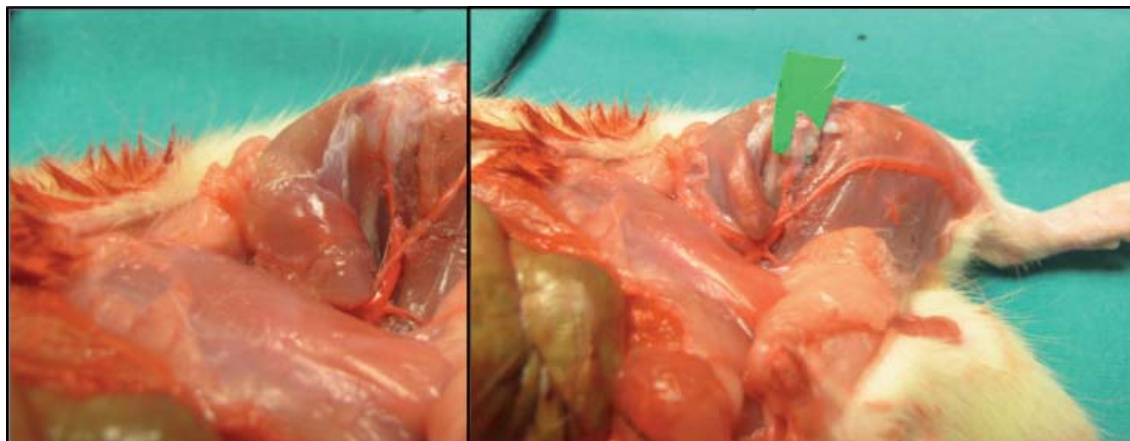
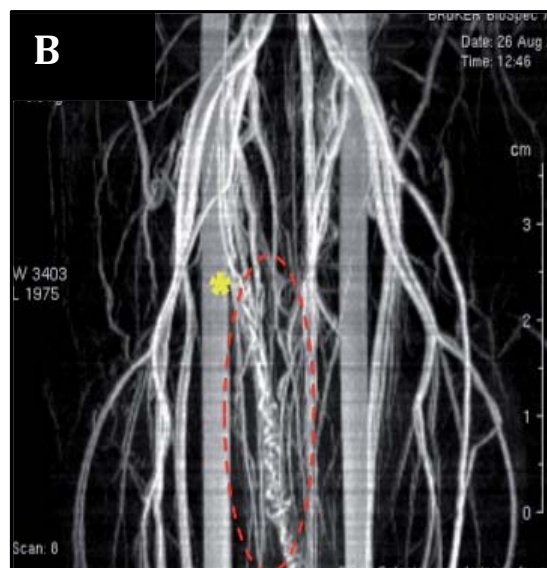
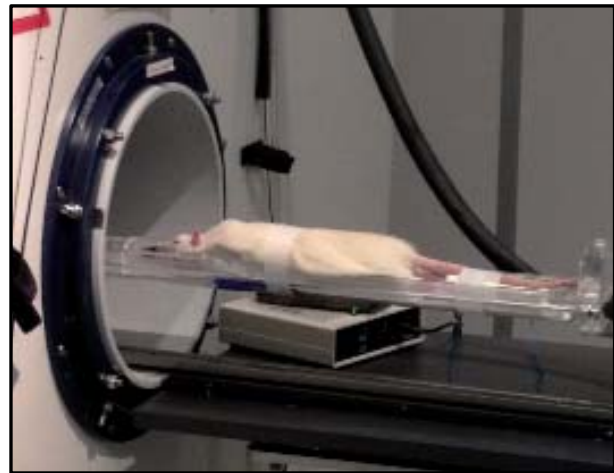
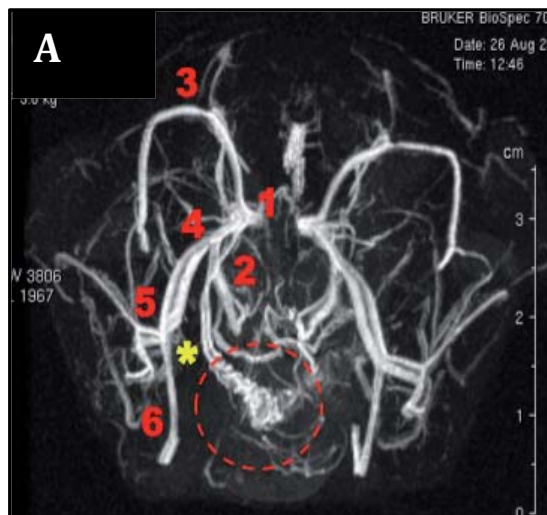


Figura 16. Fotografía del colgajo perióstico de cóndilo femoral medial disecado, previamente inyectado con látex pigmentado intravascularmente. Observamos el pedículo principal del colgajo.

5.2.4. Estudio mediante resonancia magnética de la viabilidad del colgajo perióstico vascularizado a las 6 semanas.

Con el objetivo de evaluar la viabilidad del colgajo perióstico a largo plazo, se realizó el procedimiento de colgajo perióstico vascularizado de cóndilo femoral medial en un grupo piloto de 4 ratas según el protocolo establecido. A las 6 semanas de seguimiento, tras la anestesia general de las ratas según protocolo, se trasladó a los animales a la Unidad de Radiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Una vez allí se introdujo en el interior de la máquina de resonancia magnética. Se objetivó viabilidad del colgajo perióstico vascularizado a las 6 semanas de seguimiento. Las imágenes se muestran a continuación.



(A-B). Resonancia magnética. Reconstrucción vascular de las extremidades inferiores.

1. Arteria femoral
2. Arteria para el músculo *gracilis*.
3. Arteria epigástrica superficial.
4. Arteria poplítea.
5. Arteria tibial posterior.
6. Arteria safena.
7. Rama tarsiana medial de la arteria safena.
8. Rama comunicante de la arteria safena.

* Arteria perióstica femoral
 Vascularización del colgajo

(C) RMN T2. (D) RMN vascular. Diferenciamos el fémur (*), arteria poplítea (punta flecha), colgajo (flecha roja), arteria perióstica femoral (círculo rojo).

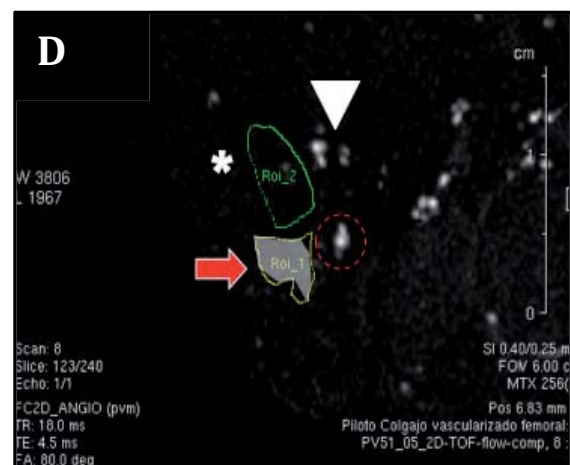


Figura 17. Imágenes de resonancia magnética de una rata del grupo de modelo preclínico de colgajo perióstico a las 6 semanas de seguimiento.

5.2.5. Obtención, preparación y preservación del aloinjerto estructural óseo

El aloinjerto óseo estructural se obtenía de las propias ratas del estudio. En el momento en el que se realiza el defecto óseo segmentario, tras el procedimiento de resección del segmento óseo diafisario de 5 mm, este se depositaba en un contenedor estéril.



Figura 18. Comprobación con un pie de rey de la medición del segmento óseo resecado de 5 mm, que tras ser procesado se utilizará como aloinjerto óseo.

Tras resecar el periostio y partes blandas adheridas, se lavaban y se introducía en un contenedor con alcohol al 70% durante 30min. Posteriormente los aloinjertos permanecerán criopreservados a -80°C durante un mínimo de una semana hasta su posterior utilización como aloinjertos [218,228,232].

5.2.6. Técnica de resección ósea

Los animales se trasladaban desde la sala de estabulación al quirófano. Las cirugías, así como su evolución postoperatoria y la estabulación de las ratas se llevaron a cabo en el Estabulario del VHIR. Todos los procedimientos quirúrgicos que se realizaron durante el estudio se llevaron a cabo por la misma cirujana, Irene Gallardo Calero. Los procedimientos microquirúrgicos fueron supervisados por Sergi Barrera Ochoa, cirujano con experiencia en microcirugía.

Este procedimiento se realizaba tras la anestesia general de la rata según el protocolo establecido. Una vez anestesiada, previamente a la incisión quirúrgica, se administraba penicilina G 20.000 UI/Kg intramuscularmente (Penibiot “2”, Laboratorios Normon, S.A. – España). Se rasuraba la extremidad inferior izquierda y se colocaba al animal en decúbito supino inmovilizado en la mesa quirúrgica. Se realizaba asepsia y antisepsia de la extremidad inferior izquierda y se montaba un campo quirúrgico estéril de toda la extremidad.

Se realizaba una incisión longitudinal lateral de fémur, identificando el septo intermuscular entre el vasto lateral y bíceps femoral. Posteriormente se incidía el septo y mediante una disección roma con un separador se rechazaba el vasto lateral hacia anterior y la musculatura isquiotibial hacia posterior, exponiéndose toda la diáfisis femoral. A continuación se desperiostizaba el tercio medio diafisario. En este momento, se medían 5 mm que servían como guía para realizar las osteotomías, obteniendo así un segmento diafisario de 5 mm de longitud que se procesaba para ser utilizado como aloinjerto estructural según el protocolo establecido. Este defecto constituía un defecto óseo crítico según estudios previos [232].

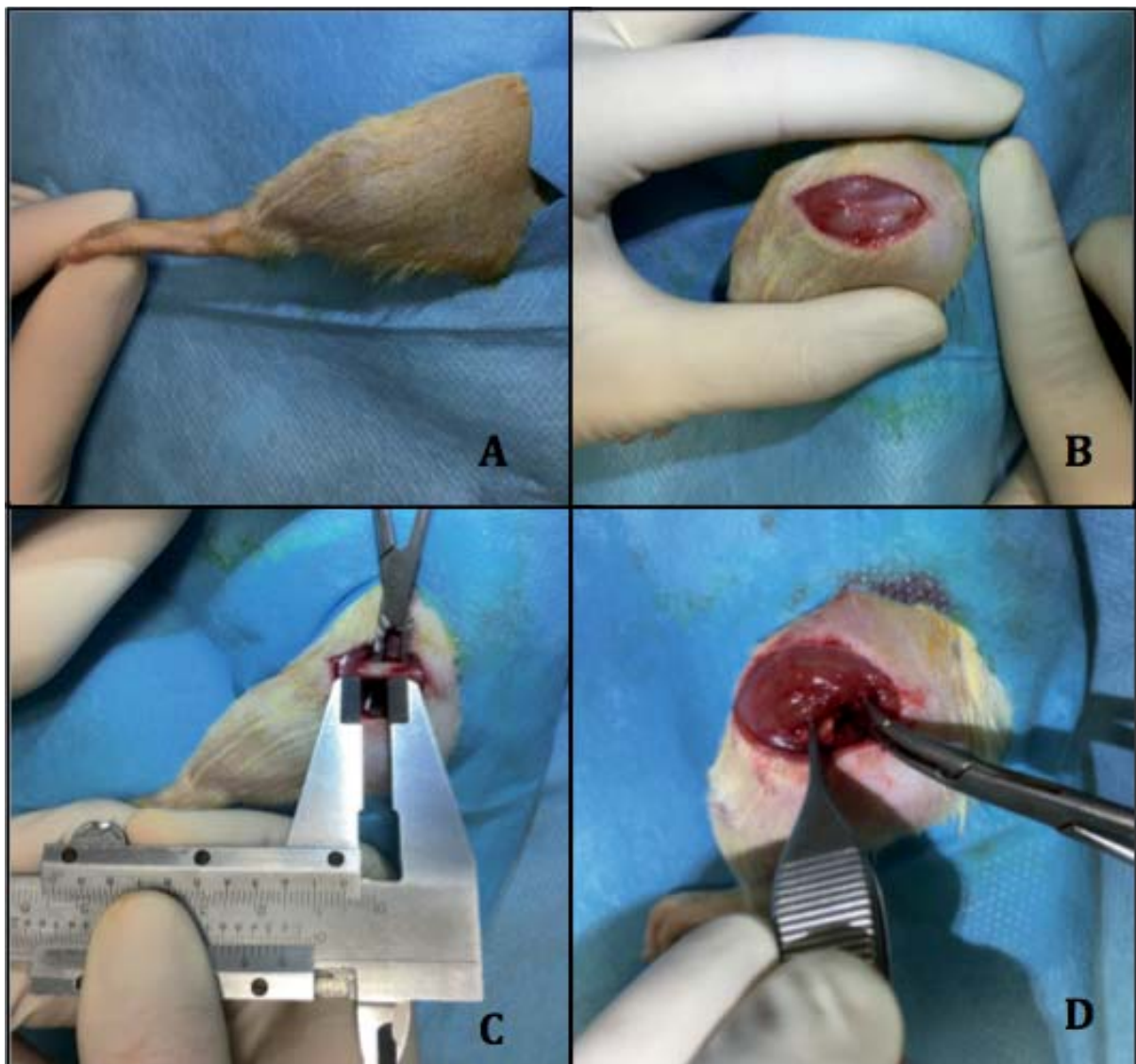


Figura 19. Procedimiento de creación de defecto crítico intercalar en fémur de rata. Preparación de cambo estéril (A); incisión longitudinal lateral de fémur identificando el septo intermuscular (B); medición de 5 mm diafisarios con pie de rey (C); aspecto del fémur tras la resección ósea (D).

5.2.7. Técnica de reconstrucción con aloinjerto óseo estructural

Tras la creación del defecto óseo segmentario, se ampliaba la incisión hacia proximal hasta el trocánter mayor. Se introducía la aguja Kirschner roscada de 1.6mm (*Stryker*) montada en un chuck progresivamente a través de la osteotomía proximal por el canal endomedular retrógradamente hasta hacerla aparecer por el trocánter mayor. Una vez se tenían 2 cm de aguja externamente al trocánter mayor, se reubicaba el chuck en el extremo proximal de ésta.

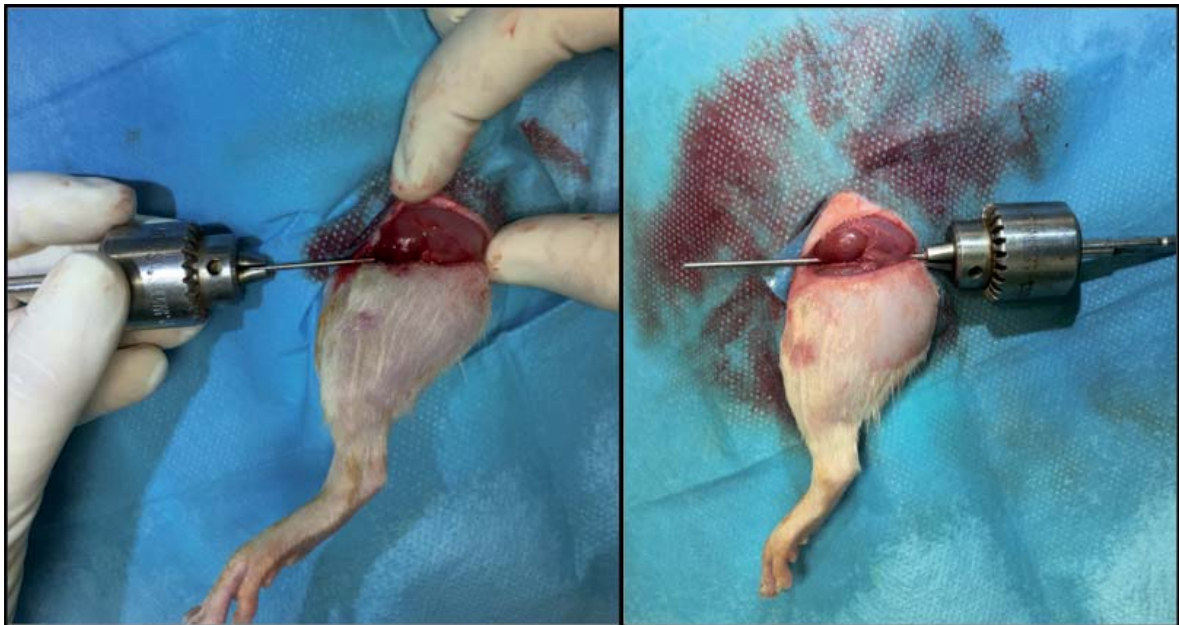


Figura 20. Procedimiento de reconstrucción de defecto femoral intercalar con aloinjerto óseo estructural. En la imagen de la izquierda se observa como se introduce la aguja Kirschner retrógradamente desde el defecto hacia el trocánter mayor. En la imagen de la derecha, una vez se ha extraído la aguja proximalmente y cambiado el chuck de ubicación, para proceder al a introducción de la aguja anterógradamente.

A continuación, se tomaba uno de los aloinjertos estructurales procesados según protocolo y se descongelaba. Posteriormente se hacía pasar la aguja a través de éste, y seguidamente a través del segmento distal del fémur realizando compresión a nivel de ambas osteotomías. La aguja se introducía hasta el polo superior de la rótula, comprobando que la reconstrucción era estable.

Llegados a este punto se retiraba el chuck y se cortaba la aguja que protruía a nivel proximal con un cortafríos. Finalmente se procedía al cierre de la fascia muscular y tejido subcutáneo mediante Novsyn 3.0 (Braun Surgical) y la incisión cutánea mediante Dafilon 4.0 (Braun Surgical).

Tras todos los procedimientos se realizaba un control escópico para verificar la correcta implantación de la aguja y la reconstrucción.

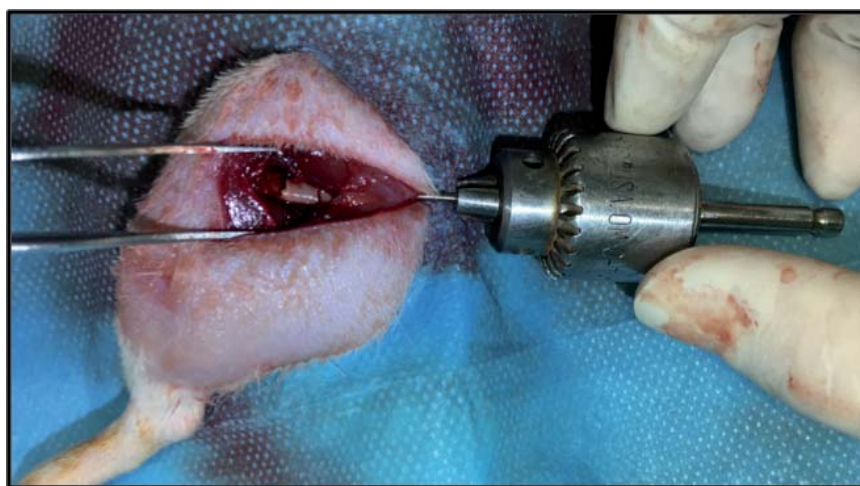


Figura 21. Procedimiento de reconstrucción de defecto intercalar femoral. Se observa el paso de la aguja a través del aloinjerto estructural introduciéndose endomedularmente en el segmento de fémur distal.



Figura 22. Comprobación escópica de la correcta implantación del aloinjerto óseo y de la aguja Kirschner endomedular.

5.2.8. Técnica de colgajo perióstico vascularizado

Esta técnica se llevaba a cabo en los grupos en los que la reconstrucción se completaba con un recubrimiento de colgajo perióstico vascularizado (grupos GP 4, 6 y 10 semanas) en el mismo acto quirúrgico, tras la creación y reconstrucción del defecto óseo segmentario. En estos grupos, no se cerraba la incisión quirúrgica lateral, dejándose cubierta por una gasa húmeda.

Se realizaba una incisión perpendicular al pliegue inguinal izquierdo según la técnica de Fanua-Wilgis [283]. Posteriormente, se realizaba una sección circular de la grasa del pliegue inguinal respetando la arteria que une esta grasa (arteria epigástrica superficial) a la arteria femoral. Se visualizaban los vasos femorales y se disecaban preservando la arteria circunfleja ilíaca superficial (rama posterior). Para disecarlos e individualizarlos se separaba primero el nervio crural del paquete arteriovenoso, y posteriormente la arteria de la vena. A continuación, se individualizaba la arteria perióstica femoral de la arteria epigástrica superficial y de la arteria poplítea (Figura 23).

Posteriormente se identificaba el reborde medial de la rótula y se realizaba una artrotomía parapatelar medial. Se procedía a llevar a cabo una luxación lateral de la rótula exponiendo la tróclea y el cóndilo femoral, para identificar el pedículo vascular de la arteria perióstica femoral que irriga el cóndilo femoral medial de la rata.

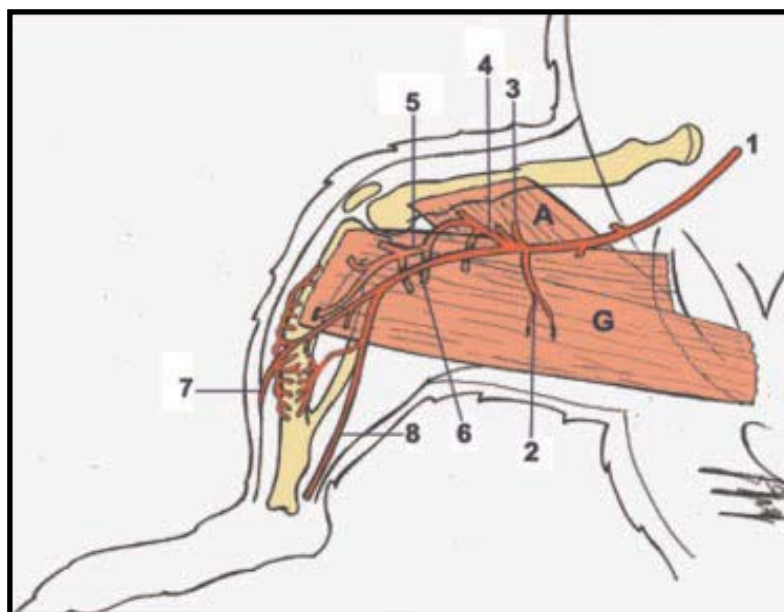


Figura 23. Esquema de la vascularización del muslo de la rata. Arteria femoral (1), arteria para el músculo *gracilis* (2), arteria epigástrica superficial (3), arteria poplítea (4), arteria tibial posterior (5), arteria safena (7), rama tarsiana medial de la arteria safena (8), y rama comunicante de la arteria safena (9).

Se procedía, entonces, a levantar el colgajo perióstico vascularizado de cóndilo femoral medial desde distal hacia proximal. Se liberaban y disecaban el pedículo vascular para poder rotar y trasladar el colgajo hasta la diáfisis femoral.

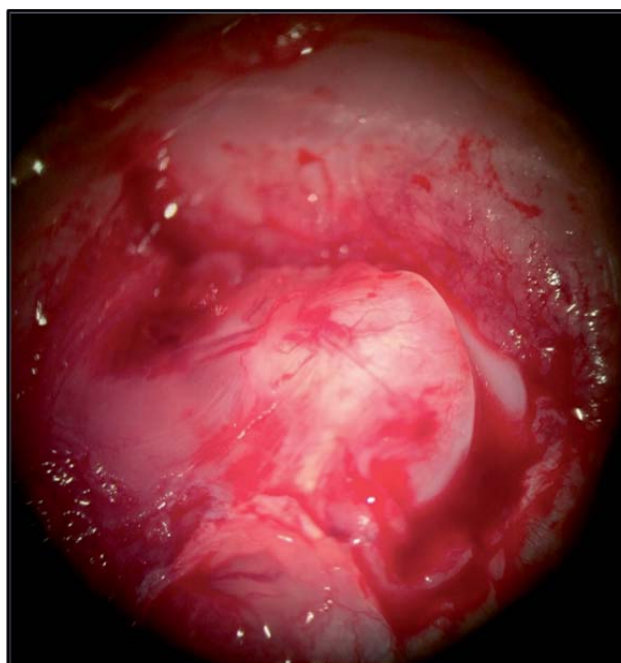


Figura 24. Detalle de la vascularización del periostio del cóndilo femoral medial de la rata, procedente de la arteria genicular descendente, rama de la arteria femoral.

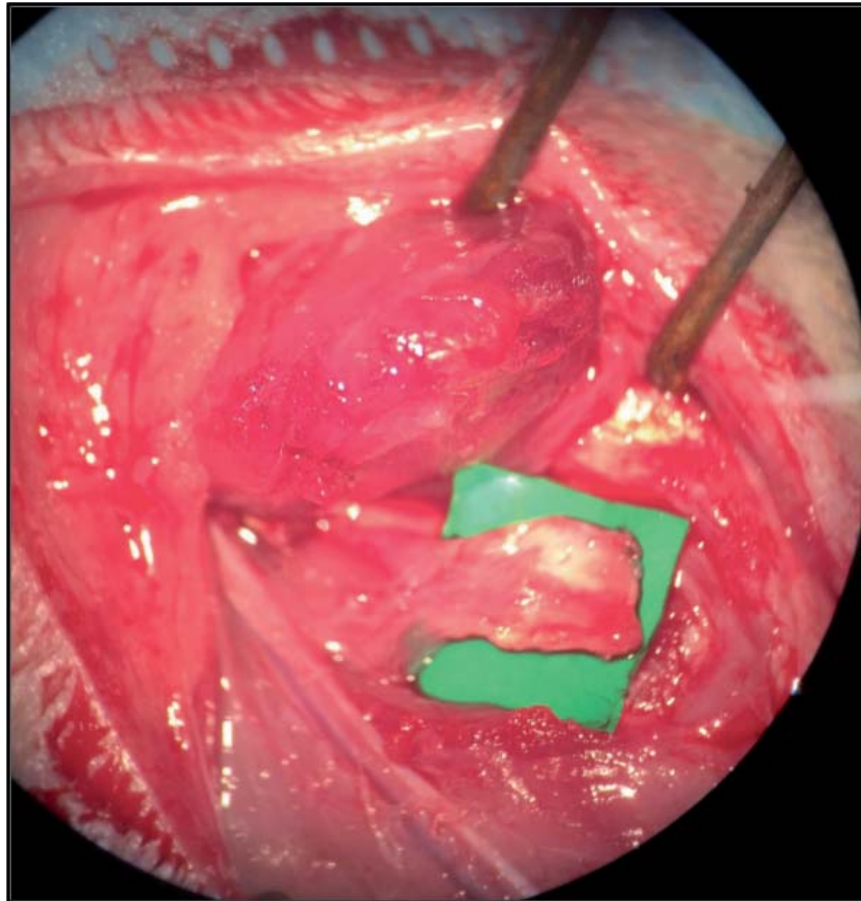


Figura 25. Fotografía del colgajo perióstico vascularizado de cóndilo femoral medial una vez levantado.

Para conseguir una mayor cobertura del aloinjerto, aprovechando el abordaje lateral que ya teníamos realizado para la resección ósea y reconstrucción con el aloinjerto estructural, se trasladaba el colgajo de medial a lateral por la cara anterior del fémur con la ayuda de hilos de sutura, submuscularmente. Durante este paso se controlaba en todo momento la integridad del pedículo vascular del colgajo, evitando la rotación o cualquier otro daño que se pudiera producir.

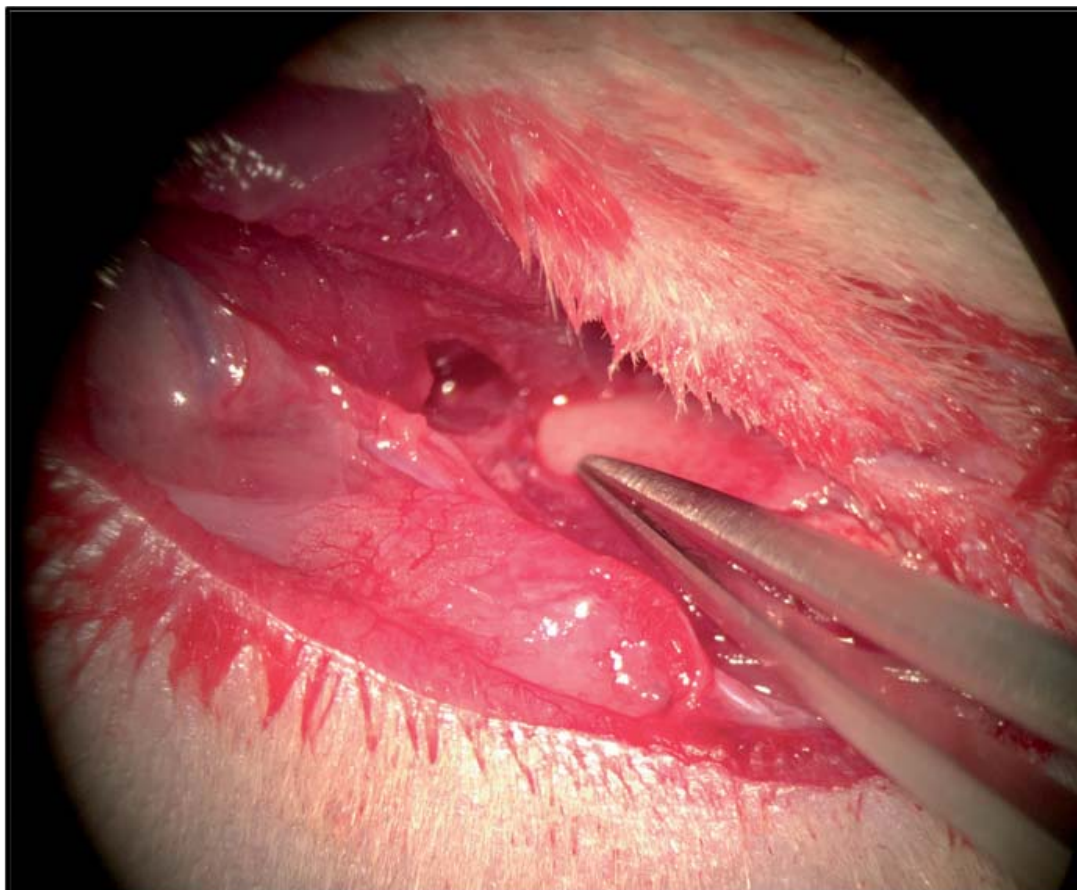


Figura 26. Vista desde la incisión medial. Detalle del pedículo del colgajo periostico vascularizado, una vez se ha trasladado submuscularmente por la cara anterior del fémur hacia lateral.

Una vez realizado teníamos el extremo distal del colgajo en la cara externa del muslo, y se fijaba mediante sutura de nylon 8.0 (Dafilon, Braun Surgical) al tejido adyacente. Para la cobertura del aloinjerto, si el tamaño del colgajo lo permitía, se cubría toda la superficie del aloinjerto, incluyendo ambas osteotomías. Cuando no era posible, se fijaba el colgajo centrado en el aloinjerto. La longitud limitada del pedículo no permitía alcanzar la cobertura de la osteotomía proximal en todos los casos. Finalizada la sutura del colgajo, se evaluaba la viabilidad del pedículo mediante un test de O'Brien o de la permeabilidad.

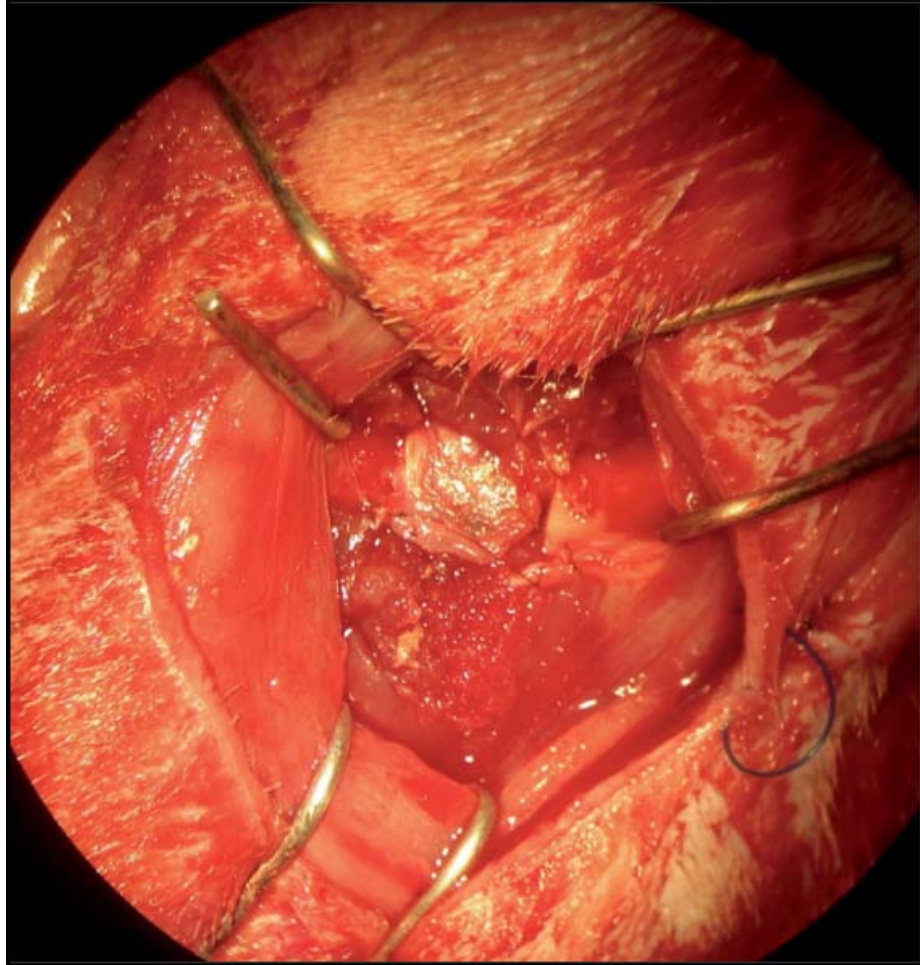


Figura 27. Vista desde la incisión lateral. Fotografía del colgajo perióstico vascularizado fijado sobre el aloinjerto óseo, recubriendo el injerto y las osteotomías.

Por último se procedía al cierre de la fascia muscular y el tejido subcutáneo mediante Novosyn 3.0 (Braun Surgical), y la incisión cutánea mediante Dafilon 4.0 (Braun Surgical).

Durante el procedimiento se registraron las siguientes variables: tamaño del colgajo perióstico y longitud del pedículo vascular. Tras el periodo de seguimiento, las ratas fueron eutanasiadas según el protocolo.

5.2.9. Protocolo de eutanasia y obtención de muestras

Las ratas estaban divididas en diferentes grupos de seguimiento, de 4, 6 y 10 semanas. La eutanasia se llevaba a cabo cuando la rata había completado el seguimiento según el grupo al cual pertenecía, en los quirófanos experimentales del VHIR. Siguiendo el protocolo de anestesia general se rasuraba la extremidad inferior izquierda y la región cervical, y se colocaba al animal en decúbito supino inmovilizado en la mesa quirúrgica.

En primer lugar se iniciaba el procedimiento con una incisión perpendicular al pliegue inguinal bilateral según la técnica de Fanua-Wilgis. Posteriormente, se realizaba una sección circular de la grasa del pliegue inguinal respetando la arteria que une esta grasa (arteria epigástrica superficial) a la arteria femoral. Se visualizaban los vasos femorales y se disecaban preservando la arteria circunfleja ilíaca superficial (rama posterior). Para disecarlos e individualizarlos se separaba primero el nervio crural del paquete arteriovenoso, y posteriormente la arteria de la vena. Posteriormente se individualizaba la arteria perióstica femoral (el pedículo del colgajo perióstico vascularizado) de la arteria epigástrica superficial y de la arteria poplítea. En este momento se evaluaba la viabilidad del pedículo mediante un test de O'Brien o de la permeabilidad.

Una vez evaluada la viabilidad del pedículo vascular del colgajo perióstico, se llevaba a cabo la eutanasia de la rata. Se realizaba una incisión longitudinal cervical media y una incisión transversal siguiendo el eje de las clavículas. A continuación se seccionaba el platismo en línea con las incisiones cutáneas y se levantaban dos colgajos triangulares de vértices supero-externos, de modo que las glándulas submaxilares quedaban debajo. Entre la musculatura esterno-tiroidea y

esterno-mastoidea se disecaba la arteria carótida común junto al nervio vago. Una vez bien identificada, se procedía a su sección consiguiendo así la eutanasia del animal, y se certificaba su muerte.

A continuación, se realizaba una incisión longitudinal lateral de fémur, desde el la cadera hasta la rodilla. Se desarticulaba en primer lugar la rodilla y se disecaba un plano submuscular hasta la cadera, que en último lugar era desarticulada también, obteniendo así el fémur intervenido. En el grupo periostio de 10 semanas (GP 10) de seguimiento se obtenían mediante el mismo procedimiento los fémures contralaterales para llevar a cabo el estudio biomecánico.

Todas las muestras se lavaban con solución salina y se fijaban en formaldehído/formalina tamponada.



Figura 28. Extracción de fémures intervenidos del grupo GP 6 tras la eutanasia de los animales.

5.2.10. Protocolo de evaluación de pseudoartrosis clínica

El estudio de evaluación clínica de la pseudoartrosis de las interfases se realizó en los quirófanos experimentales del VHIR.

El procedimiento se realizaba una vez se habían obtenido las muestras de fémures intervenidos tras la eutanasia de las ratas, antes de la fijación en formol. Se testaba clínicamente la movilidad de los focos de osteotomía proximal y distal, y se clasificaban los resultados en 0 - sin movilidad, 1 - movilidad menor del 50% de la circunferencia, y 2 - movilidad. Estos resultados se registraban tanto para la osteotomía proximal como la distal.

Además, en este punto se registraba la presencia de infección así como otras incidencias que se detectaran.

5.2.11. Protocolo de evaluación mediante microtomografía computarizada (*microCT*)

El estudio de imagen mediante *microCT* se dividía en dos partes. En primer lugar, se llevaba a cabo la obtención de las imágenes en la *Molecular Imaging Platform* del VHIR, siguiendo el protocolo *ex vivo Quantum Fx μ CT*. Se realizaban cortes longitudinales incluyendo las dos interfases aloinjerto-hueso huésped, y las imágenes obtenidas posteriormente eran reconstruidas. Los parámetros de escáner incluían un voltaje de 70kV a intensidad de 114 μ A, con una resolución de 16 μ m (2048 x 256).

Posteriormente, el mismo radiólogo especialista en patología del aparato locomotor, el Dr. De Albert, del servicio de radiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, independiente al estudio, realizó todas las evaluaciones radiológicas. Las zonas de transición entre el hueso huésped y el aloinjerto se examinaron cuidadosamente corte a corte en imágenes 2D. En las reconstrucciones 3D se evaluaron los parámetros recogidos en la Tabla 5 [228], incluyendo tanto el aloinjerto implantado como el hueso neoformado. El estudio fue ciego sin conocer al grupo al que pertenecía la muestra estudiada.

Variable	Puntuación
Presencia de neoformación ósea	
Amplia (> al diámetro del fémur)	3
Moderada (= al diámetro del fémur)	2
Discreta (< al diámetro del fémur)	1
Nula	0
Consolidación osteotomía proximal	
Unión (>90 %)	3
Moderados puentes óseos (>50 %)	2
Discretos puentes óseos (<50 %)	1
No unión	0
Consolidación osteotomía distal	
Unión (>90 %)	3
Moderados puentes óseos (>50 %)	2
Discretos puentes óseos (<50 %)	1
No unión	0
Fractura del aloinjerto	0
Sin fractura del aloinjerto	1
Osteolisis periimplante proximal	
No	0
Si	1
Osteolisis periimplante distal	
No	0
Si	1
PUNTUACIÓN TOTAL	21

Tabla 5. Variables evaluadas en el estudio mediante *microCT* de los fémures intervenidos.

5.2.12. Protocolo de estudio biomecánico

El estudio biomecánico se llevó a cabo por el Grupo de Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos de la Universidad Politécnica de Cataluña (Grupo BTT, UPC). Se incluyeron en este estudio 16 muestras de fémur: 8 pertenecientes al grupo periostio de 10 semanas de evolución (GP 10) y 8 que consistían en los fémures contralaterales de estas últimas ratas (Grupo Control). El objetivo era comparar la resistencia a las fuerzas de torsión de los fémures reconstruidos respecto a su control.

Los fémures eran entregados al grupo BTT al día siguiente de la eutanasia de los animales, envueltos individualmente con gasas mojadas en solución salina, con el fin de mantenerlos húmedos y frescos. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C para conservar las propiedades del tejido hasta el momento del ensayo.

Preparación de las muestras

La preparación de las muestras consistía en un encastado secuencial en cemento óseo *Cemento 3* (Surgival, USA) de ambos extremos de los fémures, a nivel de las epífisis, el mismo día que las muestras eran recibidas por el grupo BTT [288]. En primer lugar las muestras con cemento óseo a nivel de la epífisis distal se colocaban en el interior de moldes de teflón. La cavidad interna de los moldes de encastado presentaba la misma geometría que la cavidad interna de las mordazas de ensayos mecánicos, y posibilitaban la fijación directa de las muestras para su caracterización.



Figura 29. Epífisis inmersa en el cemento dentro del molde de teflón

Las muestras se mantenían en el molde hasta que el cemento fraguaba para asegurar su correcta consistencia mecánica, tras lo cual se procedía a la extracción de las muestras de los moldes para posibilitar la cementación del extremo contrario de los fémures, y se repetía el mismo proceso. Al final del proceso de preparación de muestras, se obtenían los fémures encastrados bilateralmente, en correctas condiciones para ser introducidos secuencialmente en el interior de las mordazas de ensayos biomecánicos para ser finalmente fracturados a torsión, tal y como puede observarse en la imagen (Figura 30)

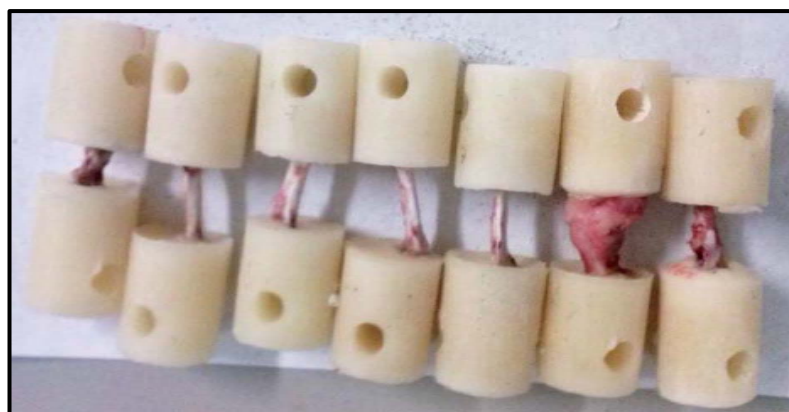


Figura 30. Fémures encastrados bilateralmente en cemento óseo por sus epífisis

Caracterización mecánica a torsión

Las muestras fueron analizadas mediante la realización de ensayos mecánicos de torsión hasta su rotura. Para la realización de los ensayos de torsión se utilizó una máquina servo hidráulica de ensayos mecánicos universal *Bionix 358* (MTS, USA), con una célula de carga de 25kN y bajo condiciones de velocidad constante de torsión de 1 grado por segundo, tal como ha sido reportado en la bibliografía [284–286].



Figura 31. Máquina de ensayos mecánicos *Bionix-370* (MTS, USA)

Estudio estadístico

Con el objetivo de determinar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos de resistencia a torsión, se realizó un estudio estadístico sobre los valores adquiridos. Para ello se analizaron los resultados numéricos utilizando el software estadístico *Minitab16®*, tratando los resultados mediante los test de análisis de varianzas *ANOVA* y *Kruskal-Wallis*, en función de si cumplían o no una distribución normal. Se determinó un intervalo de confianza del 95% indicando diferencias estadísticamente significativa para $p < 0.05$.

5.2.13. Protocolo de estudio de microscopía confocal

El estudio de fluorescencia microscópica confocal se realizó en la Unidad de Histología del Hospital Universitario del Bellvitge (Universidad de Barcelona). El objetivo de este estudio era objetivar el papel que ejercía el colgajo perióstico en la integración ósea del aloinjerto estructural. Para llevarlo a cabo, se realizaron diferentes marcajes fluorescentes secuenciales durante el tiempo de seguimiento de las ratas, para valorar la progresión de la osteogénesis en el aloinjerto óseo. Durante el proceso de mineralización, las tinciones fluorescentes se incorporaron al frente de mineralización mediante un proceso de quelación. Las tinciones utilizadas en nuestro estudio fueron *oxytetraciline* 25 mg/Kg (Engemicina, MSD Animal Health), *calcein green* 20 mg/kg (*Calcein*, C0875 Sigma, Sigma-Aldrich) y *xyleneol orange* 90 mg/Kg (*Xyleneol Orange tetrasodium salt*, 33825 Fluka, Sigma-Aldrich).

Todas las ratas del estudio recibieron un primer marcaje el día de la intervención con *oxytetracycline* mediante una inyección intramuscular. Las ratas del grupo de seguimiento de 4 semanas, además recibieron una nueva inyección el día de la eutanasia. En los grupos de 6 y 10 semanas se administró *calcein green* (subcutánea) en la cuarta semana de seguimiento. El *xylene orange* solamente fue administrado a las ratas del grupo de seguimiento de 10 semanas, en la 6ª semana de seguimiento (Figura 32).

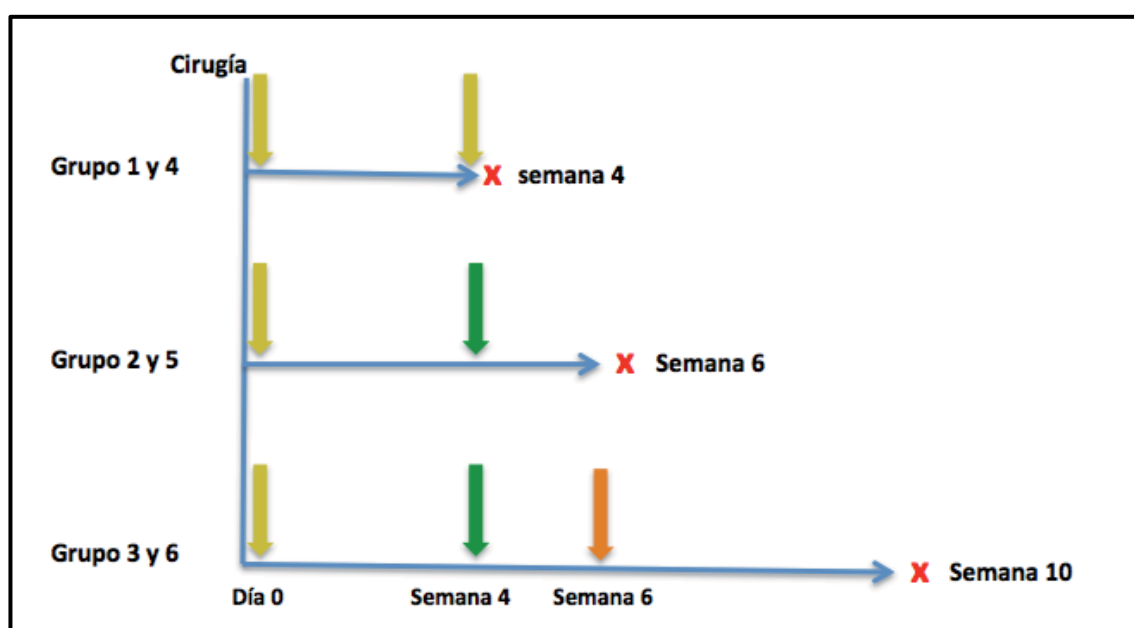


Figura 32. Protocolo de administración de marcaje de fluorocromos en los diferentes grupos de estudio. *Oxytetracycline* (flecha amarilla), *Calcein green* (flecha verde), *Xylene orange* (flecha naranja).

Tras la eutanasia, las muestras fueron se limpiaron con solución salina y se fijaron en formaldehído. No fue necesario retirar el implante.

Las muestras fijadas fueron trasladadas a la Unidad de Histología del Hospital Universitario de Bellvitge. En el laboratorio experimental se llevó a cabo un proceso de deshidratación gradual con etanol. Una vez completado este proceso, las muestras fueron cortadas en el eje longitudinal del fémur para incluir tanto las interfases aloinjerto-hueso huésped como el área de contacto entre el

colgajo perióstico y el aloinjerto. Posteriormente fueron incluidas en resina (*Resina Tecnovit 7200VLC, Leica Biosystems*) y se llevó a cabo el proceso de pulido hasta obtener un grosor final aproximado de 50 μm , para ser evaluadas posteriormente bajo el microscopio de fluorescencia (Figura 33).



Figura 33. Muestras de fémures de rata cortados, incluidas en resina y pulidas para su evaluación bajo microscopía de fluorescencia.

A continuación, las muestras fueron trasladadas al departamento de histología de la facultad de Biología (Universidad de Barcelona). Se llevó a cabo el análisis bajo microscopia de fluorescencia (microscopio confocal espectral Leica SP2, *Leica Microsystems*), utilizando filtros de longitud de onda de 365-490 nm (*oxytetracycline*), 436-495 nm (*caclein green*) y 375-570 nm (*xyleneol orange*).

El marcaje con fluorocromos fue usado para evaluar el depósito activo de hueso en diferentes cortes de tiempo, que se produce poco tiempo después de su administración. Se evaluaron los diferentes patrones de neoformación ósea. Al realizar diferentes marcajes, se pudo objetivar también la velocidad de depósito ósea. Se calculó la tasa de aposición ósea mediante la medición de la distancia entre los tres diferentes marcajes y relacionándolas con los diferentes tiempos en los cuales los marcajes fueron administrados.

5.2.14. Protocolo de estudio mediante microscopia electrónica de barrido

El estudio mediante microscopia electrónica de barrido (*scanning electron microscope*, SEM) se llevó a cabo por el Grupo de Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos de la Universidad Politécnica de Cataluña (Grupo BTT, UPC). Este proceso se llevó a cabo tras la evaluación de las muestras bajo el microscopio de fluorescencia.

Las muestras incluidas en resina y pulidas se recubrieron con carbono grafito mediante la utilización de un equipo de *sputtering*, y se añadió cinta de aluminio, con lo que se dotó a las muestras de un recubrimiento metálico que asegurase la conducción eléctrica necesaria para su observación mediante microscopia electrónica (Figura 34).

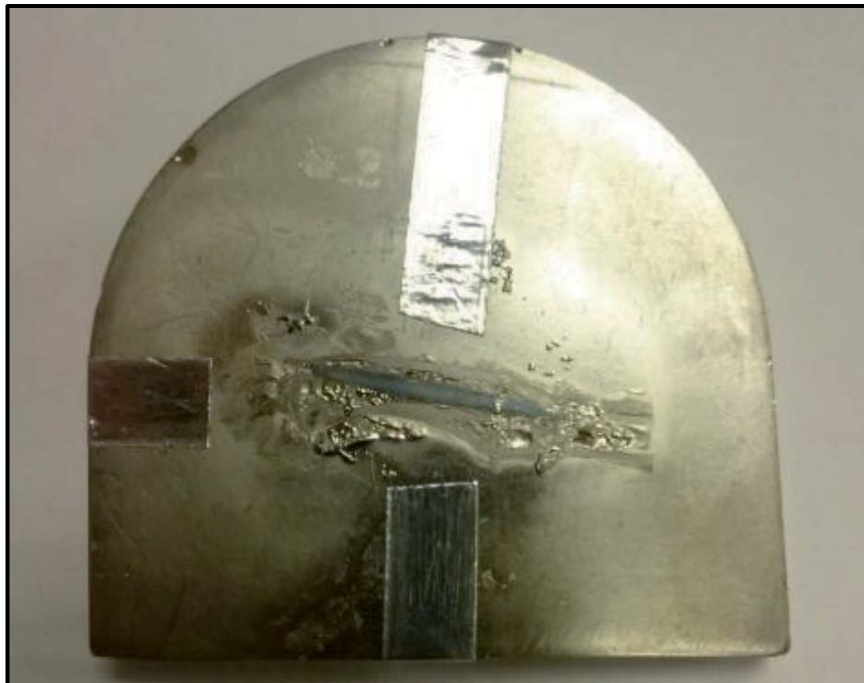


Figura 34. Muestras de fémur de rata recubiertas con carbono grafito y cinta de aluminio, para su observación bajo microscopía electrónica de barrido.

Las muestras se observaron utilizando un microscopio electrónico de barrido FIB/SEM modelo *Surface Scanning Electron Focused Ion Beam Zeiss* modelo Neon40 con columna GEMINIS (*Carl Zeiss, Alemania*) (Figura 35). Este equipo está dotado de un detector de electrones *back-scattered* (BSE) que permite la identificación de los diferentes elementos presentes en las muestras en función de su composición química. De este modo, se puede diferenciar el estado de maduración del tejido óseo según su nivel de mineralización.

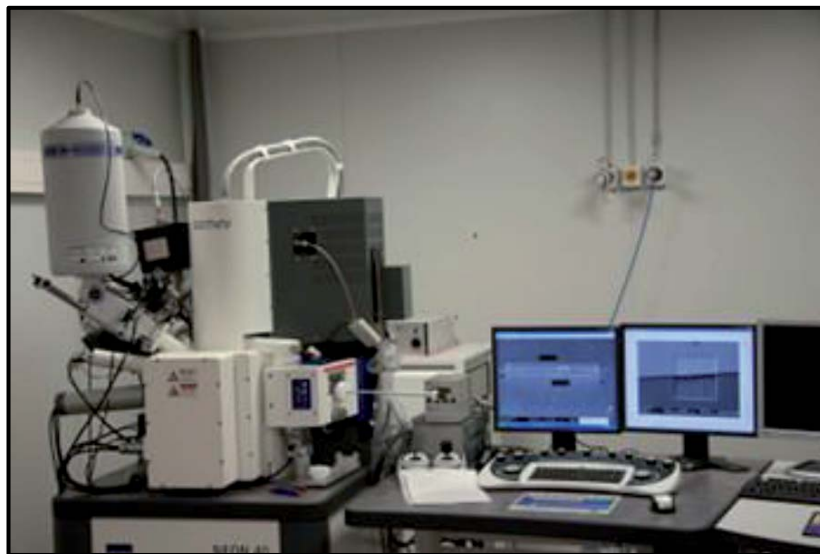


Figura 35. Microscopio SEM/FIB Zeiss modelo Neon40 utilizado para el estudio de microscopia electrónica de barrido.

Todas las muestra fueron observadas bajo las mismas condiciones de trabajo, utilizando un potencial de 15kV y una WD (*working distance*) de aproximadamente 8 mm. Las muestras se observaron al mínimo de aumentos posible con la intención de alcanzar la mayor área de observación posible, lo cual resultó en una magnificación de 75x aumentos.

Se realizaron escaneos completos de toda la superficie en 2 de las muestras (GA10-8 y GP 10-7). Los escaneos se realizaron adquiriendo imágenes individuales a 100x aumentos y ensamblándolas posteriormente para obtener una imagen de

alta resolución de todo el área de interés, lo que se conoce como *stitching*. Este proceso se llevó a cabo con el software *SmartStitch* (Zeiss, Alemania). Las mediciones se realizaron con el software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016).

5.2.15. Protocolo de análisis histológicos

La preparación de las muestras se llevó a cabo por el Grupo de Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos de la Universidad Politécnica de Cataluña (Grupo BTT, UPC). Se seleccionaron muestras representativas de los grupos de 10 semanas de seguimiento.

Este proceso se realizó tras la evaluación de las muestras bajo el microscopio electrónico de barrido, por lo que ya habían sido recubiertas con carbono mediante la *sputtering*. Por este motivo, las muestras fueron sometidas a un primer proceso de pulido con papeles de pulir de SiC de granulometría P4000 con el fin de eliminar la capa de carbono que cubría la superficie y no rebajar la superficie a observar. El pulido de las muestras se realizó utilizando pulidoras *Exakt 400CS* (Exakt, Alemania).

Una vez pulidas a P4000, las muestras fueron adheridas a una placa histológica de PMMA (Exakt, Alemania) mediante un proceso de fotopolimerización del monómero *Technovil 7210 VLC* (Kulzer-Heraeus, Alemania) mediante la exposición a luz ultravioleta. De este modo, las muestras quedaron completamente adheridas a las respectivas placas y pudieron ser cortadas a 1 mm

de grosor. El corte se realizó utilizando una sierra *EXAKT* modelo 300 (*Exakt*, Alemania) con banda de diamante refrigerada.

Posteriormente, las muestras fueron pulidas nuevamente con papeles de SiC con diferentes granulometrías por el lado de la superficie cortada hasta alcanzar una lámina delgada de muestra de un grosor aproximado entre 50 y 100 μm . Una vez obtenidas las láminas se procedió al proceso de tinción histológica. Para ello se utilizaron los reactivos correspondientes a la tinción de *Tricrómico de Masson Goldner* adaptada para muestras embebidas en plástico, el cual consta de los siguientes pasos:

1. Hidratación
2. Tinción con Hematoxilina
3. Tinción con solución de *Masson*
4. Tinción con *Orange-G*
5. Tinción con *Light Green*
6. Lavado y secado

Una vez teñidas, las muestras fueron montadas mediante un montaje *DPX Surgipath®* (*Leica*, Suiza).

Las muestras se analizaban mediante microscopio óptico (*Olympus BX41*). La misma patóloga, la Dra. Cristina Manzanares, del servicio de anatomía patológica del Hospital de Bellvitge (Universidad de Barcelona, Barcelona), independiente al estudio, realizó las evaluaciones histológicas. El estudio fue ciego sin conocer el grupo de la muestra estudiada.

Por cada una de las muestras estudiada se evaluó la presencia de signos de inflamación aguda o crónica. También el paso o no de trabéculas óseas entre el

aloinjerto y los fragmentos óseos femorales proximal y distal y la presencia y estructura de la neoformación ósea por parte del periostio.

Coloración	Tejido
Colágeno, fibras reticulares, amiloide	Verde azulado
Músculo y fibrina	Rojo, marrón
Citoplasma	Rosado
Núcleos	Negro o azul grisáceo
Hueso neoformado	Verde/azul
Hueso maduro	Coloración variable
Osteoide	Naranja, verde
Cartílago	Púrpura

Tabla 6. Coloración de los componentes según la tinción *Tricrómico de Masson Goldner*

5.2.16. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS 18.0. Los resultados se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) y se analizaron mediante análisis de varianza de *Kruskal-Wallis*. Las variables cualitativas se compararon mediante la prueba exacta *Chi-Cuadrado*. Se aceptó una diferencia significativa de $p < 0.05$.

5.2.17. Distribución de los animales

- **Cálculo muestral inicial**

- Se acepta error tipo I o falsos positivos como 5%
- Se acepta error tipo II o falsos negativos como 20% (potencia del 80%)
- Número de animales por grupo: 32 ratas

- **Grupo control. N = 32.**

- a. Grupo 1 – GA 4 (grupo aloinjerto / 4 semanas de seguimiento). N = 8

- El defecto óseo segmentario se reconstruyó con un aloinjerto óseo estructural únicamente.
- La eutanasia se realizó a las 4 semanas de seguimiento.
- Recibieron marcaje fluorescente con *oxytetraciline* en el momento de la cirugía.
- A todas las ratas del grupo se les realizó estudio tomográfico e histológico.

- b. Grupo 2 – GA 6 (grupo aloinjerto / 6 semanas de seguimiento). N = 8

- El defecto óseo segmentario se reconstruyó con un aloinjerto óseo estructural únicamente.
- La eutanasia se realizó a las 6 semanas de seguimiento.
- Recibieron marcaje fluorescente con *oxytetraciline* en el momento de la cirugía y con *calcein green* a las 4 semanas.
- A todas las ratas del grupo se les realizó estudio tomográfico e histológico.

c. Grupo 3 – GA 10 (grupo aloinjerto / 10 semanas de seguimiento). N = 16

- El defecto óseo segmentario se reconstruyó con un aloinjerto óseo estructural únicamente.
- La eutanasia se realizó a las 10 semanas de seguimiento.
- Recibieron marcaje fluorescente con *oxytetraciclina* en el momento de la cirugía, con *calcein green* a las 4 semanas y con *xlenol orange* a las 6 semanas de seguimiento.
- A todas las ratas del grupo se les realizó estudio tomográfico. A 8 ratas de este grupo se les realizó estudio histológico y a las otras 8 biomecánico.

• **Grupo experimental. N = 32.**

a. Grupo 4 – GP 4 (grupo periostio / 4 semanas de seguimiento). N = 8

- El defecto óseo segmentario se reconstruyó con un aloinjerto óseo estructural que será recubierto por un colgajo perióstico vascularizado.
- La eutanasia se realizó a las 4 semanas de seguimiento.
- Recibieron marcaje fluorescente con *oxytetraciclina* en el momento de la cirugía.
- A todas las ratas del grupo se les realizó estudio tomográfico e histológico.

b. Grupo 5 – GP 6 (grupo periostio / 6 semanas de seguimiento). N = 8

- El defecto óseo segmentario se reconstruyó con un aloinjerto óseo estructural que será recubierto por un colgajo perióstico vascularizado.
- La eutanasia se realizó a las 6 semanas de seguimiento.
- Recibieron marcaje fluorescente con *oxytetraciline* en el momento de la cirugía y con *calcein green* a las 4 semanas.
- A todas las ratas del grupo se les realizó estudio tomográfico e histológico.

c. Grupo 6 – GP 10 (grupo periostio / 10 semanas de seguimiento). N = 16

- El defecto óseo segmentario se reconstruyó con un aloinjerto óseo estructural que será recubierto por un colgajo perióstico vascularizado.
- La eutanasia se realizó a las 10 semanas de seguimiento.
- Recibieron marcaje fluorescente con *oxytetraciline* en el momento de la cirugía, con *calcein green* a las 4 semanas y con *xyleneol orange* a las 6 semanas de seguimiento.
- A todas las ratas del grupo se les realizó estudio tomográfico. A 8 ratas de este grupo se les realizó estudio histológico y a las otras 8 biomecánico.

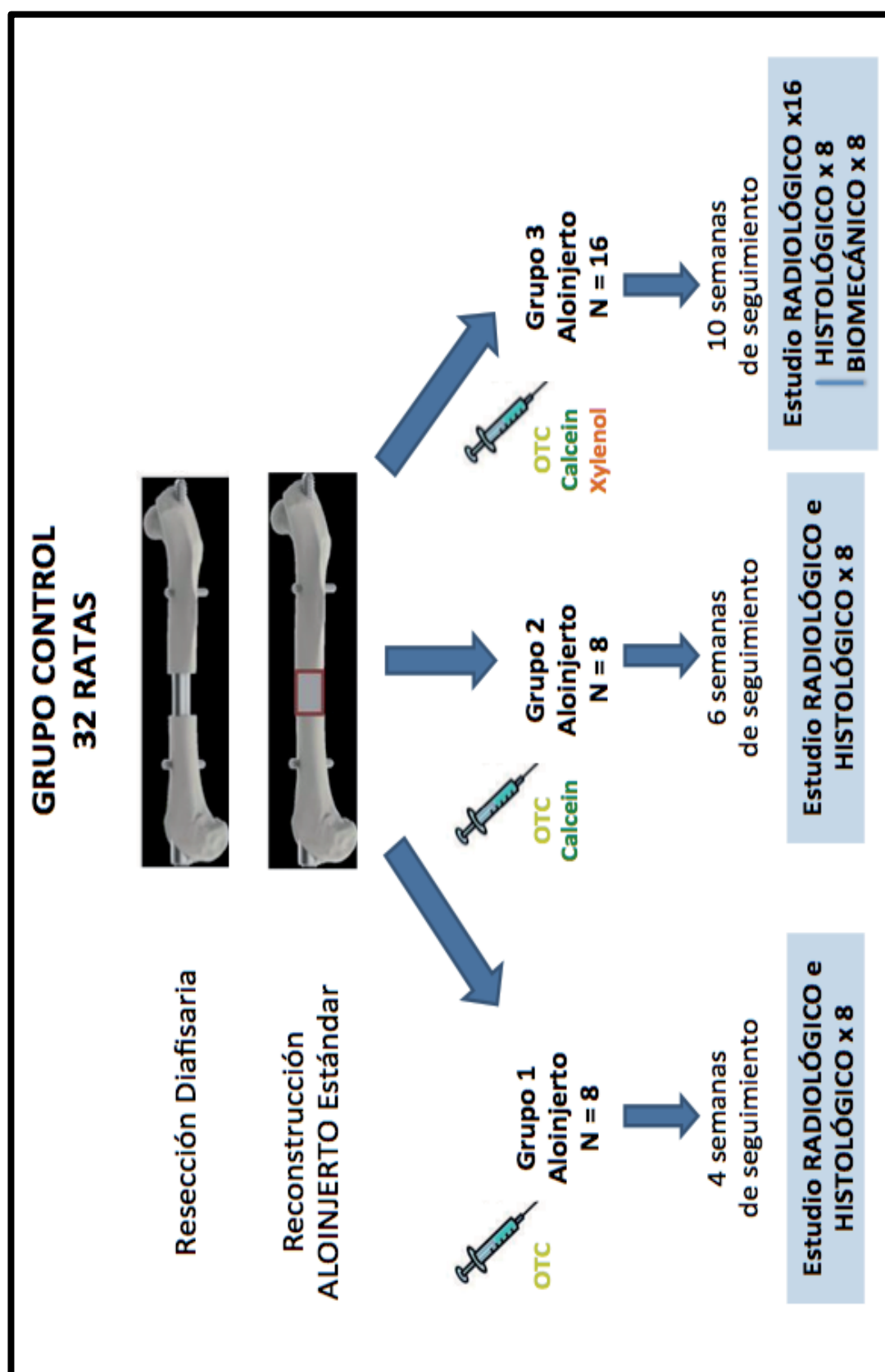


Figura 36. Distribución de los animales del grupo control según el tiempo de seguimiento.

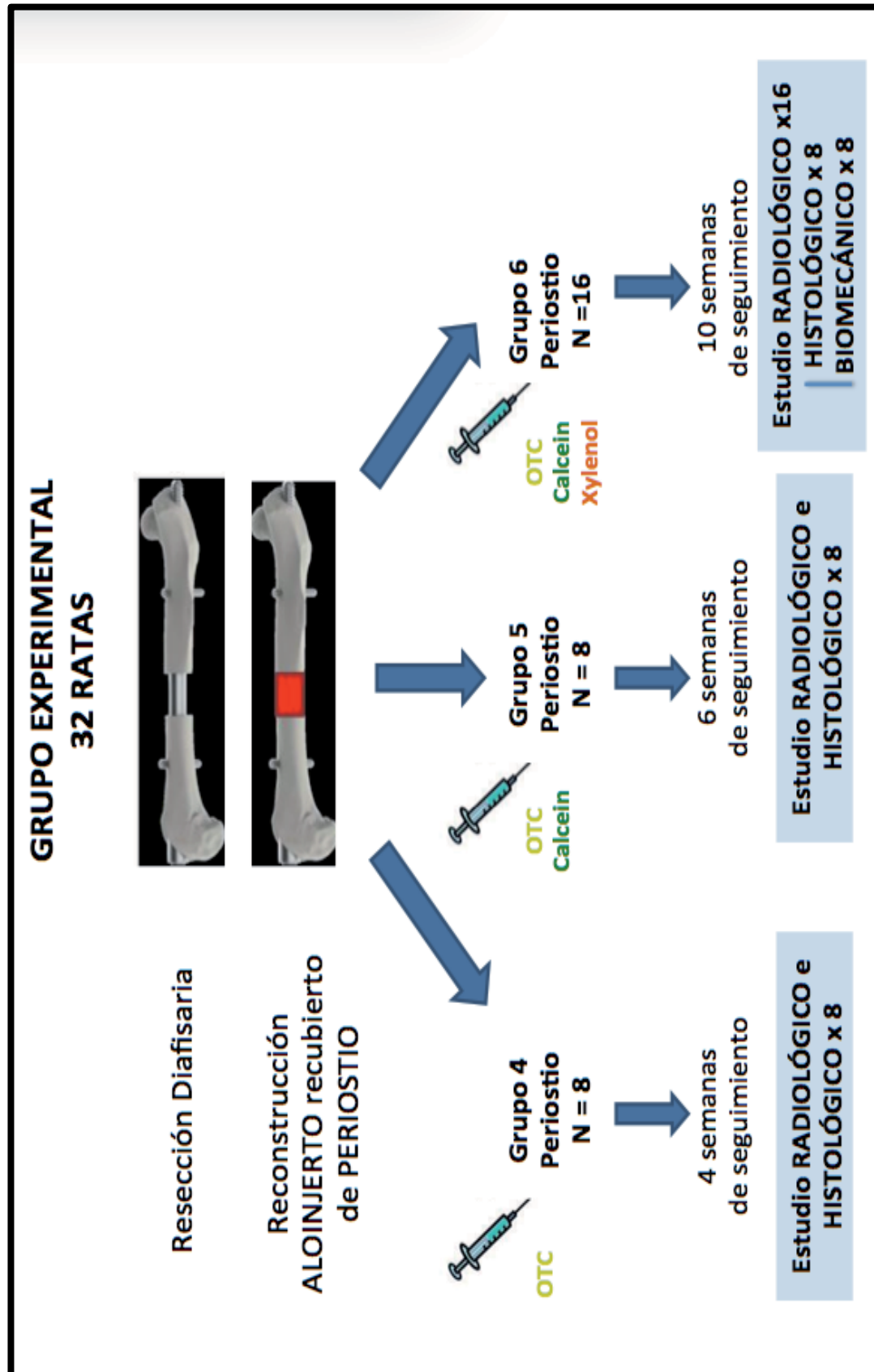


Figura 37. Distribución de los animales del grupo experimental según el tiempo de seguimiento.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación clínica

- Grupo GA 4

- Ningún animal desarrolló complicaciones agudas ni subagudas durante el periodo de seguimiento.
- Todos los animales presentaron cojera de la extremidad intervenida durante la primera semana del postoperatorio. La cojera fue cediendo progresivamente.
- No presentaron alteraciones a nivel de la herida quirúrgica ni de la extremidad intervenida.
- Las ratas presentaron un pelaje suave, y no se objetivó ninguna alteración ocular o física de otro tipo.
- Ningún animal presentó automutilaciones u otra alteración de la conducta durante el seguimiento.
- No se objetivó ningún caso de movilización del implante en el control radioscópico a la semana postoperatoria.

- Grupo GA 6

- Ningún animal desarrolló complicaciones agudas ni subagudas durante el periodo de seguimiento.
- Todos los animales presentaron cojera de la extremidad intervenida durante la primera semana del postoperatorio. La cojera fue cediendo progresivamente.

- No presentaron alteraciones a nivel de la herida quirúrgica ni de la extremidad intervenida.
 - Las ratas presentaron un pelaje suave, y no se objetivó ninguna alteración ocular o física de otro tipo.
 - Ningún animal presentó automutilaciones u otra alteración de la conducta durante el seguimiento.
 - No se objetivó ningún caso de movilización del implante en el control radioscópico a la semana postoperatoria.
- Grupo GA 10
 - Ningún animal desarrolló complicaciones agudas ni subagudas durante el periodo de seguimiento.
 - Todos los animales presentaron cojera de la extremidad intervenida durante la primera semana del postoperatorio. La cojera fue cediendo progresivamente.
 - Dos de las ratas presentaron una **dehiscencia de la herida quirúrgica**, que requirió reintervenciones a los 4 días y la semana postoperatoria, respectivamente. Una de las ratas presentó un **hematoma en el muslo** durante el postoperatorio inmediato, que se reabsorbió espontáneamente sin permanecer signos físicos de éste a los 3 días postoperatorios.
 - Las ratas presentaron un pelaje suave, y no se objetivó ninguna alteración ocular o física de otro tipo.
 - Ningún animal presentó automutilaciones u otra alteración de la conducta durante el seguimiento.

- No se objetivó ningún caso de movilización del implante en el control radioscópico a la semana postoperatoria.
- Grupo GP 4
 - Ningún animal desarrolló complicaciones agudas ni subagudas durante el periodo de seguimiento
 - Todos los animales presentaron cojera de la extremidad intervenida durante la primera semana del postoperatorio. La cojera fue cediendo progresivamente.
 - Una de las ratas intervenidas presentó una **dehiscencia de la herida quirúrgica** que requirió reintervención a los 4 días postoperatorios.
 - Las ratas presentaron un pelaje suave, y no se objetivó ninguna alteración ocular o física de otro tipo.
 - Ningún otro animal presentó automutilaciones u otra alteración de la conducta durante el seguimiento.
 - No se objetivó ningún caso de movilización del implante en el control radioscópico a la semana postoperatoria.
- Grupo GP 6
 - Una de las ratas presentó una **fractura unicortical del fémur distal**, no articular, intraoperatoriamente. Se evaluó objetivándose que no comprometía la estabilidad de la reconstrucción, motivo por el cual se decidió no excluir del estudio.
 - Ningún animal desarrolló complicaciones agudas ni subagudas durante el periodo de seguimiento.

- Todos los animales presentaron cojera de la extremidad intervenida durante la primera semana del postoperatorio. La cojera fue cediendo progresivamente.
 - No presentaron alteraciones a nivel de la herida quirúrgica ni de la extremidad intervenida.
 - Las ratas presentaron un pelaje suave, y no se objetivó ninguna alteración ocular o física de otro tipo.
 - Ningún animal presentó automutilaciones u otra alteración de la conducta durante el seguimiento.
 - No se objetivó ningún caso de movilización del implante en el control radioscópico a la semana postoperatoria.
- Grupo GP 10
 - Ningún animal desarrolló complicaciones agudas ni subagudas durante el periodo de seguimiento.
 - Todos los animales presentaron cojera de la extremidad intervenida durante la primera semana del postoperatorio. La cojera fue cediendo progresivamente.
 - No presentaron alteraciones a nivel de la herida quirúrgica ni de la extremidad intervenida.
 - Las ratas presentaron un pelaje suave, y no se objetivó ninguna alteración ocular o física de otro tipo.
 - Ningún animal presentó automutilaciones u otra alteración de la conducta durante el seguimiento.

- No se objetivó ningún caso de movilización del implante en el control radioscópico a la semana postoperatoria.

6.2 Peso

- Todos los animales experimentaron un aumento progresivo del peso hasta el final del seguimiento (Gráfico 1) (Tabla 7).
- *No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la evolución del peso entre los animales del grupo control (GA) y su respectivo grupo experimental (GP) ($p[GA4-GP4]=0.30$; $p[GA6-GP6]=0.15$; $p[GA10-GP10]=0.39$).*

	Inicial	Sem 2	Sem 4	Sem 6	Sem 8	Sem 10
GA 4	449 ± 59	511 ± 52	563 ± 45			
GA 6	368 ± 40	439 ± 37	515 ± 34	584 ± 34		
GA 10	374 ± 37	432 ± 32	490 ± 29	545 ± 35	585 ± 40	629 ± 44
GP 4	361 ± 37	452 ± 27	539 ± 23			
GP 6	384 ± 65	431 ± 42	504 ± 34	558 ± 41		
GP 10	370 ± 67	428 ± 53	480 ± 47	533 ± 53	575 ± 60	613 ± 63

Tabla 7. Distribución de peso por grupos y temporalidad. Los resultados se indican en peso medio (gramos ± SD).

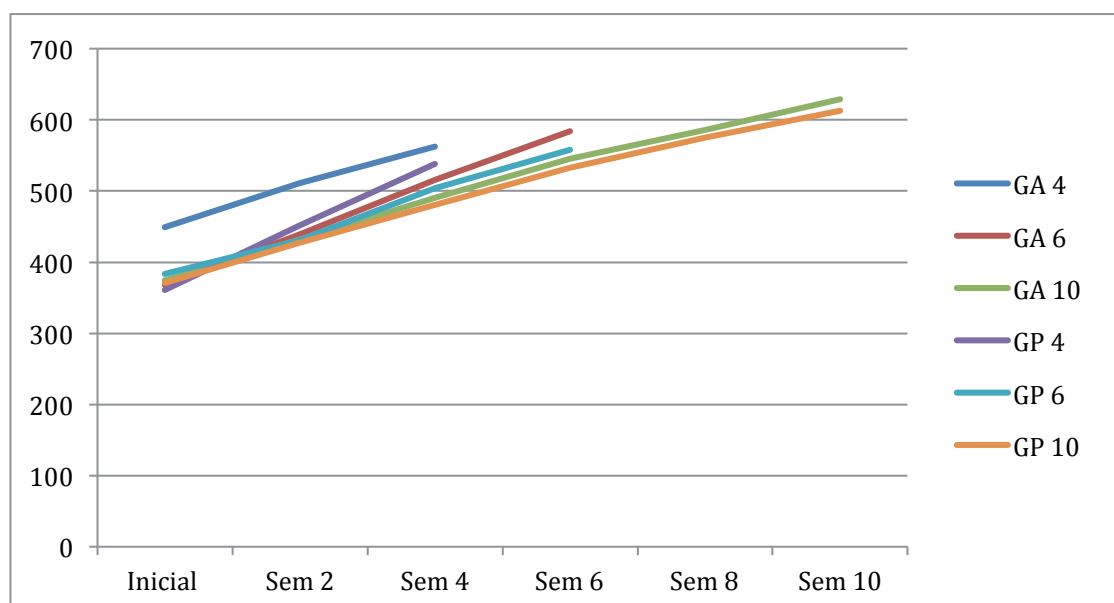


Gráfico 1. Evolución del peso medio por grupos. Se observa un aumento progresivo del peso con evolución homogénea en todos los grupos.

6.3 Supervivencia / Mortalidad

- Las primeras dos ratas intervenidas del grupo GP 4 fallecieron el primer día postoperatorio. A la exploración se objetivaron signos claros de haber sido agredidas por otra rata. A partir de entonces, las siguientes ratas fueron mantenidas aisladas durante el primer día postoperatorio y después fueron reubicadas en sus jaulas. No se produjeron nuevos incidentes de este tipo. Estas dos ratas fueron excluidas del estudio y substituidas.
- La tasa supervivencia fue del 100% de los animales en todos los grupos.

6.4 Viabilidad del pedículo vascular del colgajo

- Grupo GP 4
 - Todos los pedículos vasculares evaluados presentaron un test de permeabilidad positivo inicial (8/8, 100%).
 - En la evaluación del pedículo vascular del colgajo al final del periodo de seguimiento, se objetivó una mayor dificultad para la disección de este debido a la fibrosis que existía de la intervención previa. A pesar de ello, se pudo llevar a cabo el test de permeabilidad en todas las ratas del grupo. Todos los pedículos vasculares evaluados presentaron un test de permeabilidad positivo final (8/8, 100%).
 - A la valoración bajo el microscopio quirúrgico, no se observó la presencia de trombosis del pedículo vascular en ningún caso.

- Grupo GP 6
 - Todos los pedículos vasculares evaluados presentaron un test de permeabilidad positivo inicial (8/8, 100%).
 - En la evaluación del pedículo vascular del colgajo al final del periodo de seguimiento, se objetivó una mayor dificultad para la disección de este debido a la fibrosis que existía de la intervención previa. Por la dificultad técnica que existía, uno de los pedículos se lesionó durante el proceso de disección. Todos los pedículos vasculares evaluados presentaron un test de permeabilidad positivo final (7/7, 100%).
 - A la valoración bajo el microscopio quirúrgico, no se observó la presencia de trombosis del pedículo vascular en ningún caso.

- Grupo GP 10
 - Todos los pedículos vasculares evaluados presentaron un test de permeabilidad positivo inicial (8/8, 100%).
 - En la evaluación del pedículo vascular del colgajo al final del periodo de seguimiento, se objetivó una mayor dificultad para la disección de este debido a la fibrosis que existía de la intervención previa. A pesar de ello, se pudo llevar a cabo el test de permeabilidad en todas las ratas del grupo. Todos los pedículos vasculares evaluados presentaron un test de permeabilidad positivo final (8/8, 100%).
 - A la valoración bajo el microscopio quirúrgico, no se observó la presencia de trombosis del pedículo vascular en ningún caso.

6.5 Exploración del fémur intervenido

- Grupo GA 4

- En dos de los fémures del grupo se objetivó sinovitis a nivel de la entrada de la aguja en el trocánter mayor.
- En todos los fémures se evidenció movilidad a nivel del foco de osteotomía proximal y distal (100%) (Tabla 8) (Gráfica 2).
- En uno de los fémures (1/8) se evidenció la presencia de pus a nivel de la pseudoartrosis (pseudoartrosis séptica).

- Grupo GA 6

- No se objetivó ningún caso de sinovitis a nivel del trocánter mayor.
- En todos los fémures excepto uno se evidenció movilidad a nivel del foco de osteotomía proximal y distal (87.5%).
- En dos de los fémures (2/8) se evidenció la presencia de pus a nivel de la pseudoartrosis (pseudoartrosis séptica).

- Grupo GA 10

- No se objetivó ningún caso de sinovitis a nivel del trocánter mayor.
- En 11 de los se evidenció movilidad a nivel del foco de osteotomía proximal y distal; en dos de los fémures movilidad a nivel de la osteotomía distal y en un caso proximal (78.1%).
- En uno de los fémures (1/8) se evidenció la presencia de pus a nivel de la pseudoartrosis (pseudoartrosis séptica).

- Grupo GP 4
 - No se objetivó ningún caso de sinovitis a nivel del trocánter mayor.
 - No se evidenció ningún caso de movilidad del foco de osteotomía distal. Se evidenció movilidad del foco proximal en 5 de los fémures evaluados (31.25%).
 - En ningún caso se detectaron signos de infección.

- Grupo GP 6
 - No se objetivó ningún caso de sinovitis a nivel del trocánter mayor.
 - Se evidenció movilidad del foco de osteotomía distal en uno de los fémures evaluados. Se evidenció movilidad clara del foco proximal en 4 de los fémures evaluados, y dudosa otro (34.4%).
 - En ningún caso se detectaron signos de infección.

- Grupo GP 10
 - No se objetivó ningún caso de sinovitis a nivel del trocánter mayor.
 - Se evidenció movilidad clara del foco de osteotomía proximal en uno de los fémures evaluados. Se evidenció movilidad clara del foco distal en 4 de los fémures evaluados. En uno de los fémures se objetivó dudosa movilidad del foco de osteotomía tanto proximal como distal (18.8%).
 - En uno de los fémures se evidenció la presencia de pus a nivel de la pseudoartrosis (pseudoartrosis séptica).

Grupo	OT proximal	OT distal	TOTAL (n=16)
GA 4	16/16	16/16	32/32 (100%)
GA 6	14/16	14/16	28/32 (87.5%)
GA 10	24/32	26/32	50/64 (78.1%)
GP 4	10/16	0/16	10/32 (31.3%)
GP 6	9/16	2/16	11/32 (34.3%)
GP 10	3/32	9/32	12/64 (18.8%)

Tabla 8. Evaluación de movilidad de foco de osteotomía (OT) proximal y distal en los fémures intervenidos: sin movilidad (0 puntos), movilidad dudosa (1 punto), movilidad clara (2 puntos).

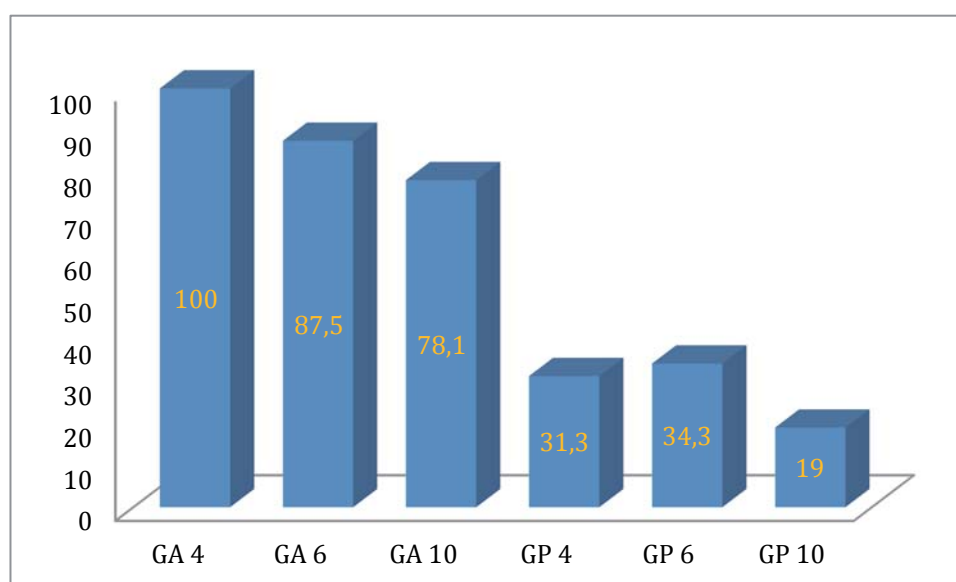


Gráfico 2. Tasa de movilidad de las interfases óseas en los diferentes grupos de estudio. Se observa una tasa de movilidad mayor en los grupos control GA.

En el análisis estadístico se calculó la odds ratio (OR) de riesgo de movilidad a nivel de las osteotomías al final de los seguimiento entre los diferentes grupos de estudio y su respectivo grupo control, y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 9).

Grupo	Odds ratio	Intervalo de confianza
4 semanas (GA 4-GP 4)	0	[0 – 0.13]
6 semanas (GA 6-GP 6)	0.04	[0.000867– 0.43]
10 semanas (GA 10-GP 10)	0.09	[0.02-0.33]

Tabla 9. Análisis estadístico de la *odds ratio* (OR) de riesgo de movilidad a nivel de las osteotomías entre los diferentes grupos de estudio y su respectivo grupo control.

6.6. Evaluación mediante microtomografía computarizada

En la Tabla 10 se muestran los valores medios obtenidos en los grupos de estudio tras la evaluación mediante *microCT*. En todos los grupos excepto el grupo GP 10 se observó una consolidación media tanto de las osteotomía proximal como distal menor del 50%. Se observó una neoformación ósea nula en la superficie del aloinjerto en los grupos en los que no se asoció periostio (GA), a diferencia de una formación de este mayor al diámetro del fémur en los grupos con periostio (GP). No se observaron diferencias entre los grupos en cuanto a la osteolisis periimplante, apareciendo en más del 75% de los casos en el fragmento de fémur distal, ni en la tasa de fractura del aloinjerto (Tabla 10).

	Consolidación OT proximal	Consolidación OT distal	NF ósea	Osteolisis proximal	Osteolisis distal	Fractura aloinjerto
GA4	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0.25 (2/8)	0.75 (6/8)	0.13 (1/8)
GA6	0.38 (3/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0.86 (7/8)	0.13 (1/8)
GA10	0.19 (3/16)	0.13 (2/16)	0 (0/16)	0 (0/16)	0.75 (12/16)	0.25 (4/16)
GP4	0.75 (6/8)	0.5 (4/8)	2.25 (18/8)	0.13 (1/8)	0.86 (7/8)	0.5 (4/8)
GP6	0 (0/8)	0.38 (3/8)	2.13 (17/8)	0 (0/8)	0.75 (6/8)	0.25 (2/8)
GP10	1.25 (20/16)	1.94 (31/16)	1.84 (31/16)	0 (0/16)	0.75 (12/16)	0.13 (2/16)

Tabla 10. Análisis mediante *microCT*. Se muestra la puntuación media por grupo de las diferentes variables evaluadas según la escala presentada en el apartado Material y Métodos. OT: osteotomía. NF: neoformación

• **Consolidación ósea**

- Se observó consolidación parcial o completa de las osteotomías distales en el 68.8% de las ratas del grupo GP10, y del 56.3% de las osteotomías proximales del mismo grupo, en comparación al grupo con el mismo periodo de seguimiento en el que no se había asociado el colgajo perióstico (GA 10), en las que se observaron signos de consolidación en el 12.5% de las osteotomías proximales y 6.25% en las osteotomías distales (Tabla 11) (Gráfico 3).
- Del total de ratas del grupo control (GA), sólo en una de las 4 ratas en las que se produjo consolidación fue a nivel de la osteotomía distal (25%), mientras que en el grupo experimental (GP), el porcentaje aumentó hasta el 59.3% (16/27).

	Consolidación OT proximal	Consolidación OT distal
GA4	0% (0/8)	0% (0/8)
GA6	12.5% (1/8)	0% (0/8)
GA10	12.5% (2/16)	6.25% (1/16)
GP4	25% (2/8)	37.5% (3/8)
GP6	0% (0/8)	25% (2/8)
GP10	56.3% (9/16)	68.8% (11/16)

Tabla 11. Tasa de consolidación evaluada por micro CT a nivel de la osteotomía (OT) proximal y distal en cada grupo de estudio.

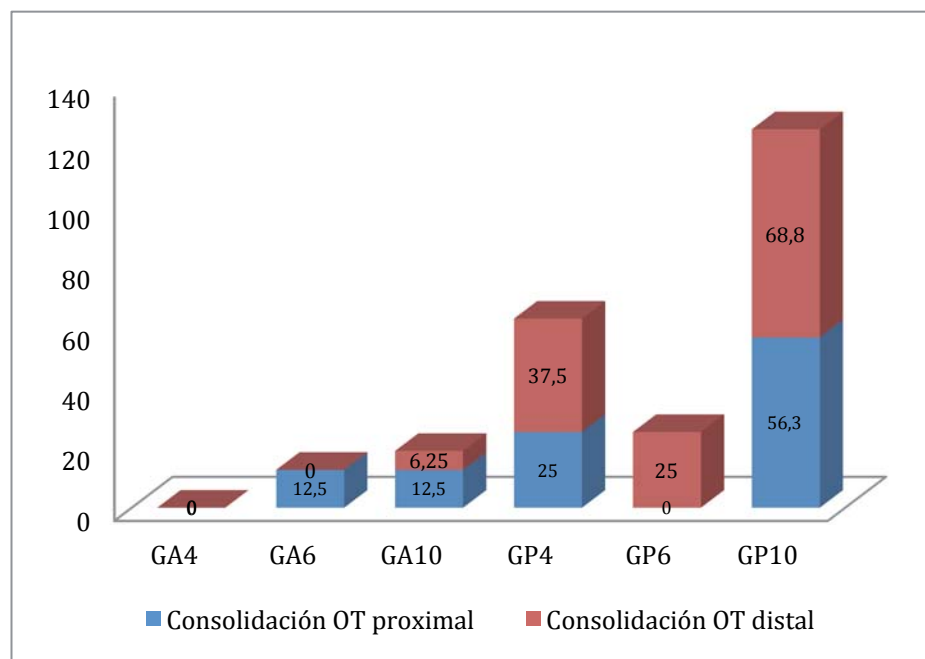


Gráfico 3. Tasa de consolidación evaluada por *microCT* a nivel de la osteotomía (OT) proximal y distal en cada grupo de estudio. Se observa una mayor tasa de consolidación en los grupos experimentales GP y a nivel de las osteotomías distales.

En el análisis estadístico se calculó la odds ratio (OR) o reducción absoluta de riesgo (RAR) de consolidación a nivel de las osteotomías al final del seguimiento entre los diferentes grupos de estudio y su respectivo grupo control, y solo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los de más seguimiento (GA 10-GP10) (Tabla 12).

Grupo	OR/RAR	Intervalo de confianza
4 semanas (GA 4-GP 4)	-0.06 (RAR)	[0.06 - -0.76]
6 semanas (GA 6-GP 6)	-0.31 (RAR)	[1.88 - -2.50]
10 semanas (GA 10-GP 10)	19.29 (OR)	[3.63 – 184.50]

Tabla 12. Análisis estadístico de la *odds ratio (OR)* / *reducción absoluta de riesgo (RAR)* de consolidación a nivel de las osteotomías proximal y distal entre los diferentes grupos de estudio y su respectivo grupo control.

- **Presencia de neoformación ósea**

- En ninguna de las muestras de los grupos control GA se observó presencia de neoformación ósea a nivel del aloinjerto (Gráfico 4).
- En todos los grupos experimentales GP se observó una presencia media de neoformación ósea moderada-amplia (igual o mayor diámetro del fémur).
- Para realizar el análisis estadístico se consideró que los valores 0 y 1 de la escala se correspondieran con la ausencia de neoformación ósea y los valores 2 y 3 con la presencia de esta. La tasa de presencia de neoformación ósea en el grupo experimental osciló entre el 75% y el 87.5%.

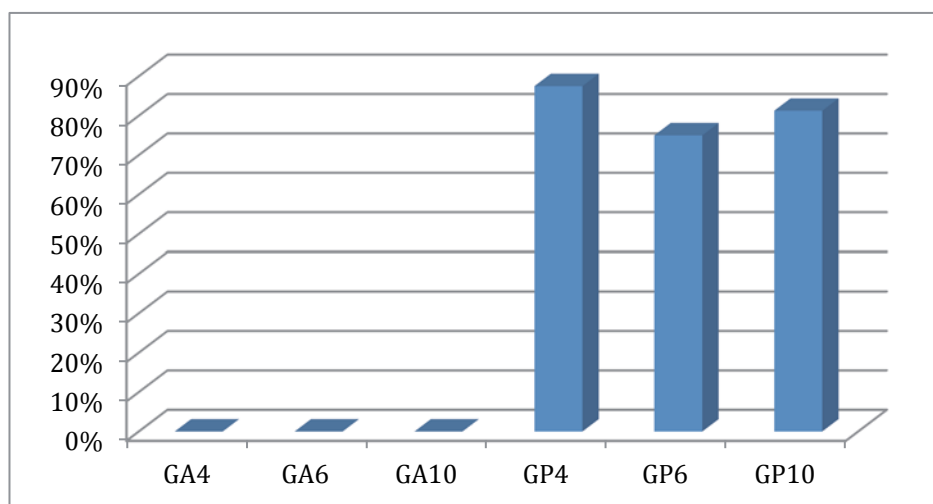


Gráfico 4. Tasa de presencia de neoformación ósea a nivel del aloinjerto óseo evaluada por *microCT* en cada grupo de estudio. Se observa una nula formación de neoformación ósea en los grupos control GA, a diferencia de las ratas del grupo experimental GP.

En el análisis estadístico se calculó la reducción absoluta de riesgo (RAR) de presencia de neoformación ósea a nivel del aloinjerto entre los diferentes grupos de estudio y su respectivo grupo control, observándose diferencias estadísticamente significativas (Tabla 13).

Grupo	<i>RAR</i>	Intervalo de confianza
4 semanas (GA 4-GP 4)	-0.875	[-0.65 - -1.10]
6 semanas (GA 6-GP 6)	-0.875	[-0.65 - -1.10]
10 semanas (GA 10-GP 10)	-0.81	[-0.62 - -1.00]

Tabla 13. Análisis estadístico de la reducción absoluta de riesgo (RAR) de presencia de neoformación ósea entre los diferentes grupos de estudio y su respectivo grupo control.

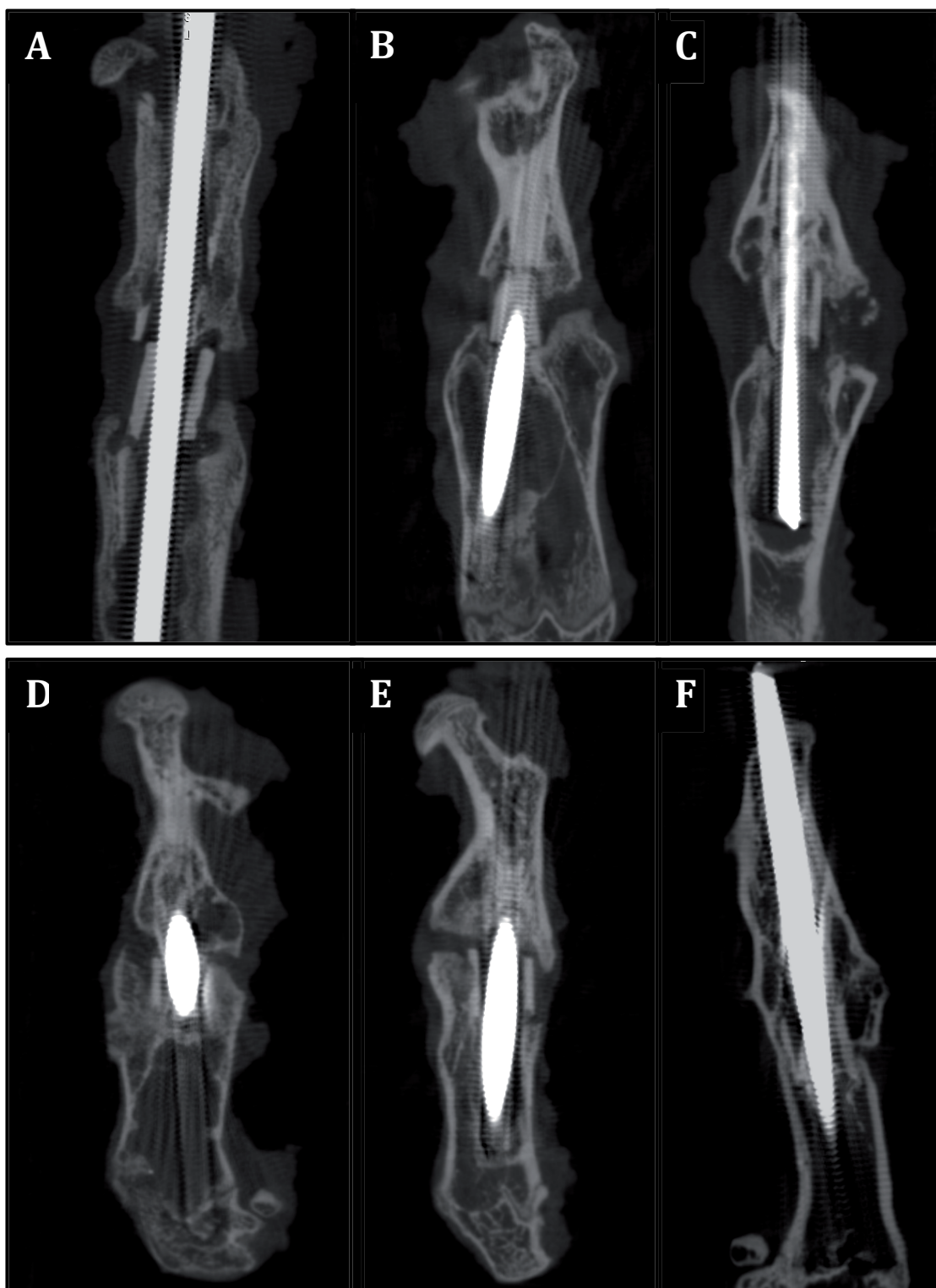


Figura 38. Imágenes de *microCT* de muestras representativas de cada uno de los grupos. En los grupos control GA 4,6 y 10 (A, B y C, respectivamente) se observa una nula neoformación ósea en la superficie del aloinjerto. En el fémur del grupo GA 10 (C) observamos signos de consolidación a nivel de la osteotomía proximal. En los grupos experimentales GP 4, 6 y 10 (D, E y F, respectivamente), se observa neoformación ósea alrededor de aloinjerto en relación al colgajo perióstico. Además, se observan marcados puentes óseos a nivel de la osteotomía distal en las muestras de los grupos GP 4 y 6 (D, E), y de ambas osteotomías en la del grupo GP 10 (C). La osteolisis del fragmento del fémur distal es un hallazgo que se repite tanto en los grupos control como experimentales.

- **Osteolisis periimplante**

- Del total de ratas del estudio, sólo se observó osteolisis periimplante proximal en tres de ellas, dos del grupo GA 4 y 1 del grupo GP 4 (Gráfico 5).
- En todos los grupos de estudio se observó una tasa de osteolisis periimplante distal por encima del 75% (Gráfico 6).

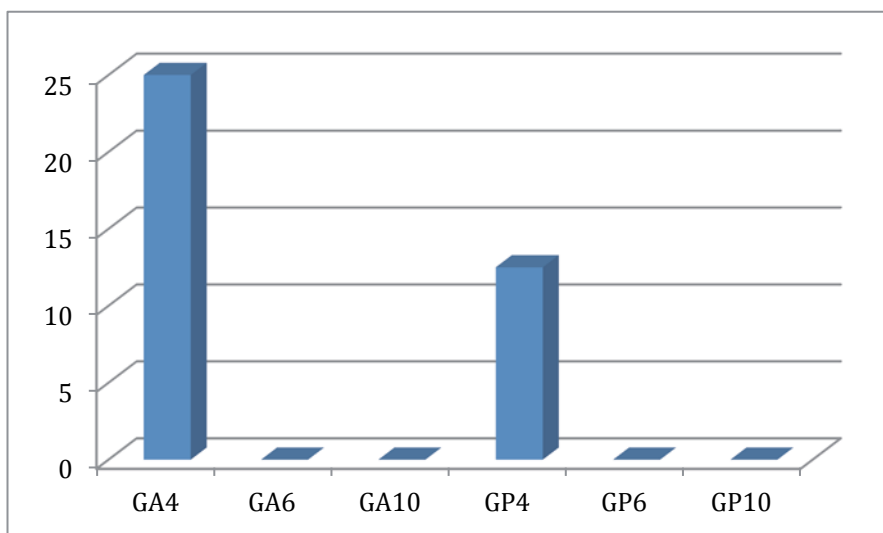


Gráfico 5. Tasa de osteolisis periimplante proximal en los diferentes grupos de estudio. Se observa una distribución homogénea, no superando el 25% en ninguno de los grupos.

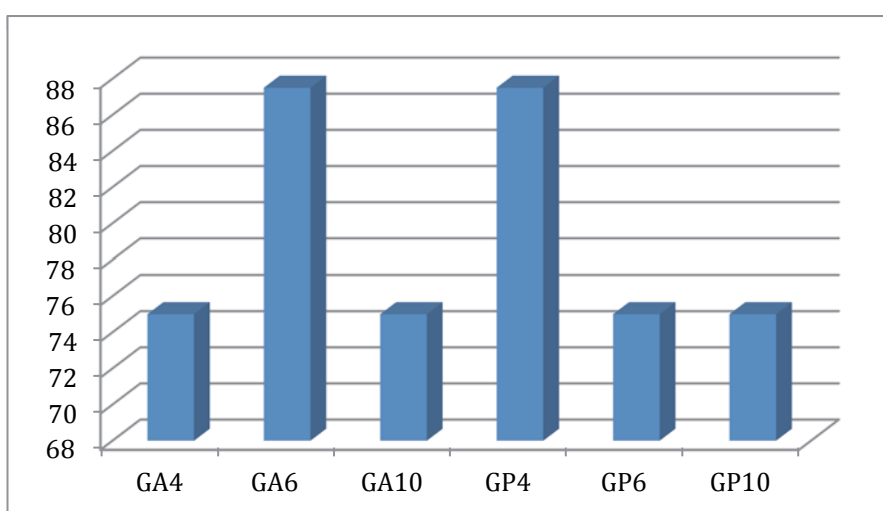


Gráfico 6. Tasa de osteolisis periimplante distal en los diferentes grupos de estudio. Se observa una distribución homogénea, oscilando entre el 75-86% en todos los grupos. Obsérvese la diferencia con la tasa de osteolisis proximal, que no supera el 25%.

En el análisis estadístico se calculó la odds ratio (OR) de riesgo de osteolisis periimplante tanto proximal como entre los diferentes grupos de estudio y su respectivo grupo control. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 14).

Grupo	OR	Intervalo de confianza
4 semanas (GA 4-GP 4)	1	0.02 – 4.93
6 semanas (GA 6-GP 6)	0.77	0.15-3.93
10 semanas (GA 10-GP 10)	1	0.32-3.10

Tabla 14. Análisis estadístico de la *odds ratio (OR)* de riesgo de fractura del aloinjerto entre los diferentes grupos de estudio y su respectivo grupo control.

- **Fractura del aloinjerto**

- Se observó una tasa de fractura del aloinjerto entre el 12.5% y el 50% en los diferentes grupos de estudio (Gráfico 7)
- En los grupos de 4 y 6 semanas, la tasa de fractura de los grupos control GA fue inferior a la de los grupos experimentales GP.
- En los grupos de 10 semanas la tasa de fractura del grupo control GA 10 duplicó a la del grupo experimental GP 10.

En el análisis estadístico se calculó la odds ratio (OR) de riesgo fractura entre los diferentes grupos de estudio y su respectivo grupo control. No se observaron diferencias significativas ninguno de los grupos estudiados (Tabla 15).

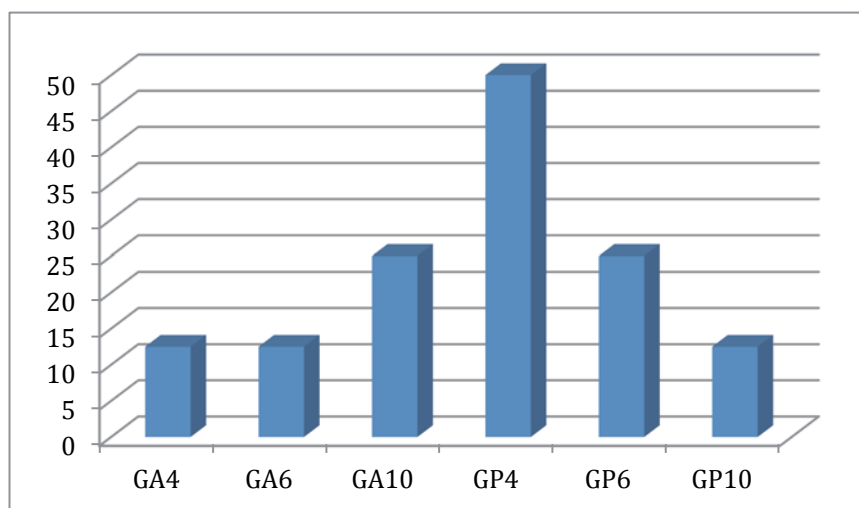


Gráfico 7. Tasa de fractura del aloinjerto óseo en los diferentes grupos de estudio. Se observa una distribución homogénea excepto en el grupo GP4, en el que el 50% de los aloinjertos óseos se encuentra fracturado.

Grupo	OR	Intervalo de confianza
4 semanas (GA 4-GP 4)	0.14	[0.003 – 2.42]
6 semanas (GA 6-GP 6)	0.43	[0.006 – 10.79]
10 semanas (GA 10-GP 10)	1.17	[0.07 – 18.32]

Tabla 15. Análisis estadístico de la *odds ratio* (OR) de riesgo de fractura del aloinjerto entre los diferentes grupos de estudio y su respectivo grupo control.

6.7. Estudio biomecánico

- Preparación de las muestras

La planificación inicial era procesar para el estudio biomecánico 8 muestras del grupo aloinjerto (GA-10) y 8 del grupo perióstico (GP-10), y comparar los resultados entre los dos grupos. Al realizar el estudio del primer grupo, al no haberse producido la consolidación de las osteotomías, las muestras se desgarraban precozmente y se obtuvieron resultados muy dispares y no evaluables, por lo que se decidió incluir un nuevo grupo control de los fémures contralaterales no intervenidos y descartar el grupo control inicial GA-10.

Se prepararon un total de 16 muestras (C1-8 y GP10 9-16). Dos de las muestras control (C3 y C4) y una de las muestras del grupo GP 10 (GP10 16) se rompieron en la extracción de los moldes durante el proceso de encastración en cemento óseo, por lo que solamente se realizaron los ensayos de torsión sobre una población total de 13 muestras (1 ensayo por muestra) (Figura 39).

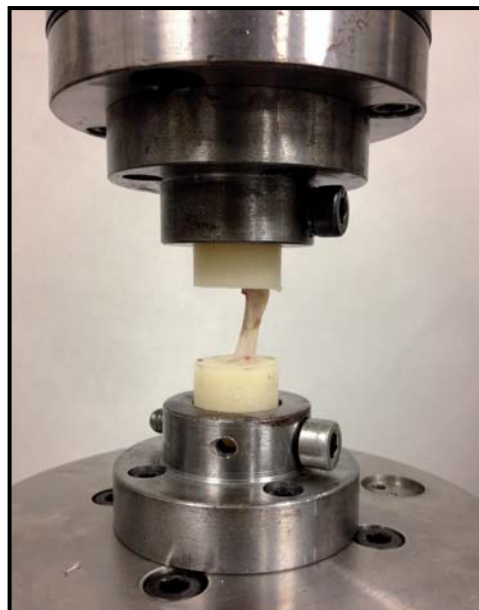


Figura 39. Imagen fotográfica de la colocación de las mordazas de las muestras con los fémures encastrados en cemento óseo.

- Caracterización mecánica a torsión

Los ensayos se realizaron hasta la fractura del componente. La fractura de los fémures control tuvo lugar aproximadamente en el centro de la diáfisis y de manera frágil, mientras que las muestras con el constructo óseo implantado presentaron desgarro del tejido implantado (Figura 40).

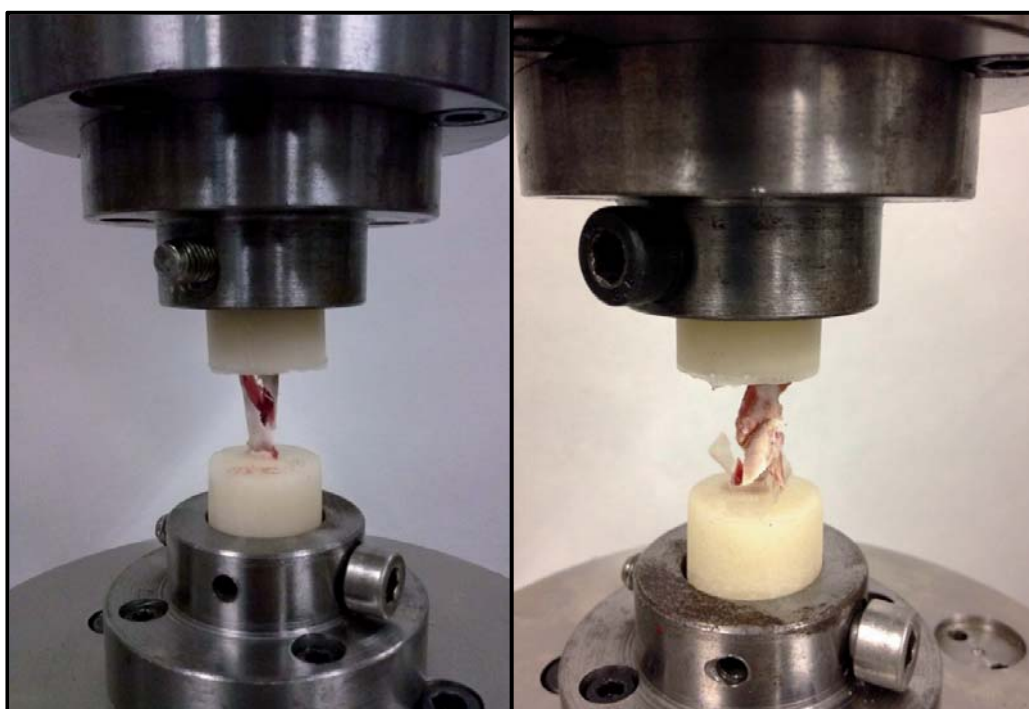


Figura 40. Fotografía de los tipos de fractura observadas. Izquierda: fractura de la diáfisis de un fémur control. Derecha: desgarro del tejido correspondiente al constructo óseo implantado en un fémur tratado quirúrgicamente.

En la Tabla 16 se muestran los valores de resistencia máxima a torsión expresados en forma de torque máximo a rotura (N/mm), obtenidos para cada una de las muestras ensayadas. No existe desviación estándar en los resultados porque sólo se realizó un test por muestra, ya que se trata de un ensayo destructivo.

Torque (N-mm)	
Grupo control	GP 10
598.6 (C1)	502.0 (GP10 9)
406.7 (C2)	120.4 (GP10 10)
619.5 (C5)	221.9 (GP10 11)
578.8 (C6)	654.0 (GP10 12)
484.3 (C7)	290.9 (GP10 13)
670.8 (C8)	378.5 (GP10 14)
	456.2 (GP10 15)

Tabla 16. Valores máximos obtenidos de torsión en N-mm.

A continuación se muestran los gráficos correspondientes a los ensayos de torsión realizados para cada una de las muestras evaluadas (Figuras 41-53). En cada uno de ellos se muestran los valores de torque o esfuerzo a torsión (N-mm) en función del ángulo de rotación girado (grados). Con una flecha roja sobre el gráfico se indica el punto de torque máximo obtenido para el ensayo, el cual corresponde a la fractura del componente.

Las gráficas correspondientes a los ensayos de torsión realizados para las muestras del grupo control (Figuras 41-46) representan un comportamiento similar entre ellas, ya que todas presentan un primer pico de torque máximo correspondiente al momento de la fractura del fémur. Este valor corresponde a la resistencia máxima a torsión soportada por las muestras. Posteriormente, se observa un descenso del torque registrado por la maquina hasta prácticamente 0 N-mm. Este descenso es debido a que los fémures control se fracturaron casi completamente al alcanzar el torque máximo. En la muestra C2 se observa una ligera tendencia al alza de los valores de torque registrados tras el pico máximo, correspondientes a las zonas de unión de la sección del fémur que aún no estaban fracturadas.

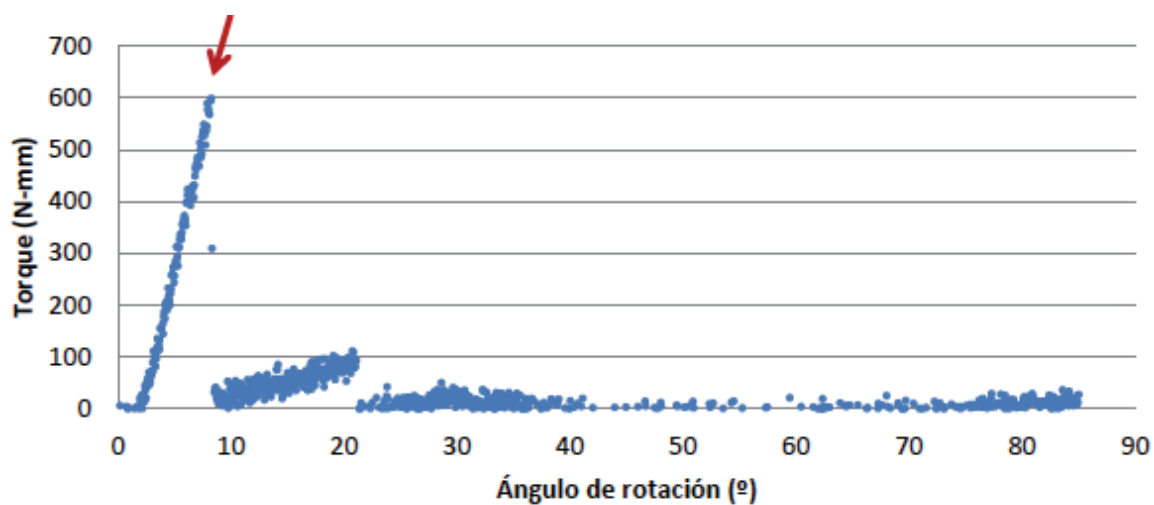


Figura 41. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra C1.

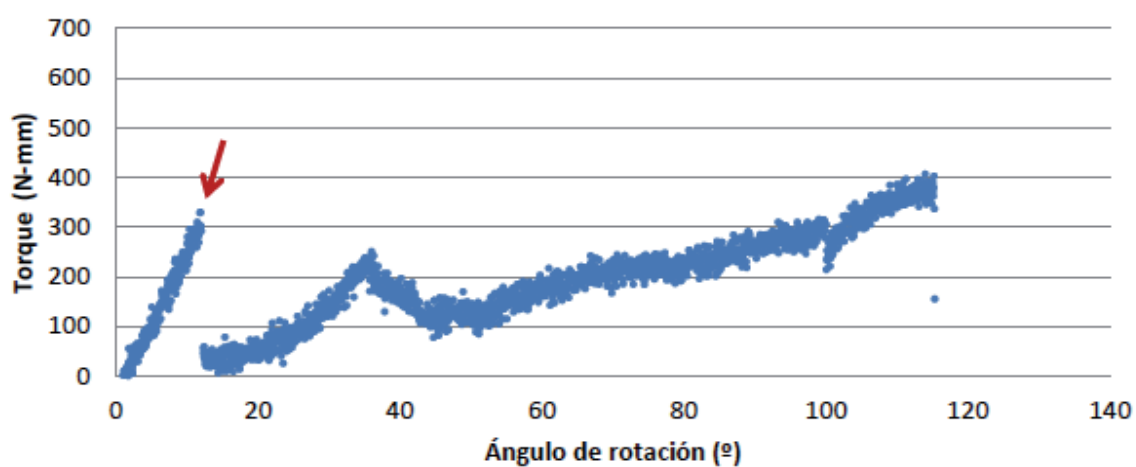


Figura 42. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra C2.

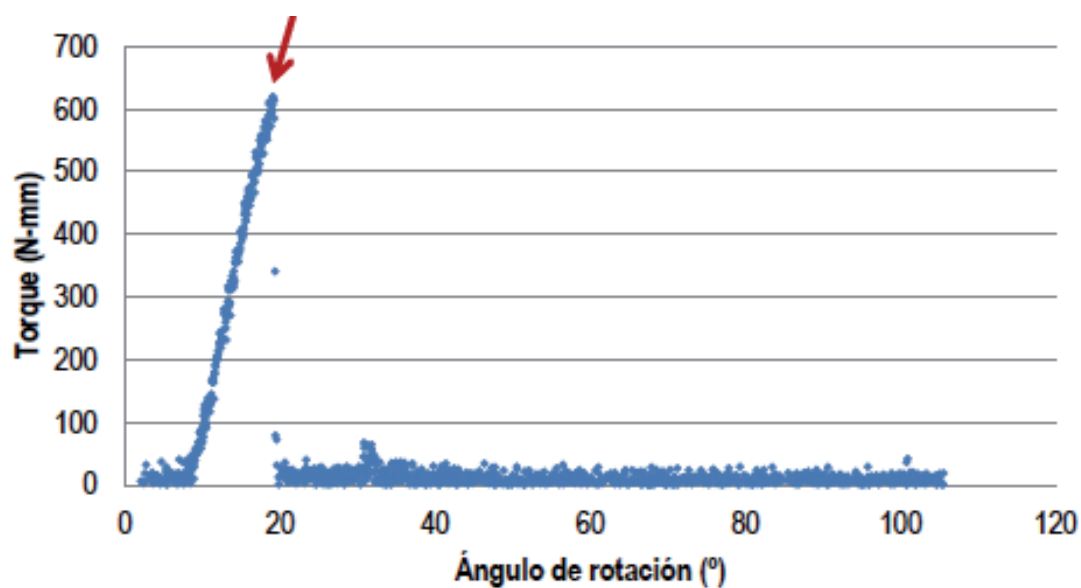


Figura 43. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra C5.

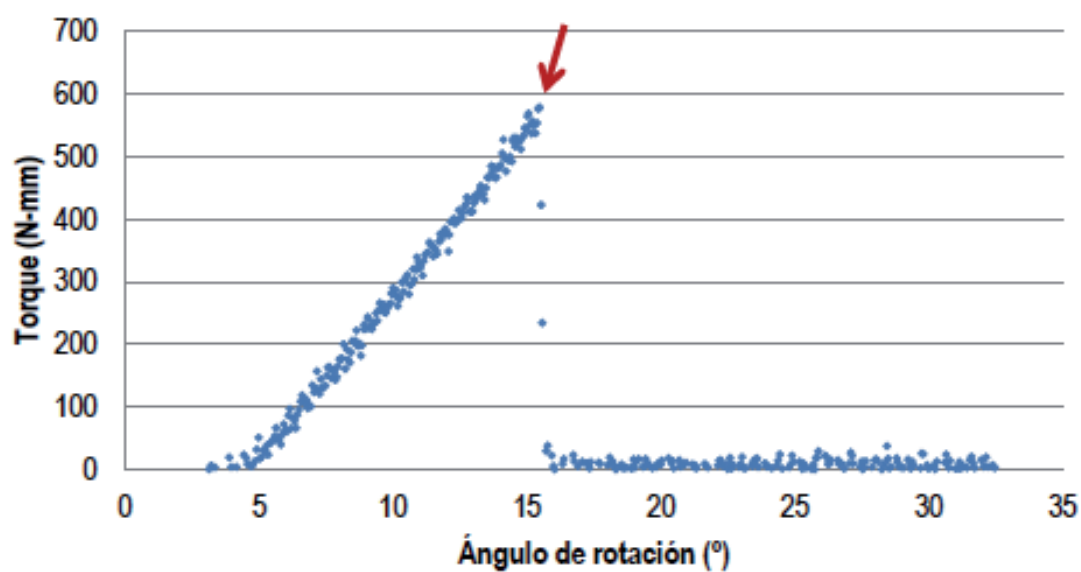


Figura 44. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra C6.

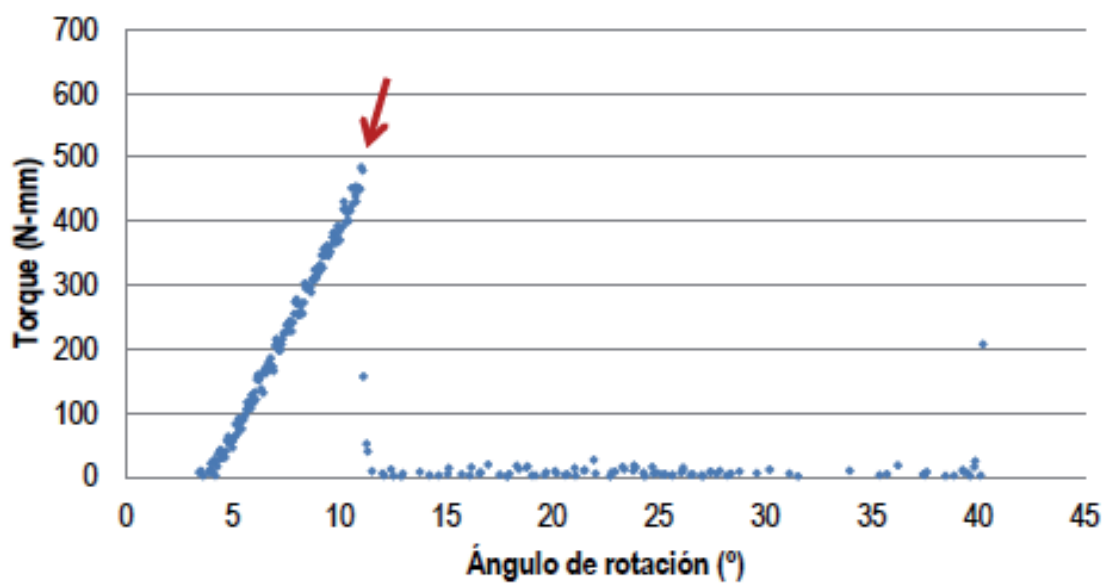


Figura 45. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra C7.

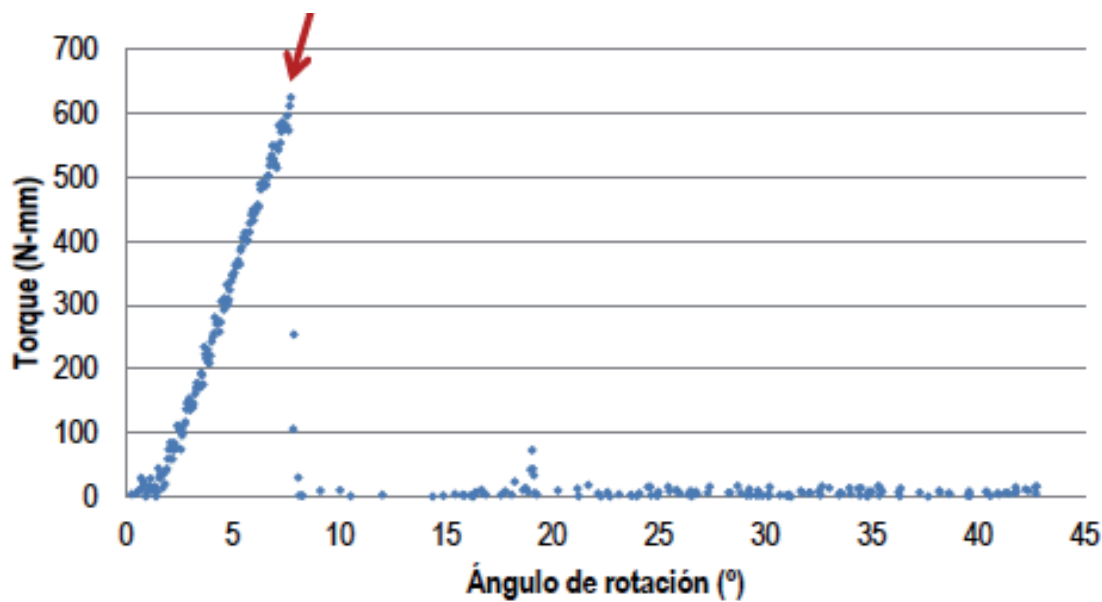


Figura 46. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra C8.

Las gráficas correspondientes a las muestras tratadas quirúrgicamente GP 10 (Figuras 47-53) también presentan un comportamiento similar entre ellas. Este tipo de muestras también mostraron un valor de torque máximo, aunque comparativamente menores que los obtenidos en las muestras del grupo control. En los casos GP10 10 y 11, tras la obtención del torque máximo, los valores registrados por la máquina no descienden a cero porque no ocurre una fractura completa del hueso, sino que el tejido correspondiente al injerto óseo implantado sufre una gran deformación durante la torsión que permite que la muestra siga girando durante el ensayo sin llegar a desprenderse completamente. Estos casos se corresponden con los fémures que no presentaron una consolidación completa de las dos osteotomías.

Los puntos obtenidos en las gráficas para las muestras tratadas quirúrgicamente muestran más dispersión que los resultados de las muestras control, debido a la deformación que sufre el tejido injertado, presentando un comportamiento más elástico que el resto de las muestras.

Aun así, cabe destacar que la fractura de las muestras del grupo GP 10, a excepción de GP10 10 y 11, no ha tenido lugar en las interfases hueso huésped-injerto, sino que es el propio injerto el que se fractura.

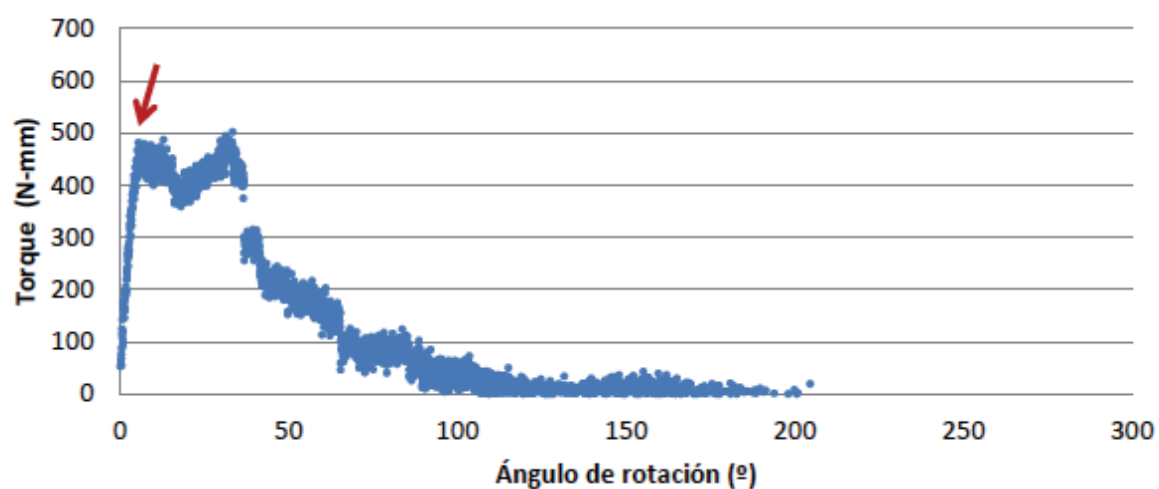


Figura 47. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra GP10 9.

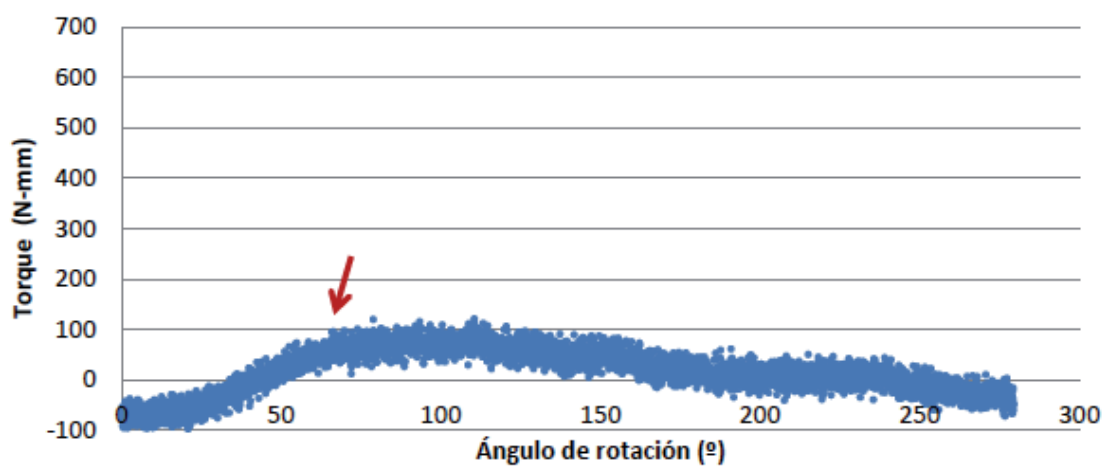


Figura 48. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra GP10 10.

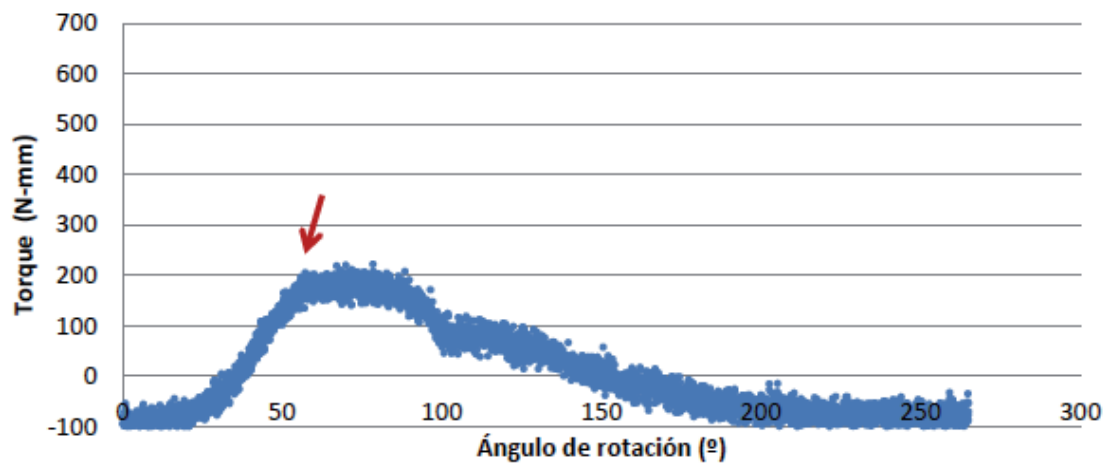


Figura 49. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra GP10 11.

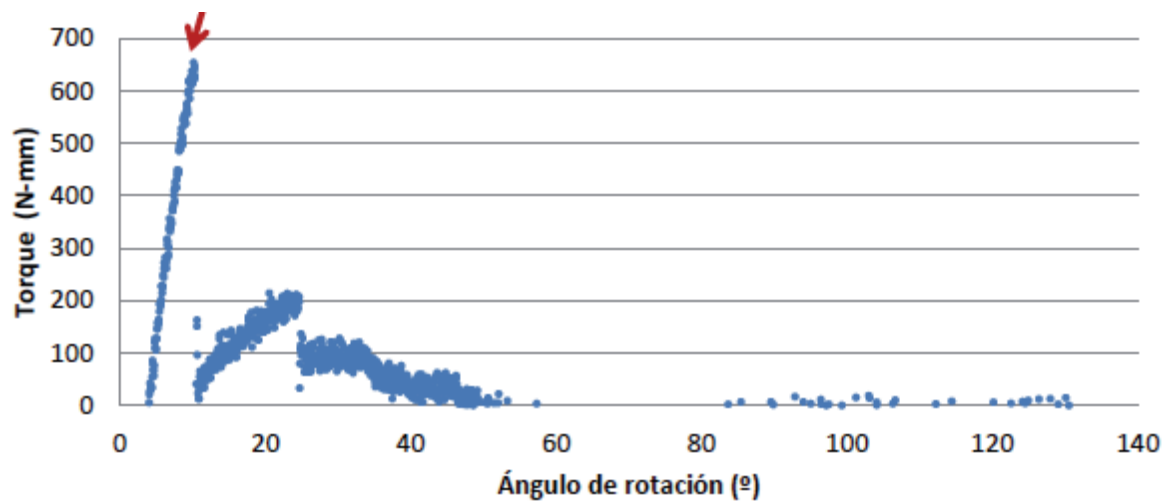


Figura 50. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra GP10 12.

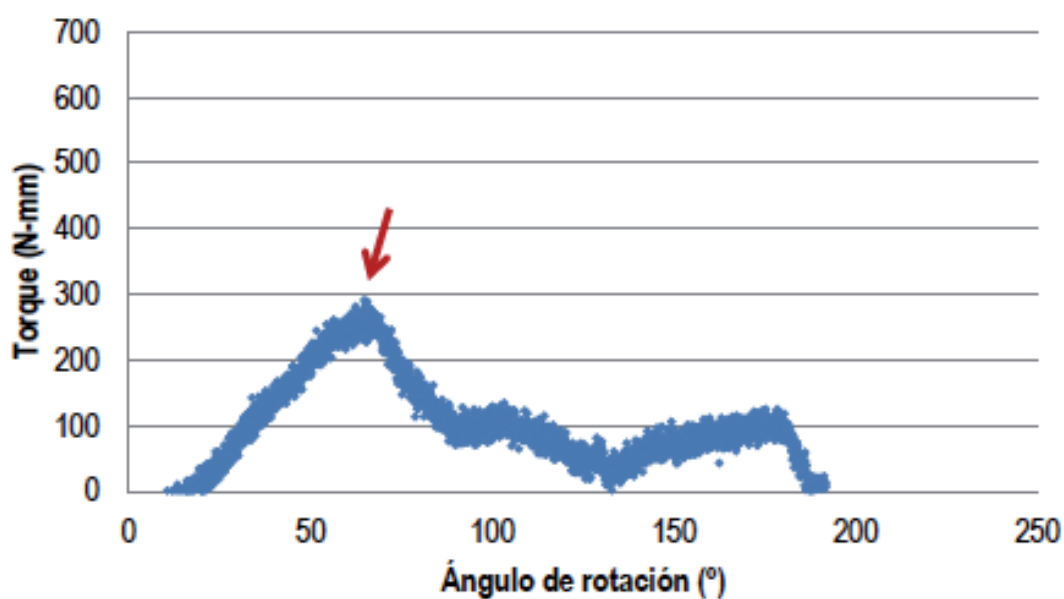


Figura 51. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra GP10 13.

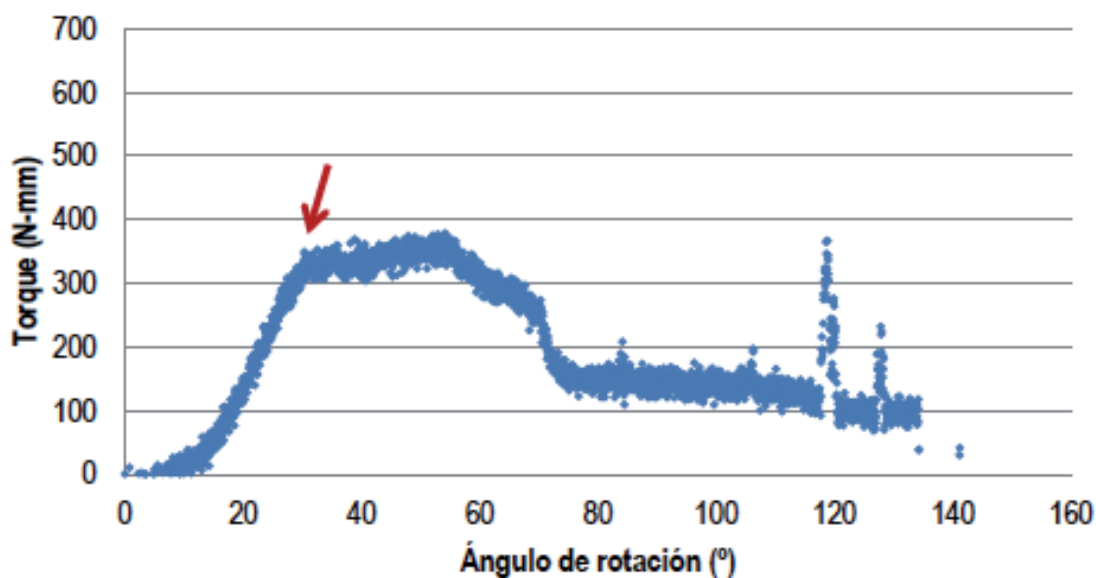


Figura 52. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra GP10 14.

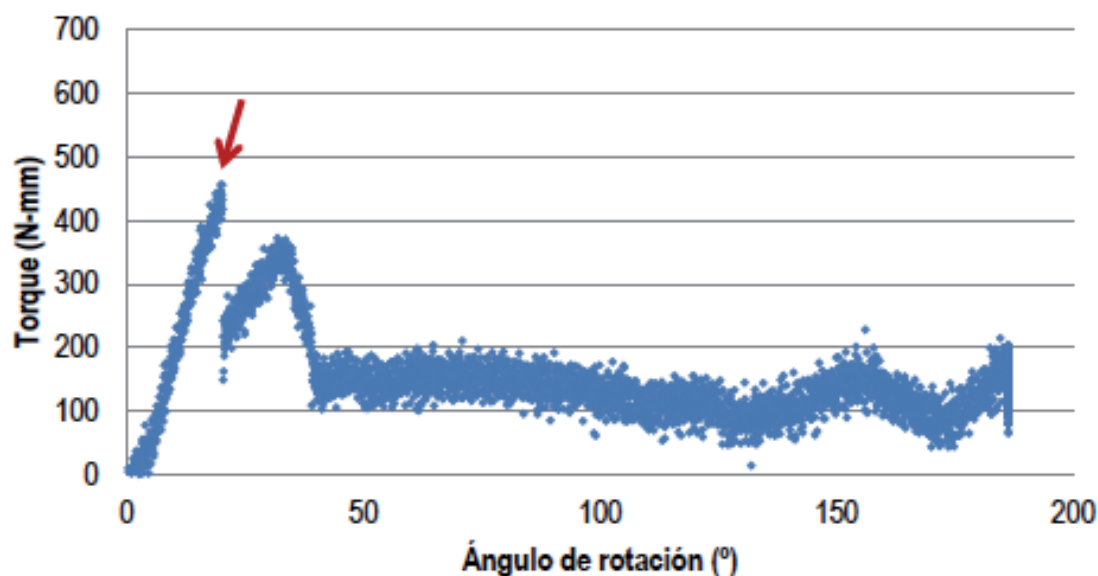


Figura 53. Gráfica correspondiente al ensayo de torsión para la muestra GP10 15.

A continuación se muestran los valores promedio de resistencia a la torsión para cada grupo de muestras junto con su desviación estándar (Tabla 17). Se representan gráficamente en el Gráfico 8 .

Tipo de muestra	Torque medio (N-mm)
Control	559.78 ± 96.86 N-mm
GP 10	374.87 ± 180.67 N-mm

Tabla 17. Valores promedio y desviación estándar de torque máximo (N-mm) para cada grupo de muestras evaluadas

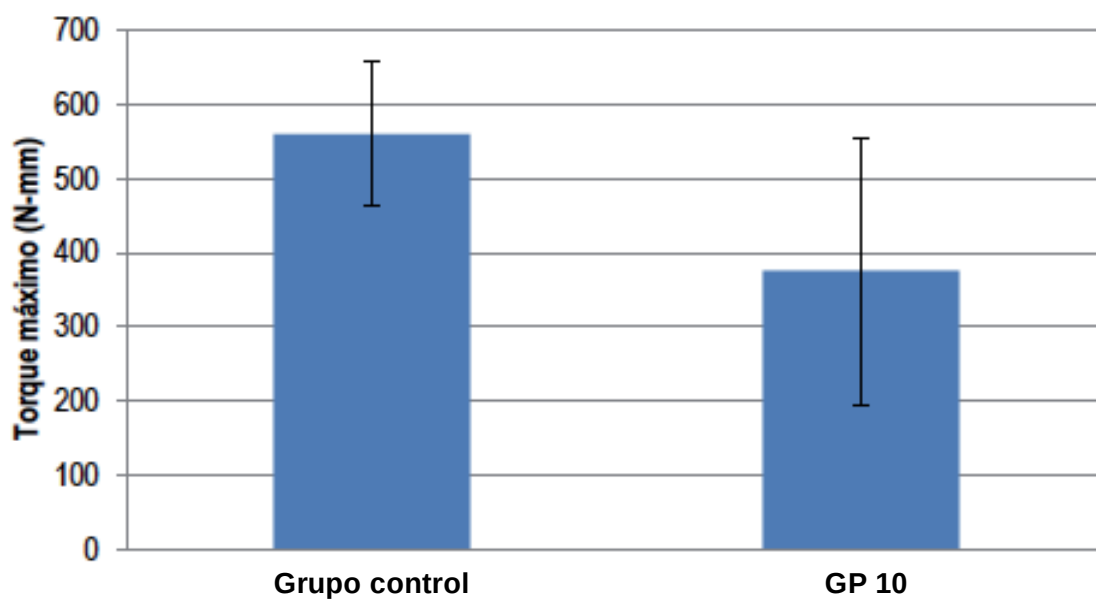


Gráfico 8. Gráfico correspondiente a los valores promedios y su desviación estándar para las muestras control y del grupo experimental GP 10.

A partir del análisis estadístico que se ha llevado a cabo sobre los resultados obtenidos de torque máximo en los tres grupos, puede afirmarse que sí existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y GP 10. Las muestras tratadas quirúrgicamente (GP 10) presentan mayor variabilidad en los valores de torque máximo obtenidos en comparación con las muestras control.

6.8. Estudio de microscopía confocal

Las imágenes obtenidas mostraron áreas marcadas en azul (*oxytetraciline*, postoperatorio inmediato), verde (*calcein green*, 4 semanas) y rojo (*xylenol orange*, 6 semanas) que representaban regiones de deposición ósea marcadas con los fluorocromos en diferentes momentos de la mineralización del tejido. El uso de fluorocromos nos permitió evaluar la dinámica de la formación ósea *in vivo*.

Se evaluaron un total de 18 muestras (2 de cada grupo GA 4, GA 6, GA 10, GP 4 y GP 6; y 8 del grupo GP 10). Se objetivaron dos patrones de marcaje bien diferenciados entre ellos: en los grupos control (GA) existía un marcaje desestructurado, mientras que en los grupos experimentales (GP) el marcaje era lineal y estructurado, lo que indicaba la neoformación ósea ya descrita en relación al colgajo perióstico utilizado (Figura 54). Además, en el grupo experimental se observó aposición ósea sincrónica y organizada a nivel perivascular, que no se observó en los grupos controles (Figura 55).

En el grupo GP 10, mediante la medición de la distancia entre los diferentes marcajes, se pudo calcular la tasa de aposición ósea. De esta manera, se observó una mayor tasa de aposición ósea en las 4 primeras semanas de seguimiento (2.32-6.21 $\mu\text{m}/\text{día}$), correspondiente al primer intervalo de marcaje, disminuyendo ésta aproximadamente 15-37% entre la 4ª y la 6ª semana (0.85-4 $\mu\text{m}/\text{día}$). (Figura 56).

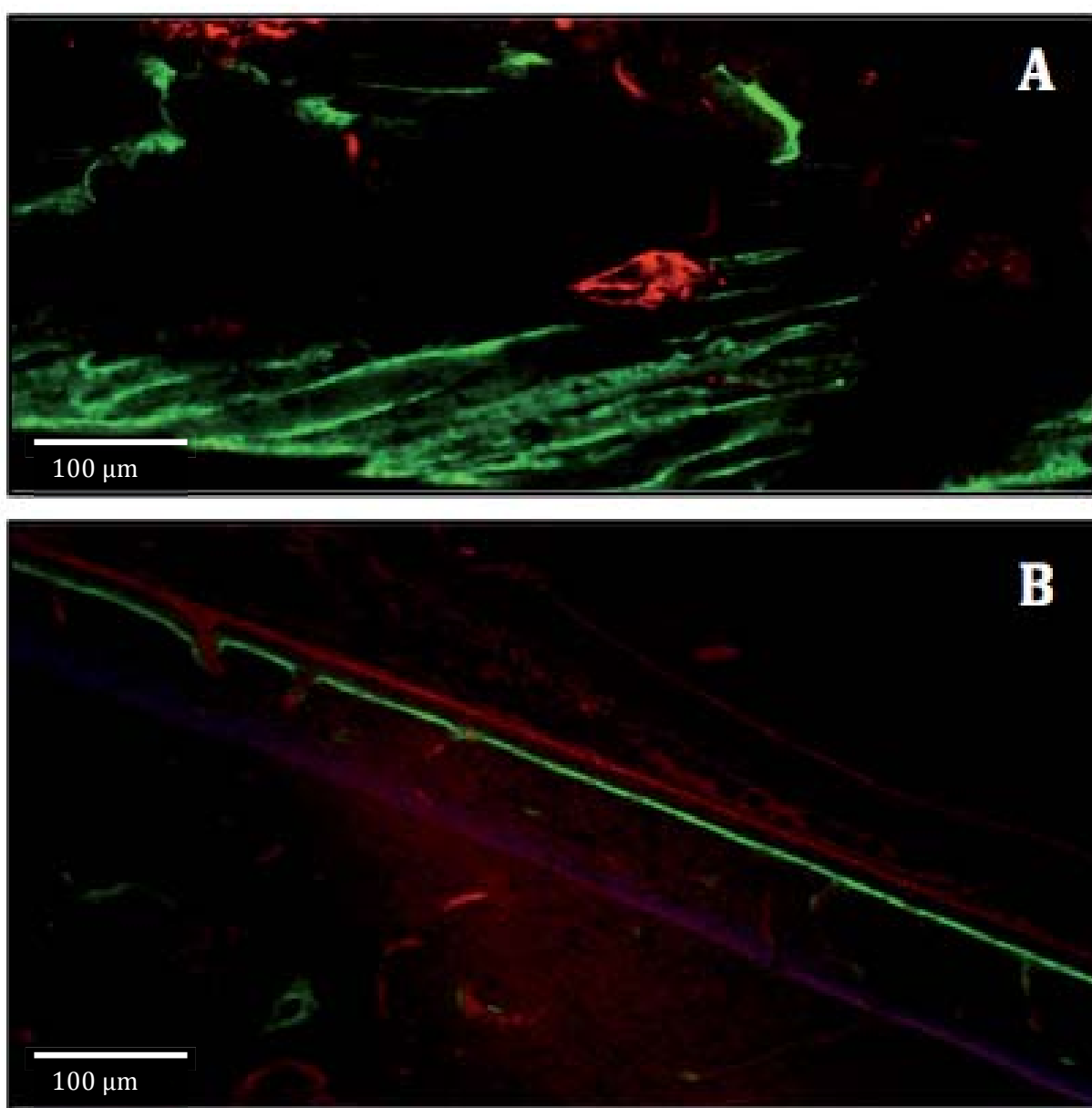


Figura 54. Imágenes correspondientes a marcaje fluocrómico en una rata del grupo control GA 10 (A) y experimental GP 10 (B). El marcaje azul se corresponde con la *oxytetraciline* (0 semanas), el verde con *calcein green* (4 semanas) y el rojo con *xlenol orange* (6 semanas). Se observa una aposición ósea desestructurada en la primera, adquiriendo una conformación lineal en relación al colgajo perióstico en el grupo experimental.

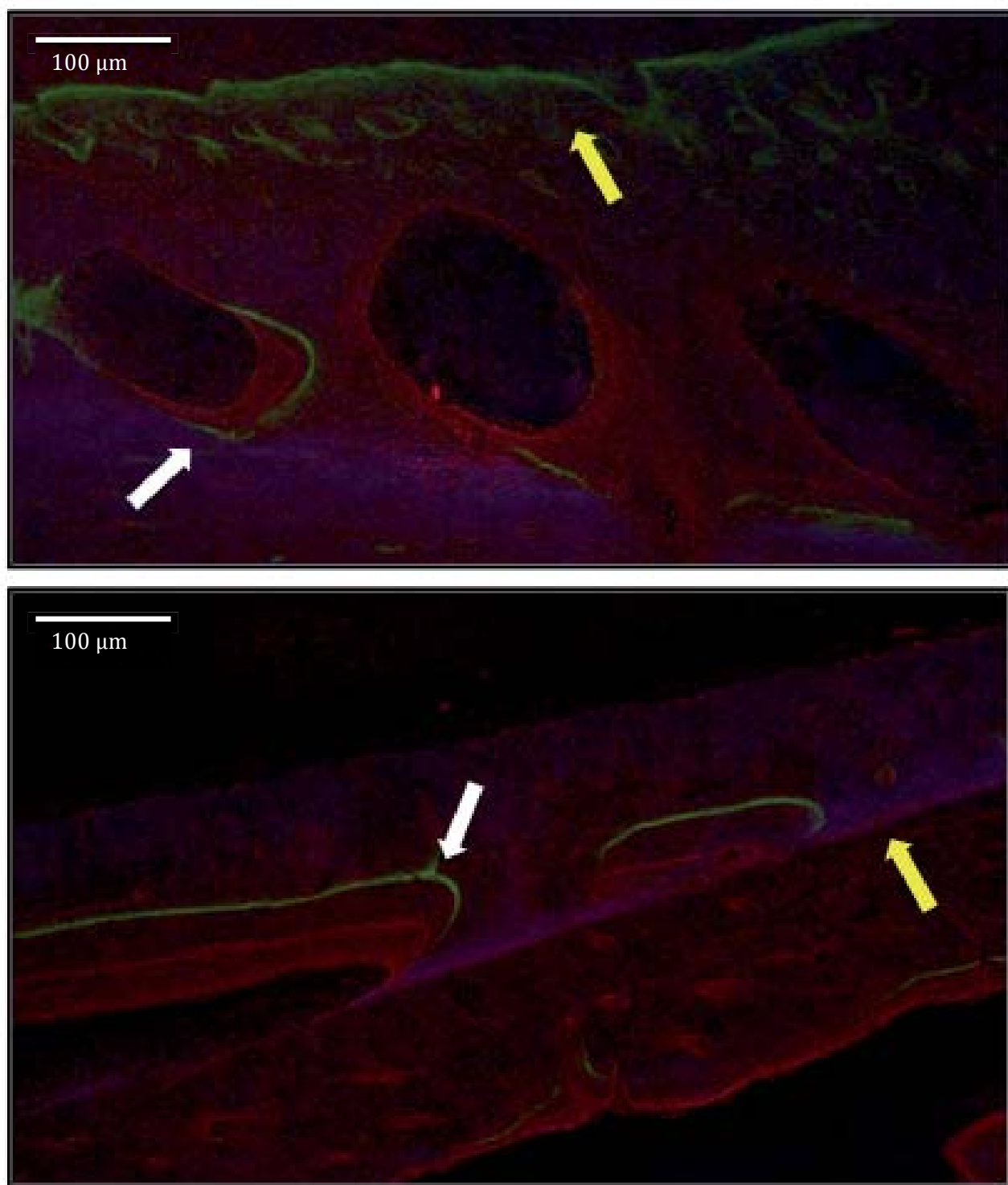


Figura 55. Imágenes correspondientes a marcaje flurocrómico en dos ratas del grupo experimental GP 10. El marcaje azul se corresponde con la *oxytetraciline* (0 semanas), el verde con *calcein green* (4 semanas) y el rojo con *xlenol orange* (6 semanas). Se observa una aposición ósea organizada alrededor de los vasos (flecha blanca), así como perióstica (flecha amarilla)

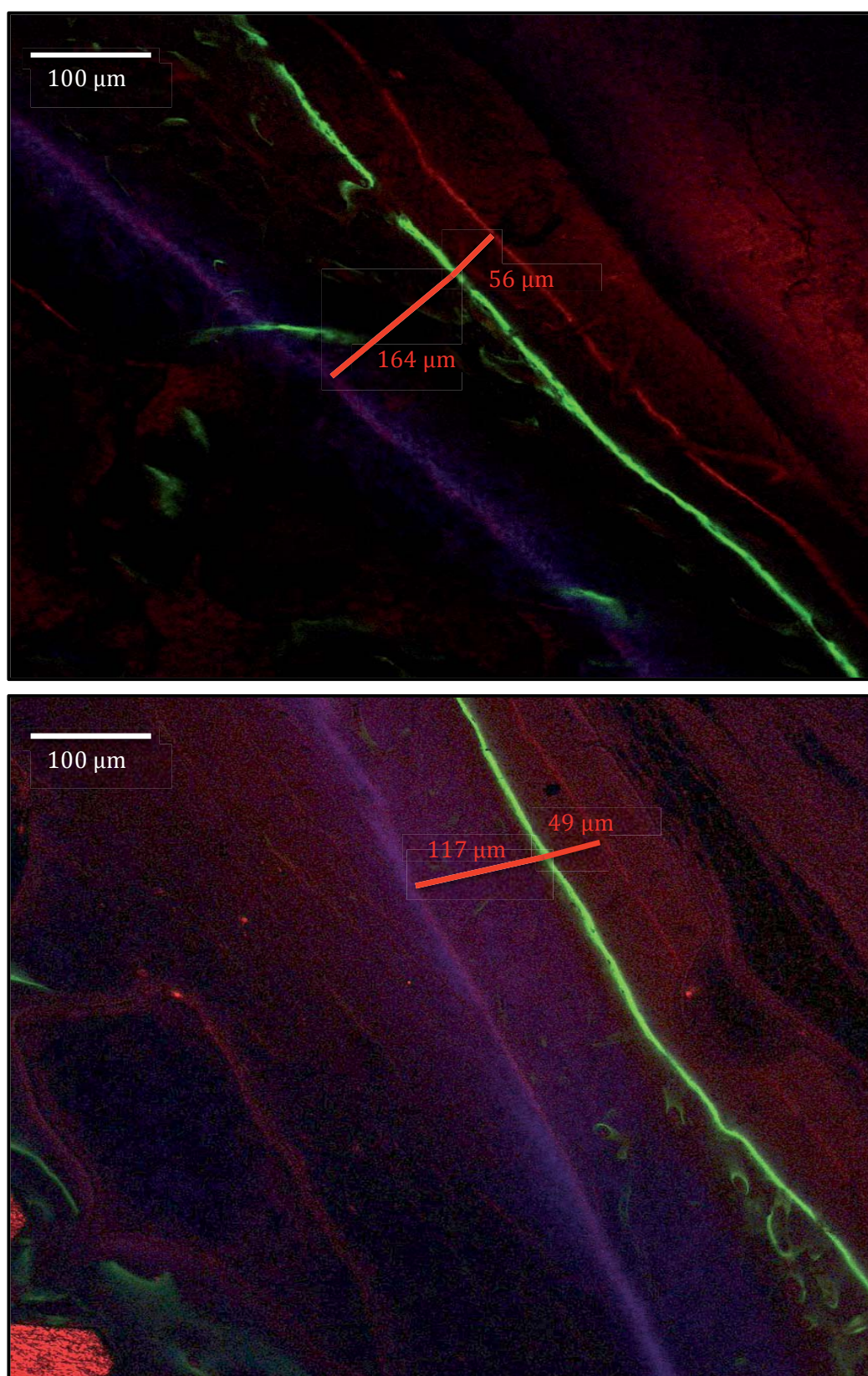


Figura 56. Medición de tasa de aposición ósea en dos ratas del grupo experimental GP 10. El marcaje azul se corresponde con la *oxytetraciline* (0 semanas), el verde con *calcein green* (4 semanas) y el rojo con *xyleneol orange* (6 semanas). Se observa una aposición ósea mayor en las primeras semanas de seguimiento.

6.9. Estudio mediante microscopia electrónica de barrido

Se evaluaron un total de 18 muestras (2 de los grupos GA 4, GA 6, GA 10, GP 4 y GP 6; y 8 del grupo GP 10). Las imágenes se muestran en escala de grises, de esta manera, a mayor mineralización ósea, y por consiguiente más avanzado estado de maduración del tejido, más brillante se observa la imagen. Por el contrario, los tejidos mineralizados presentes con una tonalidad más cercana al gris son más inmaduros, por tanto, con menor grado de mineralización. Asimismo, la microscopia electrónica SEM permite observar la estructura y morfología del tejido (porosidad, tamaño y distribución de poros, ordenación tisular, etc.) y posibilita la identificación del tipo de tejido mineralizado presente (cartílago calcificado, hueso fibrorreticular, tejido condroide, hueso lamelar, etc.) [292].

En las muestras del grupo control GA se observa tejido óseo maduro que se corresponde con el aloinjerto, así como tejido mineralizado inmaduro procedente de los extremos del hueso huésped que intenta incorporar el aloinjerto óseo por sus extremos (Figura 57). A diferencia de estos, en las muestras del grupo experimental GP el tejido mineralizado inmaduro también se encuentra en la superficie del aloinjerto óseo (Figura 58).

Por otra parte, en las muestras del grupo experimental GP 10 se observaron claros signos de consolidación a nivel de las interfases, así como de incorporación del aloinjerto óseo (Figura 59 y 60).

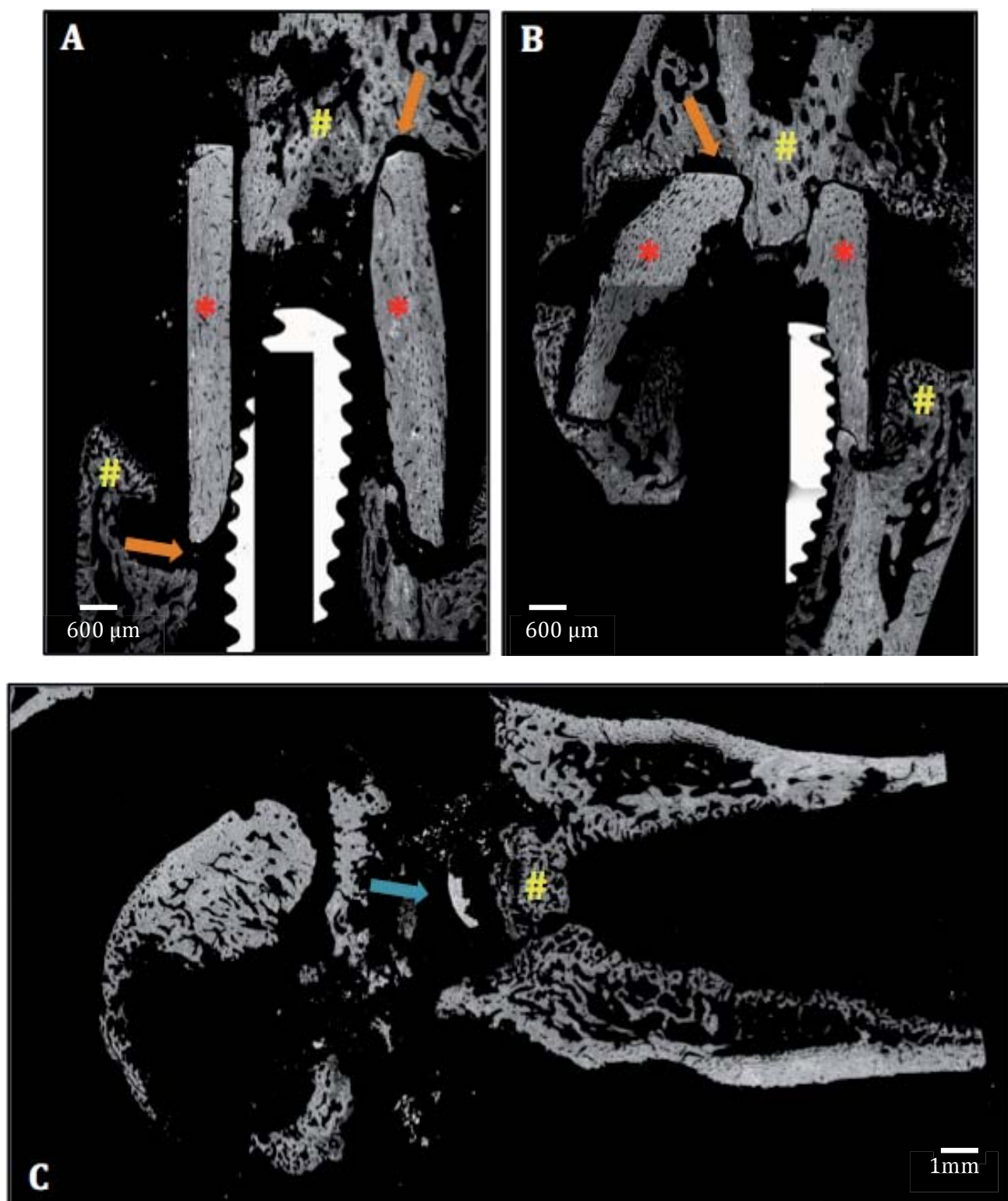


Figura 57. Imágenes que corresponden a composición de micrografías (*stitching*) obtenidas por microscopía electrónica de barrido de ratas de los grupos control GA 4 (A), GA 6 (B), y GA 10 (C). Se puede observar el tejido óseo maduro (*) y tejido óseo neoformado inmaduro (#) procedente de los extremos del hueso huésped que intenta incorporar el aloinjerto. Las interfases hueso huésped-aloinjerto (A y B) no se encuentran en contacto, sino que están separadas por resina polimérica (flecha naranja), lo cual indica no unión. En la imagen correspondiente a GA 10 (C) el aloinjerto se ha fragmentado y reabsorbido, y sólo encontramos un pequeño fragmento cortical (flecha azul), formando una masa de tejido desestructurado y poco mineralizado.

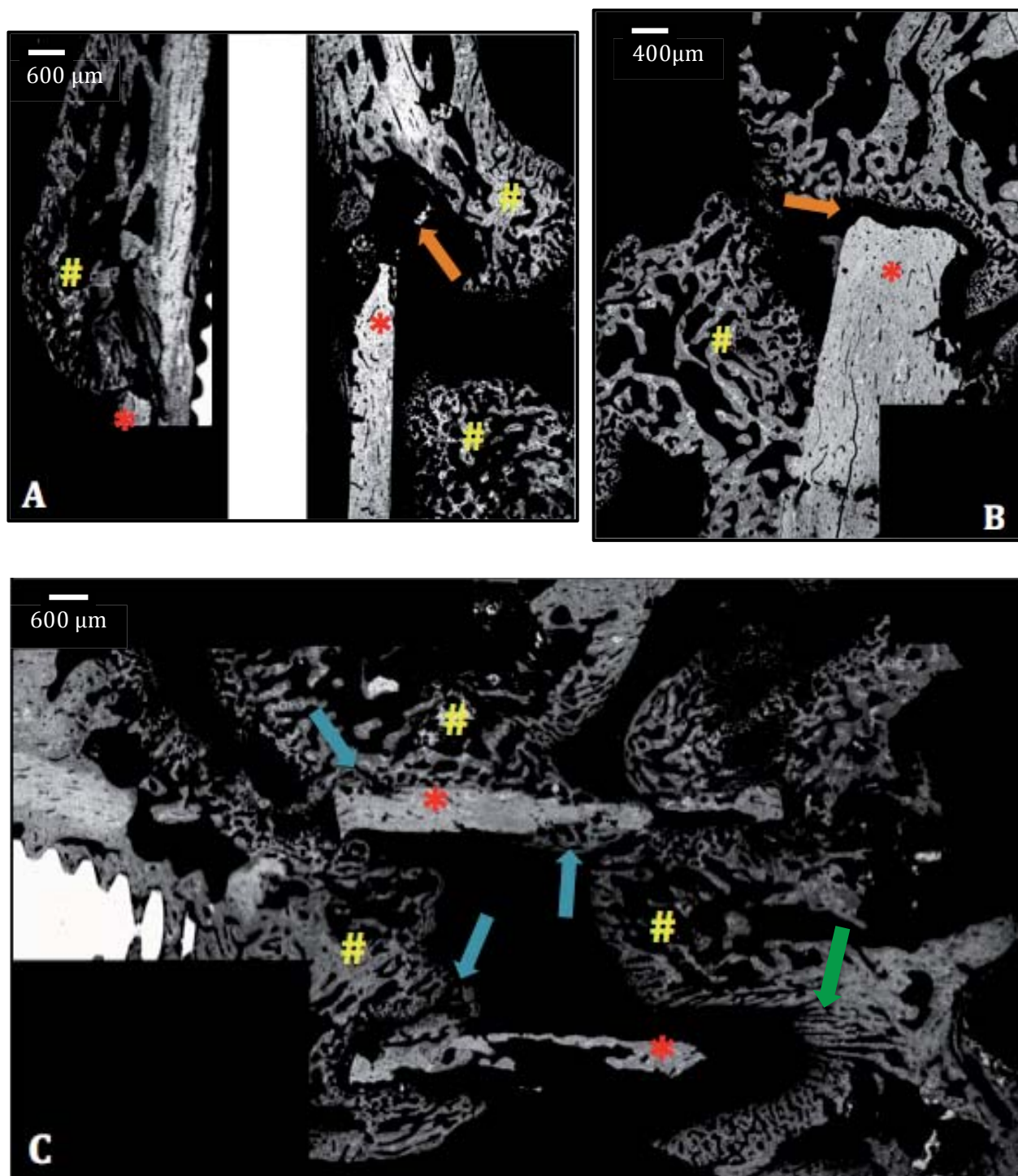


Figura 58. Imágenes que corresponden a composición de micrografías (*stitching*) obtenidas por microscopía electrónica de barrido de ratas de los grupos experimental GP 4 (A), GP 6 (B) y GP 10 (C). Se puede observar el tejido óseo maduro (*) y tejido óseo neoformado inmaduro (#). Éste último, a diferencia del grupo control, no sólo procede de los extremos del hueso huésped, sino que además se sitúa encima de la superficie del aloinjerto procedente del colgajo perióstico. Las interfases hueso huésped-aloinjerto (A y B) no se encuentran en contacto (flecha naranja), observándose trabéculas osteocartilaginosas correspondientes a un proceso de osificación endocondral sin haberse producido consolidación. En la muestra del grupo GP 10 (C) se observan signos de reabsorción y osteointegración del aloinjerto (flecha azul), además de trabéculas de matriz osteoide en fase de osificación membranosa (flecha verde), a diferencia de los grupos control.

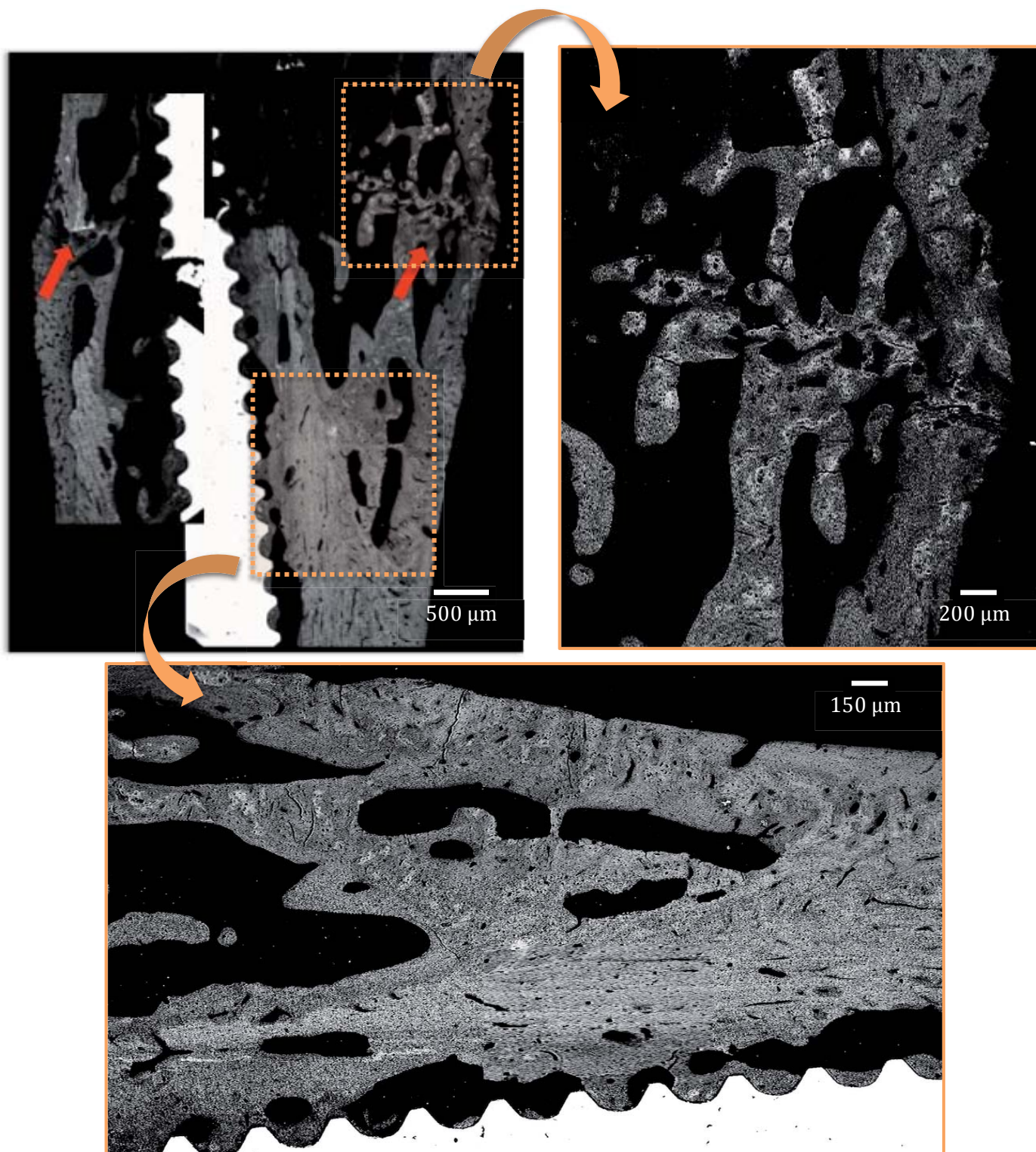


Figura 59. Imagen correspondiente a composición de micrografías obtenida por microscopía electrónica de barrido de una rata del grupo GP 10. Se observa consolidación completa de la interfase hueso huésped – aloinjerto a ambos lados de la aguja endomedular (flecha roja). En la imagen superior derecha se observa el detalle de la interfase proximal, en la que encontramos trabéculas osteocartilaginosas características de un proceso de osificación endocondral. En la imagen inferior se observa el detalle del aloinjerto y la interfase distal, donde se ha producido una osificación membranosa con una integración y remodelación completa de aloinjerto, sin poder diferenciar la interfase distal. Se observa además la presencia de tejido mineralizado procedente del aloinjerto inicial en contacto con el implante, indicando la vitalidad del tejido.

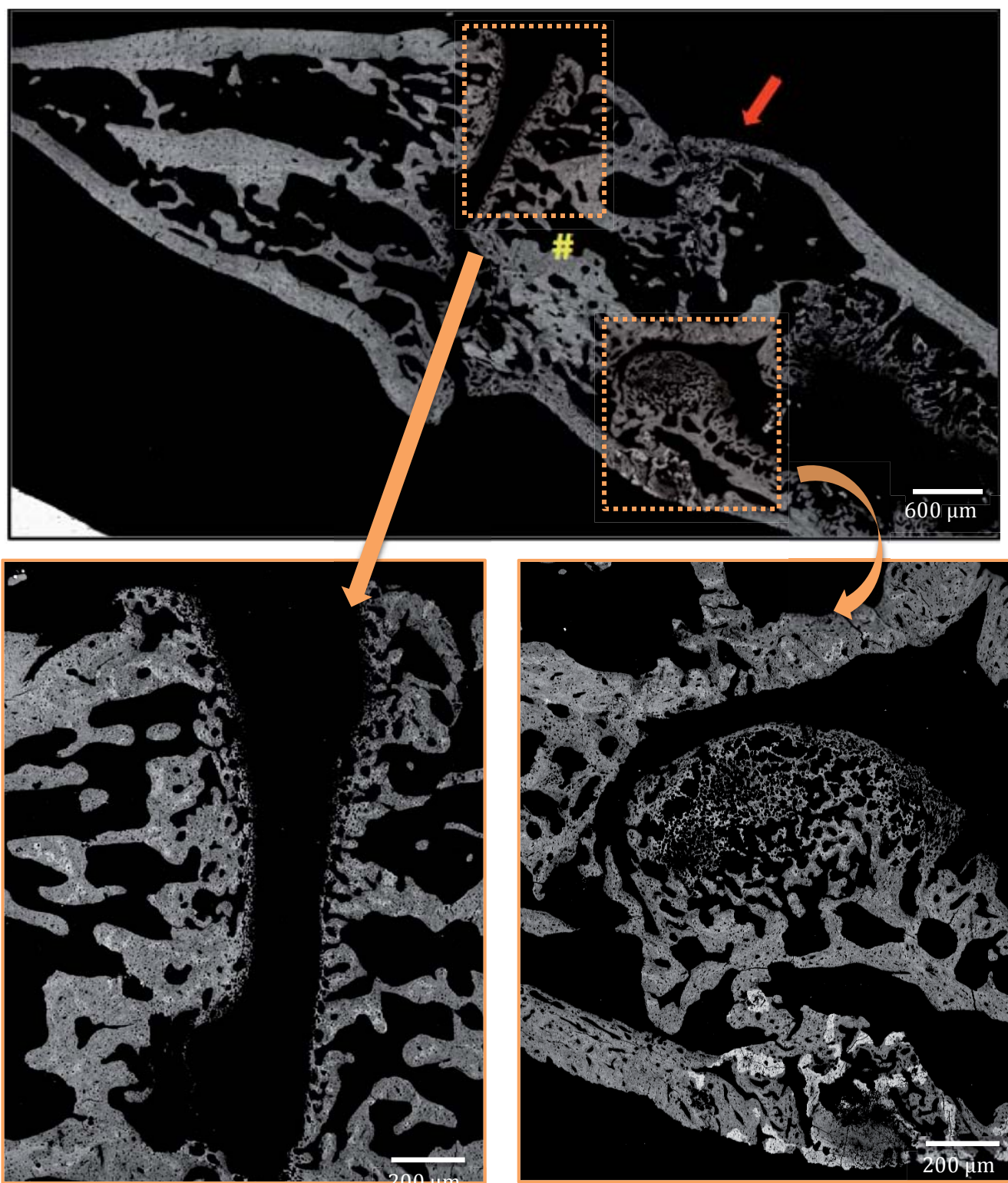


Figura 60. Imagen correspondiente a micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido de una rata del grupo GP 10. Se observa consolidación completa la interfase ósea distal (flecha roja), así como recanalización vascular y osteointegración completa del aloinjerto (#). En la imagen inferior izquierda se observa el detalle de la interfase proximal, con trabéculas osteocartilaginosas correspondientes a un proceso de osificación endocondral. En la imagen inferior derecha, observamos trabéculas de matriz osteoide en fase de osificación membranosa correspondiente a la interfase distal.

6.10. Estudio histológico

Podemos diferenciar el tejido óseo correspondiente a la zona coloreada en verde, y el tejido no calcificado en la zona coloreada en ocre mediante la tinción de Masson y Goldner en secciones no descalcificadas, incluso si se observan macroscópicamente. En las muestras pertenecientes al grupo experimental (GP) el área de muestra teñida con coloración verdosa es mayor debido a la mayor presencia de tejido óseo. Mientras que en las muestras del grupo control (GA) se observa más cantidad de tejido no mineralizado alrededor del hueso y menor uniformidad en su estructura (Figura 61).

En la evaluación de las muestras bajo microscopio óptico, se observan osteocitos y osteoblastos localizados en el hueso neoformado y en el margen de las trabéculas óseas, de forma linear. Los osteoclastos y condroclastos se visualizan como células polinucleadas en el límite con el tejido no mineralizado, color ocre. Estos hallazgos indican un proceso regulado de regeneración ósea, con resorción osteoclástica seguida de aposición osteoblástica.

En la muestra del grupo control (Figura 62), no se observa incorporación del aloinjerto ni hueso neoformado. Existe una gran masa de tejido no mineralizado que engloba el aloinjerto, que muestra un aspecto desestructurado.

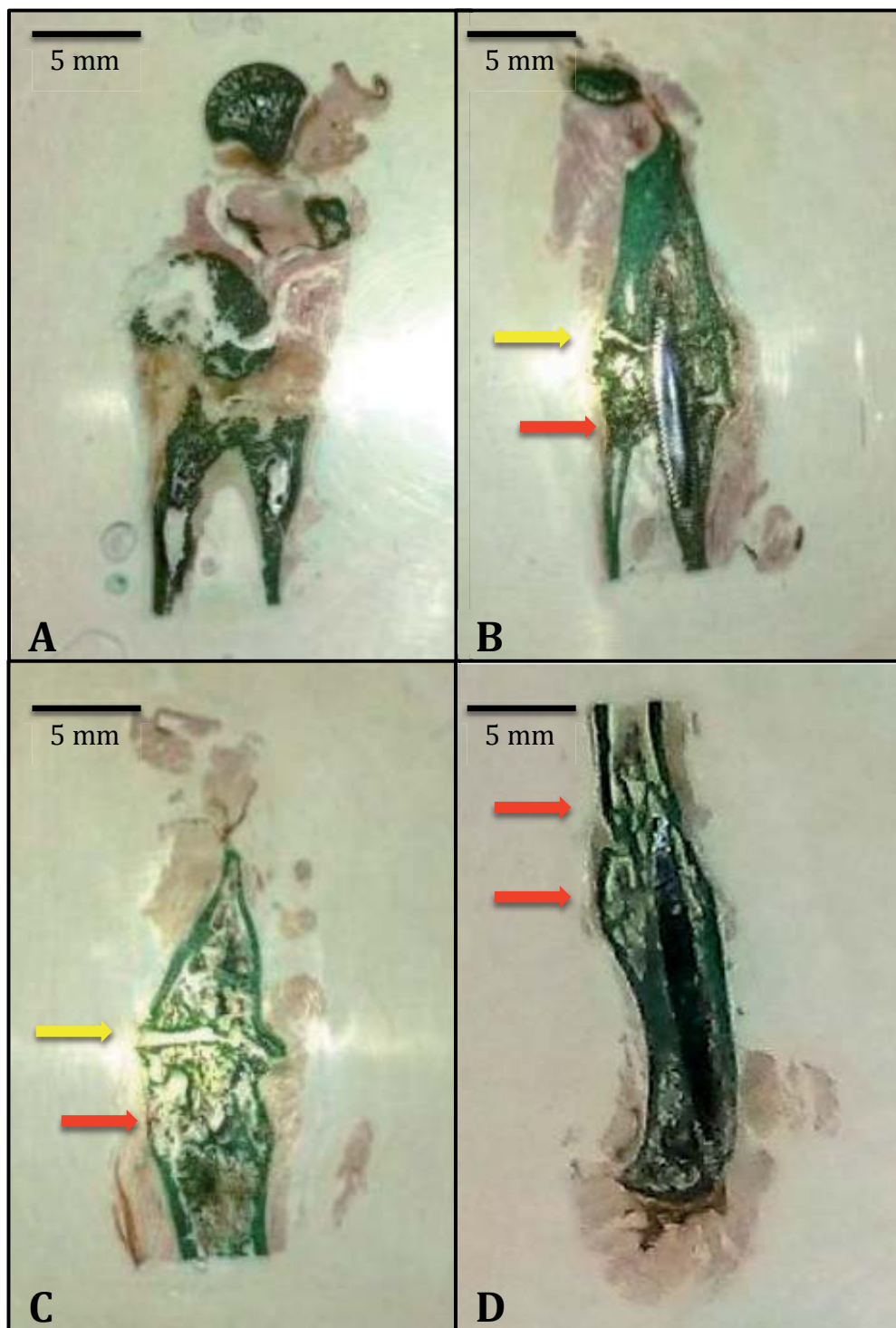


Figura 61. Imágenes macroscópicas de muestras teñidas con Tricrómico de Masson Goldner, colocadas verticalmente, con la cabeza femoral en la parte superior de la imagen. Se observa la diferencia entre la muestra del grupo control GA 10 (A), donde hay una gran cantidad de tejido no mineralizado (ocre) con desestructuración del aloinjerto óseo. La imagen difiere de las muestras del grupo experimental GP 10 (B, C) donde observamos tejido óseo estructurado (verde) con consolidación completa (flecha roja) de la interfase distal, no así de la proximal (flecha amarilla). En la imagen D, también correspondiente al grupo GP 10, observamos consolidación en ambas osteotomías.

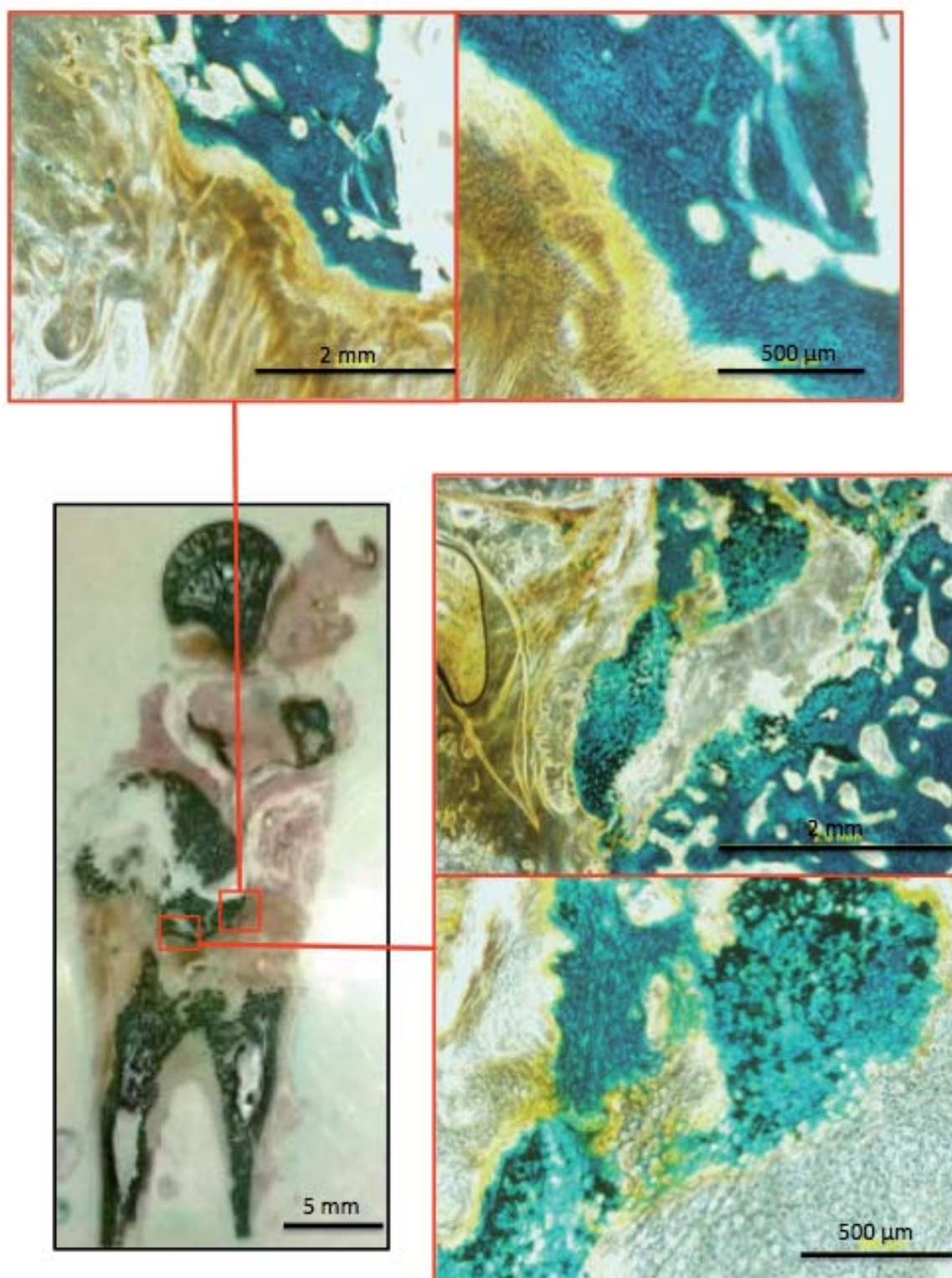


Figura 62. Imágenes obtenidas bajo microscopio óptico de una muestra del grupo control GA 10 teñida con Tricrómico de Masson Goldner. En las imágenes aumentadas (4x y 10x), se observan trabéculas osteocartilaginosas correspondientes a un proceso de osificación endocondral. Obsérvese también la gran presencia de tejido no mineralizado que engloba el aloinjerto, ambos mostrando un aspecto desestructurado.

En las muestras del grupo experimental (Figuras 63-65), se observa que el aloinjerto óseo carente de osteocitos ha sido incorporado al hueso huésped y se ha iniciado un proceso de remodelación consistente en la reabsorción del aloinjerto y la revascularización del hueso preexistente. Resultado de este proceso, se observa que el aloinjerto inicial ha adoptado la misma estructura y características del hueso huésped, convirtiéndose en un tejido vital que ha sido capaz de producir tejido óseo en contacto íntimo con el implante metálico. Se observa además, una aposición de hueso neoformado procedente del colgajo perióstico en la superficie del aloinjerto.

En cuanto a la consolidación ósea, se visualiza una completa unión a nivel de las interfases distales hueso huésped – aloinjerto, y se observan trabéculas de matriz osteoide en fase de osificación membranosa, que sólo aparece en una de las muestras a nivel proximal (Figura 65). En las otras muestras del mismo grupo, a nivel de la interfase proximal se observa tejido cartilaginoso en proceso de osificación endocondral, que no ha conseguido todavía la consolidación ósea. Las localizaciones donde encontramos osificación membranosa están en contacto con zonas donde observamos un periostio grueso, organizado y vascularizado, a diferencia de las interfases proximales, donde se encuentra desorganizado.

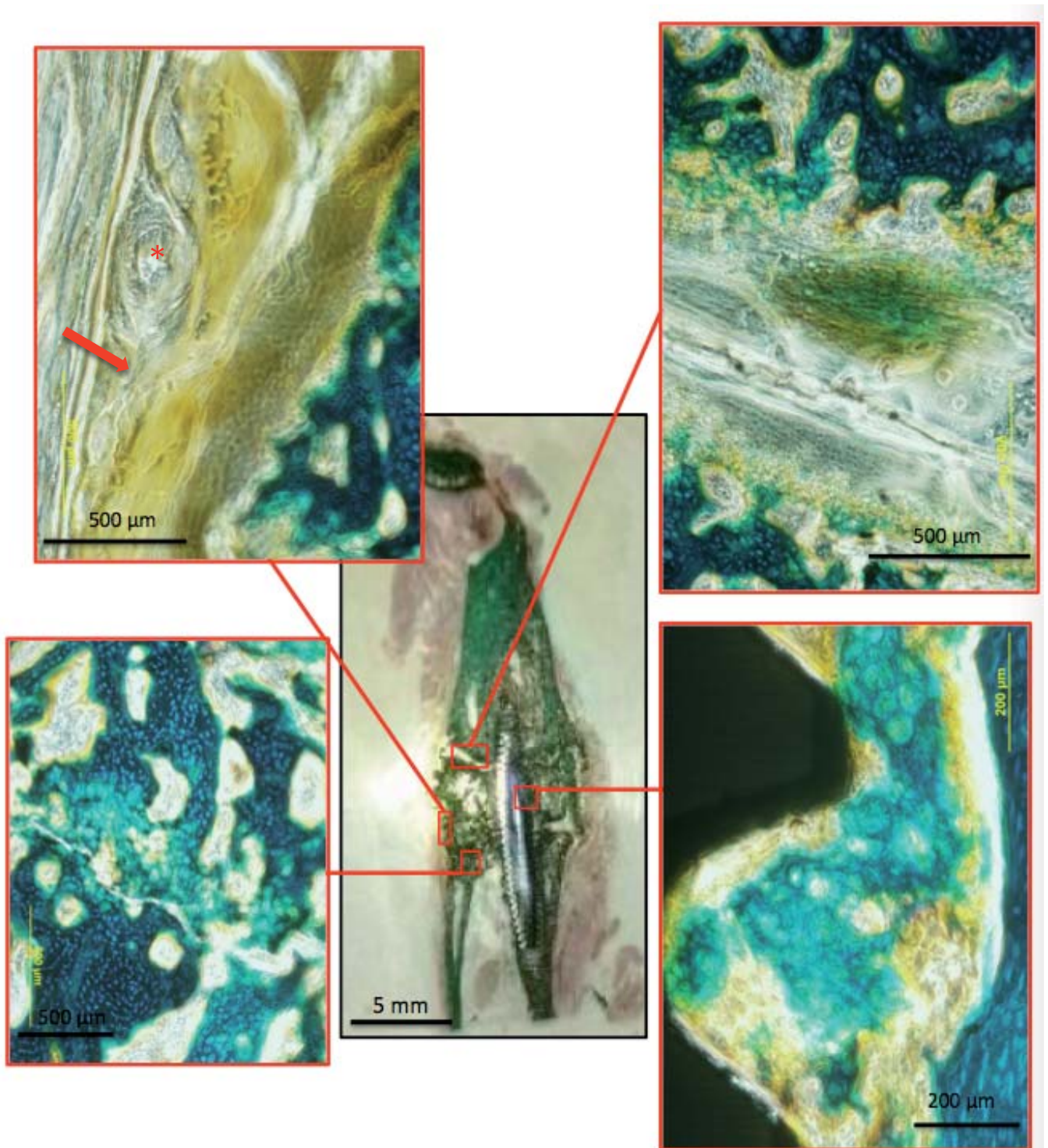


Figura 63. Imágenes obtenidas bajo microscopio óptico de una muestra del grupo experimental GP 10 teñida con Tricrómico de Masson Goldner. En las imagen aumentada inferior izquierda (10x) se observan trabéculas de matriz osteoide en fase de consolidación mediante osificación membranosa. En la imagen superior izquierda (10x) se observa tejido fibroso organizado que se corresponde con el colgajo perióstico (flecha roja) con el vaso que lo vasculariza (*). En la imagen superior derecha (10x) observamos la interfase proximal no consolidada, con tejido cartilaginoso en un proceso de osificación endocondral. En la imagen aumentada inferior derecha (40x) observamos el tejido óseo neoformado en contacto con el implante a nivel del aloinjerto óseo, sugiriendo el estado vital de éste.

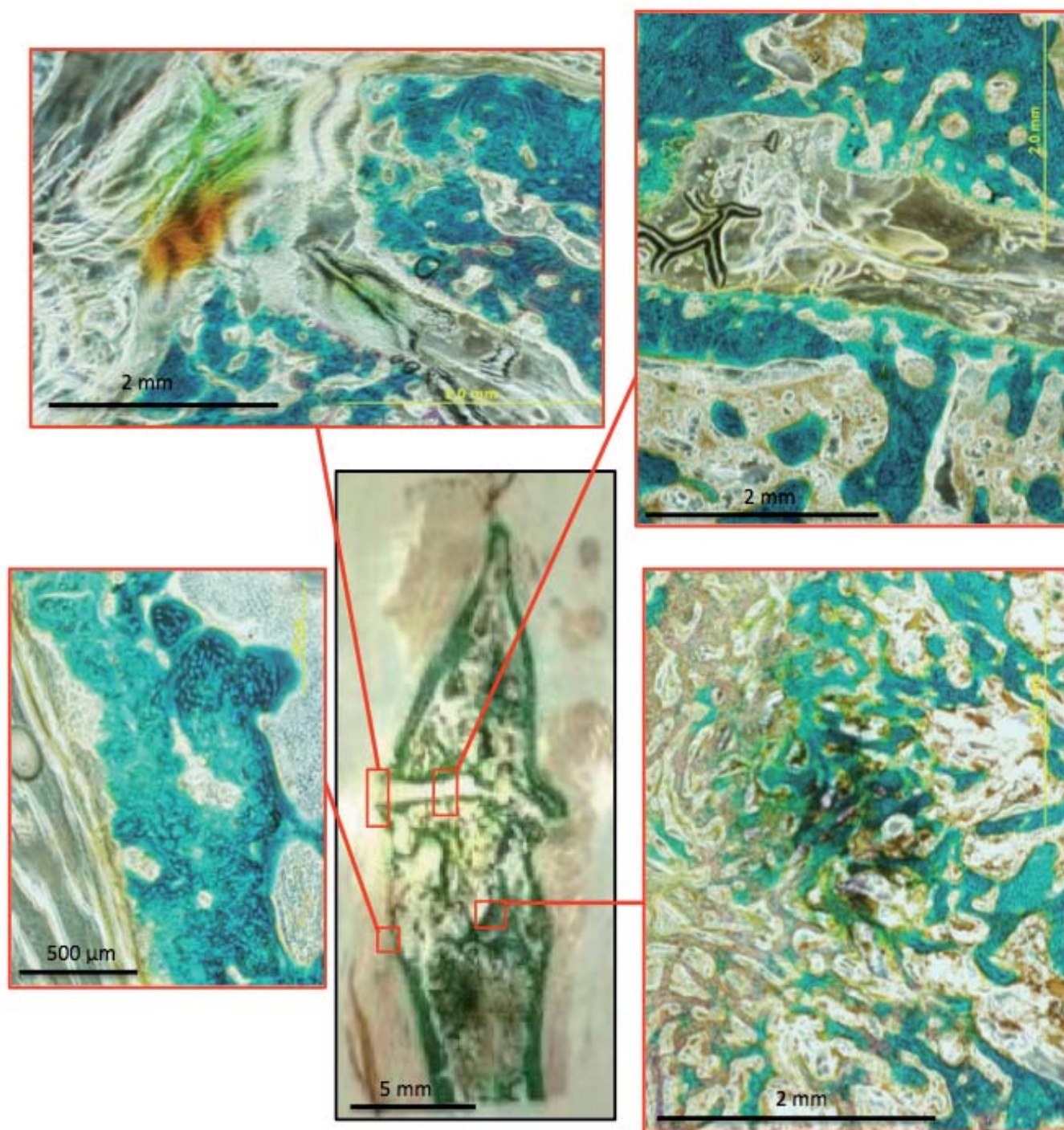


Figura 64. Imágenes obtenidas bajo microscopio óptico de una muestra del grupo experimental GP 10 teñida con Tricrómico de Masson Goldner. En las imágenes aumentadas de la izquierda se observa fibras de periostio en contacto con tejido mineralizado. Nótese la diferencia entre el periostio a nivel de la interfase distal (inferior), donde observamos fibras lineares bien organizadas, con el periostio a nivel de la interfase proximal no consolidada (superior), con fibras desorganizadas. En la imagen superior derecha (4x) observamos la interfase proximal no consolidada, con tejido osteocartilaginoso en un proceso de osificación endocondral. En la imagen aumentada inferior derecha (10x) se observan trabéculas de matriz osteoide en fase de osificación membranosa, correspondientes a la interfase distal ya consolidada.

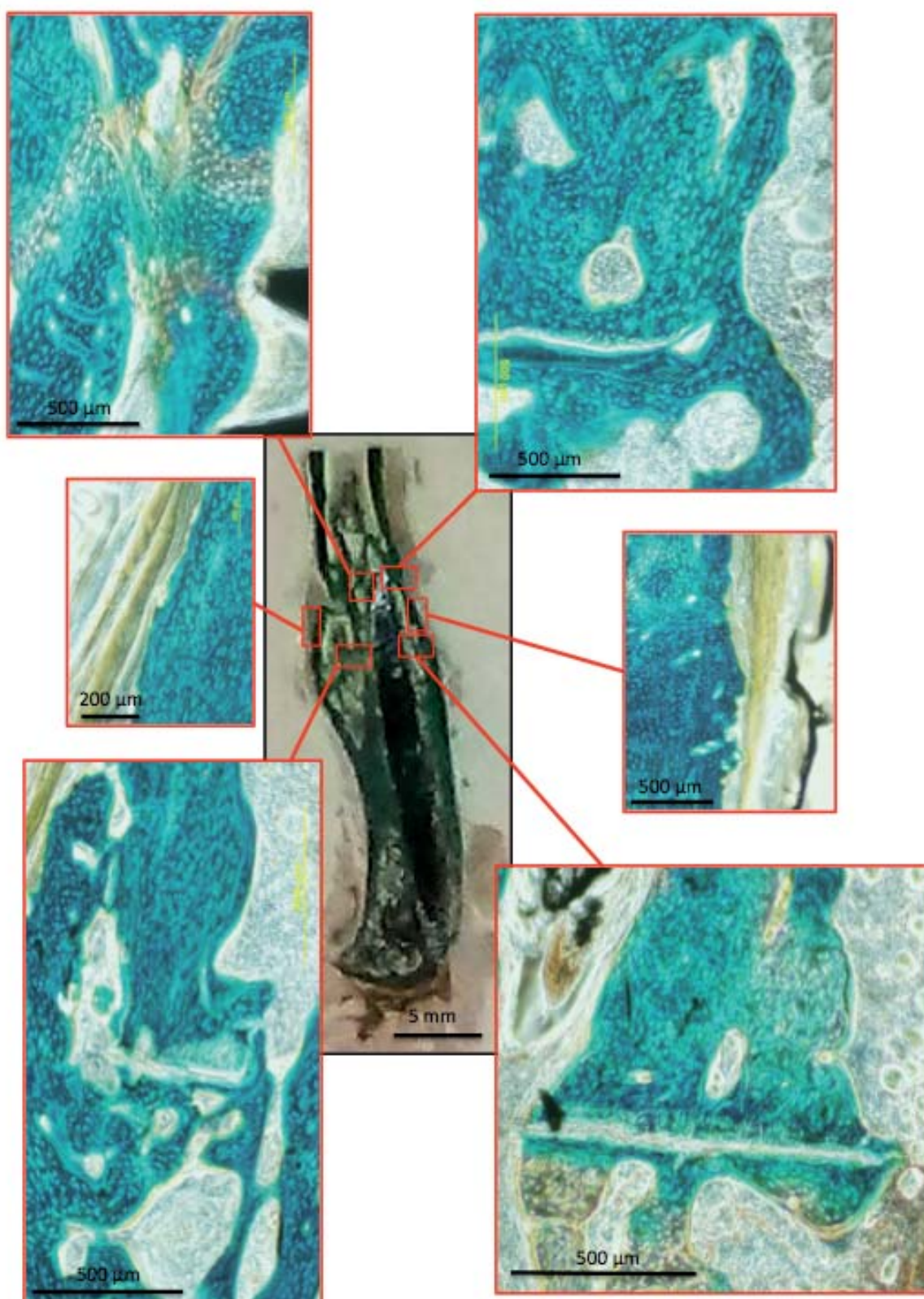


Figura 65. Imágenes obtenidas bajo microscopio óptico de una muestra del grupo experimental GP 10 teñida con Tricrómico de Masson Goldner. En las imágenes aumentadas de las interfases óseas tanto proximal como distal (10x) se observa una consolidación completa por una osificación membranosa. Se observa que el tejido correspondiente al aloinjerto se ha revascularizado y remodelado adoptando la misma estructura y características que el hueso huésped, habiéndose producido la revitalización del aloinjerto. En las imágenes aumentadas centrales se observa la presencia de fibras del colgajo perióstico lineares organizadas a ambos lados del aloinjerto.

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1. Capacidad de osteointegración y revitalización del colgajo perióstico vascularizado

El salvamento de extremidad se ha convertido en el estándar de tratamiento en pacientes afectos de tumor óseo maligno. Se ha conseguido reemplazar actualmente a la amputación sin comprometer el pronóstico oncológico, de la misma manera que sucede con patología traumática o séptica. Esto se debe en gran parte al avance en los tratamientos adyuvantes, las técnicas quirúrgicas y los implantes de reconstrucción [1]. Además, la mejoría de las tasas de supervivencia de estos pacientes exige una alta calidad de las técnicas reconstructivas. La reconstrucción de defectos óseos masivos sigue representando en la actualidad uno de los principales retos terapéuticos que encontramos en la cirugía ortopédica.

Entre las opciones reconstructivas, una de las más utilizadas es el aloinjerto masivo. Sin embargo, no está exento de complicaciones, con tasas de no unión de entre el 10% y el 15%, de fractura del 7% al 30% y de infección del 5% al 21% en cirugías de salvamento de extremidad [5–11]. La baja tasa de consolidación que presentan los aloinjertos óseos estructurales en la clínica se ha reproducido en estudios preclínicos de reconstrucción de defectos óseos críticos. Poser y cols. [230] describieron y validaron un modelo de defecto óseo crítico en rata de 5 mm en el tercio medio femoral. En la reconstrucción de estos defectos con aloinjerto óseo estructural, son varios los autores que no han objetivado osteointegración ni osteogénesis a las 6, 8 ni 12 semanas de seguimiento [227,228,231,233]. En nuestro trabajo se han confirmado estos datos, observándose en el estudio

mediante *microCT* la ausencia prácticamente completa de puentes óseos a las 4, 6 y 10 semanas de seguimiento en los grupos control GA, tanto en las osteotomías proximales como distales. Al realizar el estudio histológico e histomorfométrico se corroboraron estos resultados, evidenciándose una nula integración del aloinjerto con el hueso huésped y manteniendo su estado avascular.

Uno de los puntos controvertidos cuando se realizan reconstrucciones de defectos óseos masivos es el sistema de fijación. No existe un dispositivo de fijación ideal para los aloinjertos. La fijación con clavo se ha asociado a una tasa más alta de no unión y reintervención que con el uso de placas [58]. Estudios previos habían sugerido que una fijación rígida, como la que aportan las placas, aumentaba la incorporación del aloinjerto [11,57]. Vander Griend [11] además destacó la asociación entre la obtención de una fijación estable, más sencilla con el uso de placas, y la disminución de la tasa de no unión. A pesar de ello, no encontraron relación significativa entre la tasa de unión y el tipo de dispositivo de fijación aplicado. Por otra parte, observaron un aumento significativo de la tasa de fractura del injerto con el uso de placas, probablemente producido por el estrés mecánico asociado. De la misma manera, Thompson y cols. [65] identificaron una relación clara entre la fractura del aloinjerto y la penetración de su cortical con los implantes utilizados, lo cual sucedía mayoritariamente con las placas. Si nos centramos en estudios experimentales la controversia todavía es mayor, dado que es difícil obtener una fijación reproducible y que permita una carga inmediata sobre la extremidad sin comprometer la reconstrucción. En nuestro estudio se utilizó una aguja endomedular como sistema de fijación, análoga a los clavos endomedulares que se utilizan en fijaciones diafisarias en la práctica clínica. Se valoró la opción de placa, pero consideramos que podría interferir con el colgajo

perióstico, lo cual disminuiría en gran medida la superficie de contacto. Además, Gebauer y cols. [237] habían recomendado el uso del enclavado endomedular como implante de elección en el tratamiento de defectos en fémur de rata. Se colocó el clavo endomedular de forma retrógrada desde el defecto óseo ya que de esta manera disminuía el riesgo de perforación cortical, como sucede en un porcentaje no despreciable cuando se introduce anterógradamente desde el trocánter mayor, tal como habían observado Jager y cols. [226]. De esta manera también evitábamos la protrusión de la aguja a nivel intraarticular en la rodilla al introducir el clavo retrógradamente desde el fémur distal, tal como habíamos observado que sucedía en el estudio piloto previo en el que empleamos esta técnica. En el presente estudio, si bien se obtuvo una buena fijación en el fémur proximal, a nivel distal fue precaria. A pesar de obtener una buena fijación intraoperatoriamente, al final del seguimiento, tanto en los grupos controles como experimentales, se observó una tasa de osteolisis periimplante distal mayor al 75%. Jager y cols. [226] ya habían destacado como problema de este tipo de fijación la ausencia de estabilidad rotacional. Además, dada la morfología del fémur con un ensanchamiento metafisario distal, al existir campaneó distal de la aguja que no se encuentra bloqueada, se produce consecuentemente osteolisis de este segmento. En los últimos años se ha desarrollado un modelo de clavo endomedular bloqueado para fémur de rata (RatNail, RISystem®) que podría solventar los problemas de la aguja endomedular, aunque el elevado coste económico en comparación a la aguja roscada, así como la limitada evidencia con estos implantes en el momento actual, hicieron que nos decantáramos por la aguja como sistema de fijación.

El aloinjerto óseo estructural, a pesar de las complicaciones que presenta,

comparado con constructos diseñados en ingeniería tisular con materiales duros, sigue siendo la opción óptima en la reconstrucción de grandes defectos, dadas sus propiedades mecánicas [239,240]. Aprovechando estas ventajas mecánicas, diversos autores han estudiado cómo mejorar las características biológicas estimulando su bajo potencial osteogénico, y han reportado efectos favorables con el uso de BMP, ALK2, prostaglandina E2 y PTH [227,228,234,241–243,245–248,253–260]. Una de las líneas de estudio que se encuentra actualmente en desarrollo es la del diseño de un periostio sintético aplicable a la práctica clínica, aunque los trabajos se encuentran en fases muy iniciales debido a que la complejidad de la estructura y características del periostio hacen muy difícil replicar todas sus propiedades *in vitro* [231,266–270].

La propiedad osteogénica del periostio gracias a las células madres mesenquimales que se encuentran en el *cambium* ha sido estudiada en diversas ocasiones [183–187]. Concretamente, en estudios experimentales se ha observado que la retirada del periostio de un autoinjerto en reconstrucciones de defectos óseos masivos disminuía la formación ósea del injerto entre el 63 y 73%, y reducía en un 75% en el número de osteoclastos, lo que compromete la capacidad de remodelación [190,288]. Asimismo, se ha evidenciado que la capacidad osteogénica del periostio está íntimamente ligada con su vascularización [193,195,196]. A pesar de la amplia información que tenemos de las propiedades del periostio *in situ*, existe una evidencia científica muy limitada en cuanto a sus características y capacidades como colgajo vascularizado. Ortak [198] comparó la actividad osteogénica de colgajos periósticos, injertos periósticos y periostio prefabricado, concluyendo que ésta era claramente mayor y más precoz con los colgajos periósticos vascularizados. Vogelín y cols. [248] demostraron que la

neoformación ósea en un defecto óseo crítico aumentaba en aproximadamente el 50% con la asociación de un colgajo perióstico vascularizado a una matriz con rhBMP-2. No obstante, objetivaron que no se producía cuando a la matriz no se le habían añadido rhBMP-2. Nau y cols. [20] evidenciaron un aumento tanto de la osteogénesis como de la neoangiogénesis con el uso de colgajos periísticos vascularizados, se asociara o no a matriz o a células madre mesenquimales. En su trabajo destacaron la importancia de que se tratara de un colgajo vascularizado, ya que al ligarse el pedículo se observó únicamente una mínima formación ósea a nivel del defecto y el colgajo perióstico reabsorbido parcialmente a las 4 semanas y totalmente a las 8 semanas. Además, entre los grupos con colgajo perióstico vascularizado, observaron los resultados óptimos en cuanto a densidad ósea y estabilidad biomecánica cuando se habían asociado células madre mesenquimales. En el presente estudio se ha evidenciado la capacidad osteogénica del periostio en su faceta de colgajo, y se ha observado presencia de neoformación ósea moderada-amplia (igual o mayor al diámetro del fémur) en todos los grupos experimentales, que se extendía a lo largo de todo el injerto, siendo nula en todos los grupos controles, con diferencias estadísticamente significativas. Esta capacidad supondría una gran ventaja respecto al colgajo de peroné vascularizado, donde el potencial osteogénico se encuentra únicamente en los extremos del colgajo [187].

En el estudio histológico y mediante SEM observamos que dicha neoformación ósea correspondía a tejido óseo inmaduro procedente del periostio en contacto con el aloinjerto, remodelándolo e incorporándolo. En las muestras del grupo control únicamente se observaba tejido óseo inmaduro procedente de los extremos del hueso huésped, pero carecían de este tejido en la superficie del aloinjerto. Tiyyapattanaputi y cols. [289] ya observaron que con el uso de

autoinjertos estructurales con el periostio intacto en reconstrucciones de defectos intercalares (se realizaban osteotomías proximal y distal en el fémur, pero se mantenía en el mismo lugar), existía neoformación ósea a nivel de la superficie de estos mediante un proceso de osificación intramembranosa y en las interfases óseas de tipo endocondral, mientras que con el uso de aloinjertos óseos únicamente estaba presente la segunda. En nuestro trabajo, al correlacionar estas imágenes con las de microscopía confocal tras marcaje con fluorocromos, se ponía de manifiesto que existe una aposición ósea lineal y estructurada del tejido mineralizado neoformado propia del colgajo perióstico, a diferencia de las muestras del grupo control en que existía una gran desestructuración ósea (Figuras 66 y 67).

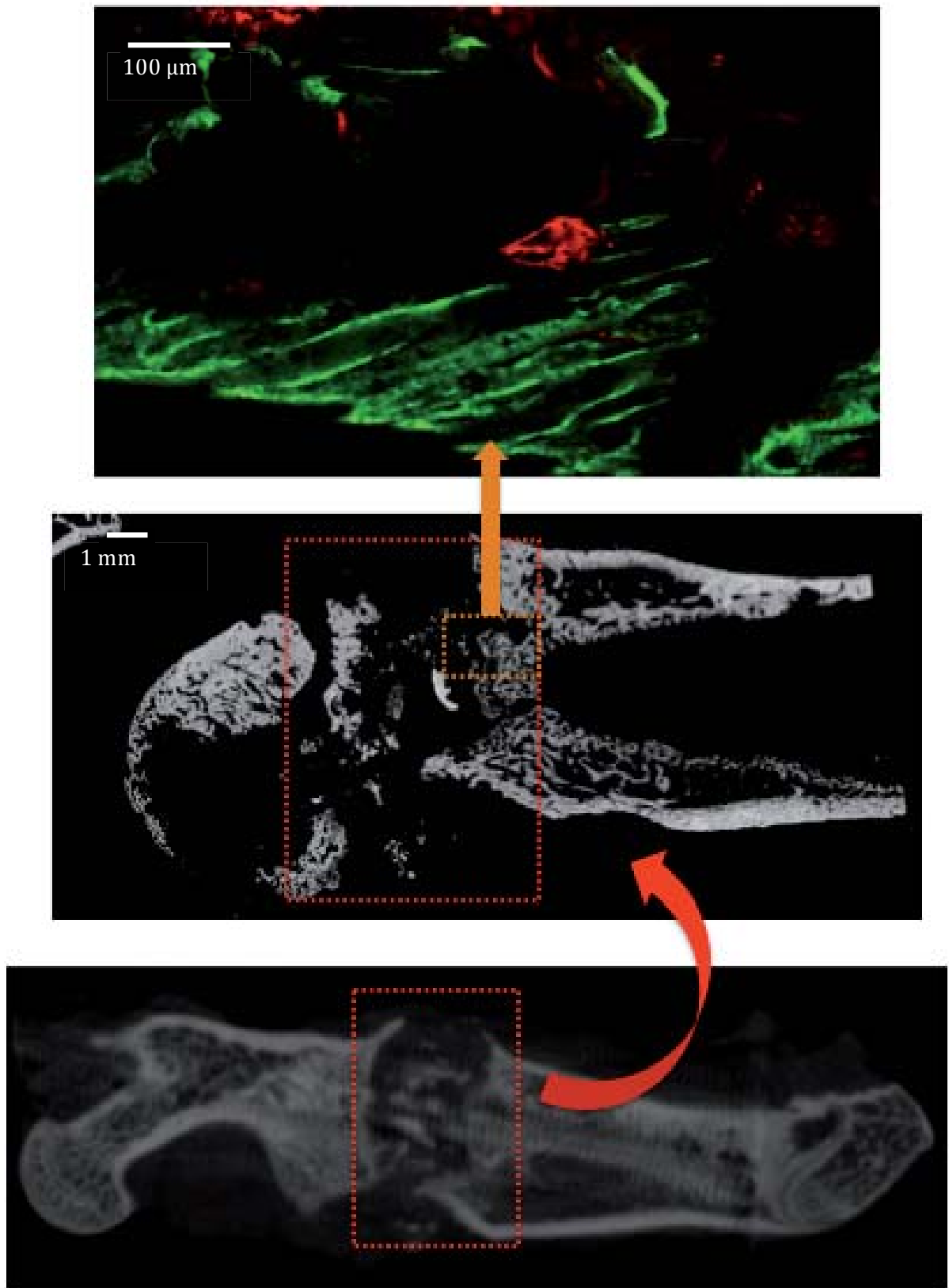


Figura 66. Relación de imágenes de *microCT* – microscopia electrónica de barrido – microscopia confocal en rata del grupo control GA 10. Se observa una fragmentación y reabsorción del aloinjerto. No observamos tejido óseo neoformado en la superficie del aloinjerto, sino en los extremos del hueso huésped. Al relacionar las imágenes con las de microscopia confocal, observamos que el hueso neoformado se corresponde con un hueso desestructurado, sin crecimiento ordenado.

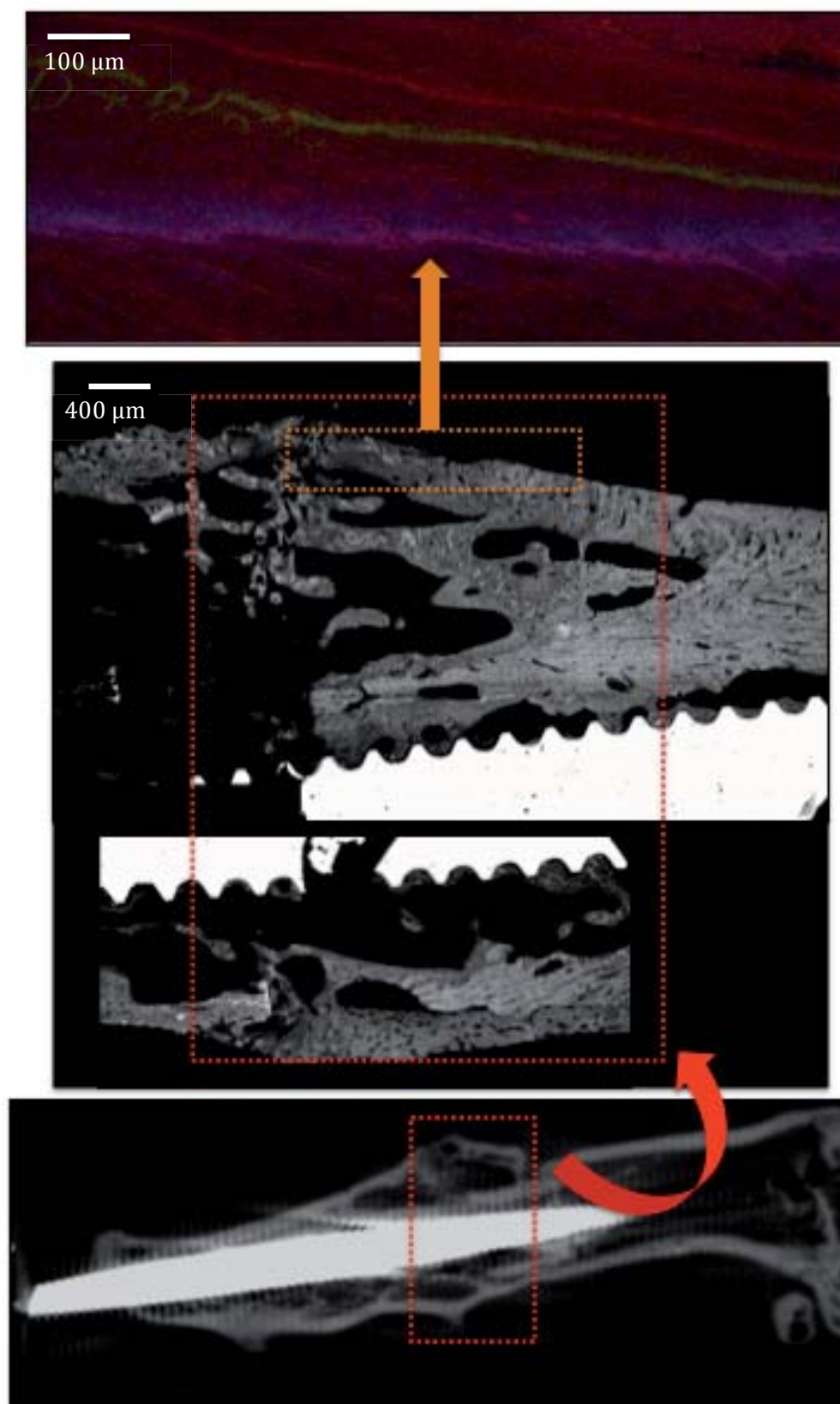


Figura 67. Relación de imágenes de *microCT* – microscopia electrónica de barrido – microscopia confocal en una rata del grupo experimental GP 10. Se observa como el aloinjerto óseo se ha osteointegrado con el hueso huésped. Al relacionar las imágenes con las de microscopia confocal, observamos como el hueso neoformado se corresponde con hueso procedente del colgajo perióstico con crecimiento lineal de forma estructurada.

Gracias al marcaje con fluorocromos en diferentes etapas del seguimiento, se pudo calcular la tasa de aposición ósea que traduce la velocidad osteogénica del colgajo perióstico. Estas tasas son variables ya que dependen de la distancia que hay de la zona de medición tanto a la fisis como a la cortical [290], y, dado que el objetivo de nuestro estudio no era evaluar la tasa de aposición ósea, en nuestro trabajo sólo se realizó una medición única por muestra a modo de análisis descriptivo, que era equiparable a resultados descritos en estudios previos [291,292]. Al relacionar la tasa de aposición ósea entre el primer periodo de marcaje y el segundo, se pudo evidenciar que la velocidad de osteogénesis del colgajo perióstico era muy intensa en las primeras semanas, y que pese a disminuir su velocidad, mantenía un potencial osteogénico activo a lo largo de todo el tiempo de seguimiento. Además, se objetivó una aposición ósea sincrónica y organizada a nivel perivascular, que no se observó en los grupos controles. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el *cambium* del periostio, si el colgajo se levanta cuidadosamente, no se ve afectado y mantiene sus propiedades, pese a no incluir la capa más externa de la cortical con el colgajo, contrariamente a lo que había sugerido Sakai [201].

Uno de los principales y más destacables resultados de nuestro estudio es el aumento de la tasa de consolidación a nivel de las interfases hueso huésped-aloinjerto en todos los grupos de estudio al asociar el colgajo perióstico vascularizado. Esta se producía de forma más destacable a nivel de las interfases distales, en las que se ha pasado de observar una tasa consolidación del 6.25% en el grupo control de 10 semanas de seguimiento, a ser 10 veces mayor al asociar el colgajo perióstico. La asociación de un colgajo perióstico vascularizado actúa de este modo como un factor protector de no consolidación y de movilidad a nivel de

las interfases óseas. Asimismo en los grupos de 4 y 6 semanas se ha conseguido la consolidación en más del 25% de los casos, siendo nula en los grupos controles. Al realizar el estudio histológico y mediante SEM, observamos que en los casos en los que se producía consolidación de las interfases (principalmente distales) se había llevado a cabo una osificación intramembranosa. Esta es una osificación directa, que se origina en una membrana mesenquimática vascularizada, el colgajo perióstico en nuestro caso, y que no requiere del paso por tejido cartilaginoso como sucede con la osificación endocondral. De este modo se consigue una osificación más precoz y de más calidad en un periodo de tiempo más corto. La importancia de este hallazgo la encontramos al compararlo en lo que se había observado en publicaciones previas tanto experimentales como clínicas. En condiciones normales, los huesos largos se forman y se reparan por un proceso de osificación endocondral con formación de callo óseo, que es más lenta y muy dependiente de factores como la vascularización y la estabilidad [293]. De la misma manera, en reconstrucciones de defectos óseos intercalares, las uniones de las interfases aloinjerto óseo-hueso huésped se producen mediante una osificación endocondral [4,55,294]. Se observa también el mismo tipo de osificación en las interfases con el uso de autoinjertos estructurales [289]. El hecho de que al asociar un colgajo perióstico vascularizado se produzca una consolidación ósea mediante una osificación intramembranosa ponen de manifiesto el extraordinario potencial osteogénico y de osteointegración que posee el colgajo perióstico vascularizado.

Por otra parte, llama la atención que en el grupo experimental GP 6 no se observó consolidación en ninguna de las interfases proximales, siendo incluso menor, aunque no significativo, que en su grupo control. Estos datos creemos que se pueden explicar porque el colgajo perióstico que utilizamos, tal como describió

Nau [20], tenía una superficie de 5x4 mm así como pedículo de longitud limitada, y a pesar de que se intentó suturarlo centrado cubriendo la máxima superficie del aloinjerto, en ocasiones la interfase proximal sólo quedaba cubierta parcialmente. Además, dada la movilidad precoz postquirúrgica de la rata, existe la posibilidad de que el colgajo migrara parcialmente hacia distal, dejando descubierta la interfase proximal. El análisis histológico respalda esta teoría, encontrando en las interfases proximales no consolidadas del grupo experimental tejido osteocartilaginoso en un proceso de osificación endocondral, tal como sucede en los grupos controles, y a diferencia de lo que sucede en las interfases distales, donde aparece matriz osteoide irregular en fase de osificación membranosa. Además, observaban a nivel de la interfase distal y superficie del aloinjerto fibras de periostio lineares, que en cambio se encontraban desorganizadas a nivel de las osteotomías proximales en las que no se produjo consolidación. En la literatura encontramos algunos datos sobre el papel de los colgajos periósticos en la consolidación de interfases óseas, todas ellas hacen referencia a hallazgos clínicos. Son varios los autores han objetivado una disminución del tiempo de consolidación al asociar un faldón de periostio a colgajos de perones vascularizados en reconstrucciones de defectos óseos [15-17,221]. Soldado y cols. [18,187] reportaron resultados excelentes con colgajos periósticos vascularizados en el tratamiento de pseudoartrosis complejas o la prevención de no uniones del aloinjerto óseo en reconstrucciones de grandes defectos, con tiempos de consolidación incluso menores que con el uso de colgajos de peroné vascularizados mediante la técnica de Capanna. En su serie, disminuyeron los tiempos de unión publicados con el uso de colgajos de peroné vascularizado asociado a aloinjertos masivos de 5.4 meses en osteotomías metafisarias y 19.1 meses en diafisarias [33,175], a 2.8 meses y 7.1 meses,

respectivamente, con el uso de colgajos periósticos vascularizados. Por otra parte, en nuestro trabajo ambas osteotomías eran diafisarias, que presentan una menor tasa de unión en estudios clínicos [9,10,57,58]. Frisoni y cols. [59] identificaron la localización de la osteotomía diafisaria como un factor de riesgo de no unión respecto a la metafisaria. Aranguren y cols. [68], además, demostraron un tiempo medio de consolidación menor de las osteotomías metafisarias respecto a las diafisarias (6.5 meses vs. 16 meses). No obstante, también cabe destacar que otros estudios no han encontrado diferencias o incluso refieren una mayor tasa de retraso de consolidación en osteotomías metafisarias [59,295]. Estos resultados desfavorables con las osteotomías diafisarias se pueden explicar por una menor superficie de contacto en estas interfases, en comparación con uniones metafisarias o epifisarias. Consideramos que estos datos aún aportan más valor a nuestros resultados, ya que incluso en las condiciones más adversas se han conseguido unas tasas de consolidación del 68.8% y de 56.3% a las 10 semanas de seguimiento en las osteotomías distal y proximal, respectivamente, gracias al colgajo perióstico vascularizado.

Entendemos la revitalización de un aloinjerto como su revascularización, incorporación y remodelación, y posterior conversión en un hueso viable, no necrótico, con las propiedades biomecánicas y la capacidad reparativa de un hueso normal [50–52]. Se lleva a cabo mediante un proceso conocido como *creeping substitution* [53]. Ennekin [55] demostró la incorporación de sólo un 20% de un aloinjerto óseo en defectos óseos masivos tras un seguimiento de 5 años. Observó que donde se producía la neovascularización, predominantemente en la superficie y en las osteotomías, el hueso adyacente sufría un proceso de resorción osteoclástica y aposición osteoblástica posterior. En el canal medular el tejido

reparativo fibrovascular maduraba a tejido conectivo fibroso. El resto del injerto permanecía avascular y necrótico. En un estudio posterior [4], destacó la gran variabilidad que existía en esta incorporación, lo cual indica la influencia multifactorial que tiene la interacción entre el hueso huésped y el aloinjerto. Si esta revascularización no es suficiente, se aumenta el riesgo de fractura del aloinjerto [64]. El mismo autor realizó un estudio similar valorando el comportamiento de autoinjertos óseos. Observó que se producía una revascularización precoz con una reabsorción inicial asociada a una mayor fragilidad, seguida de una remodelación posterior con la que se producía la consolidación así como la recuperación de la resistencia inicial [81]. Entre las etapas iniciales de la revitalización se encuentra la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos, en la cual el periostio tiene un papel fundamental, ya que su ausencia provoca una disminución del 75% en el número de osteoclastos [190,288].

En la práctica clínica se ha utilizado el colgajo perióstico en la prevención y tratamiento de la osteonecrosis con buenos resultados [191,211–213], lo que sugiere su capacidad de revitalización. En el presente estudio se han reproducido los hallazgos clínicos anteriormente descritos. En los grupos experimentales de nuestro trabajo, en el análisis tanto bajo microscopio óptico como electrónico, hemos podido observar remodelación, revascularización e incorporación del aloinjerto al hueso, fases que están comprendidas en el proceso de revitalización ósea. Además, hemos observado que dicho proceso, al igual que sucede en las interfases hueso huésped-aloinjerto, se lleva a cabo mediante una osificación directa de tipo intramembranosa. Éste constituye un hallazgo importante, ya que en la literatura existía controversia en cuanto al tipo de osificación mediante la cual el periostio realiza su función reparativa. Algunos autores apuestan por una

osificación de tipo endocondral [188,189] y otros por una osificación intramembranosa [185]. La concentración de oxígeno es la principalmente determina el tipo de matriz que es sintetizada por las células osteocondrales: una concentración baja en oxígeno produce una osificación endocondral y una concentración alta, una osificación intramembranosa [185]. Probablemente la buena vascularización que aporta el colgajo perióstico provoca la osificación intramembranosa que observamos en nuestro trabajo. Como consecuencia de este proceso, el aloinjerto inicial adopta la misma estructura y características que el hueso huésped haciendo indistinguible la transición entre ambos. Estos hallazgos, que no observamos en los grupos control, van claramente a favor de la capacidad de revitalización del colgajo perióstico vascularizado. Asimismo, se ha demostrado la presencia de tejido mineralizado neoformado procedente del aloinjerto inicial en contacto con el implante metálico, y no en contacto con el colgajo perióstico vascularizado, lo que también indica el estado vital del aloinjerto óseo.

En el artículo publicado por Wheeler y Enneking en 2005 [64], se evidenció una pérdida de resistencia de un aloinjerto óseo del 50% tras 10 años de seguimiento. Esta se relacionó con el incremento del 600% de microfaturas acumuladas (posiblemente por la carencia de capacidad reparativa del aloinjerto), un aumento del 20% de la porosidad cortical, y una disminución del 10% de la densidad mineral ósea a nivel cortical. Estos datos sugerían una degradación del tejido del aloinjerto que disminuía sus propiedades mecánicas, lo cual tenía relación directa con la revitalización del aloinjerto. El segmento diafisario del aloinjerto óseo, que se mantiene avascular en reconstrucciones con aloinjerto intercalar aislado, representa la zona de menor resistencia y con mayor riesgo de fractura [4,56,64,172]. En el estudio biomecánico del presente estudio se analizó la

resistencia a la torsión de los fémures. Se realizó en los grupos de 10 semanas de seguimiento. Inicialmente se pretendía comparar los fémures del grupo control con el grupo experimental. Al realizar el análisis en el grupo control nos encontramos con una dificultad técnica debida a la inestabilidad de la mayoría de los fémures que no habían consolidado, dando lugar a una gran variabilidad y restando validez a los resultados. Por este motivo decidimos comparar los fémures del grupo experimental con el contralateral no tratado, obteniendo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de torque máximo (559.78 ± 96.86 N-mm vs. 374.87 ± 180.67 N-mm, respectivamente). Las muestras tratadas quirúrgicamente presentaban una mayor variabilidad en los valores de torque máximo obtenidos respecto a los fémures no tratados. Este hecho es debido a que en los fémures control se está evaluando la resistencia a la torsión del propio hueso, mientras que en las muestras tratadas quirúrgicamente se está evaluando la osteointegración del constructo óseo tras un tiempo de implantación *in vivo*. La fractura en los fémures no tratados tuvo lugar en el centro de la diáfisis y de manera frágil, dando lugar a una gráfica homogénea en las diferentes muestras con un pico correspondiente a la resistencia máxima soportada y descenso brusco posterior. Las muestras del grupo experimental también presentaron un valor de torque máximo, aunque comparativamente menor, tras el cual los valores no descienden tan bruscamente dado que la fractura se produce en el propio injerto. El hecho de que no se produzca a nivel de las interfases indica que se ha producido una buena consolidación, pero que la consistencia del injerto óseo estructural es inferior a la del tejido óseo original del fémur control, probablemente porque no se había dejado el suficiente tiempo para adquirir una densidad y consistencia similar al no tratado. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en

cuanto a la tasa de fractura entre los grupos control y experimental. Destaca el hecho de que en los grupos de 4 y 6 semanas la tasa de fractura de los grupos control GA, aunque sin significación, fue inferior a la de los grupos experimentales homólogos. Son varios los autores que han sugerido la relación entre la reabsorción y revascularización precoz que se produce en autoinjertos óseos y su mayor fragilidad inicial, que aumenta a medida que se remodelan [80,81]. Dado que en los grupos experimentales de nuestro estudio se asocia un colgajo perióstico al aloinjerto, podría haberse producido una reabsorción y revascularización precoz similar a la descrita en los autoinjertos óseos, con un aumento de fragilidad inicial como resultado [81], aunque serán necesarios más estudios experimentales que confirmen esta hipótesis.

Si comparamos el colgajo perióstico con otras técnicas vascularizadas, como el colgajo óseo, encontramos ventajas claras. Se ha reportado una importante tasa del 19% de complicaciones en la zona donante tras el tratamiento con un colgajo de peroné [167]. Entre ellas se encuentran las parálisis temporales del nervio peroneo común, la contractura del *flexor hallucis longus*, la deformidad en valgo del tobillo, la disminución de fuerza a nivel del tobillo o el síndrome compartimental [22]. Además, el levantamiento del colgajo óseo provoca inherentemente una desestructuración de la zona donante. Sin embargo, el colgajo perióstico no sólo preserva la reserva ósea subyacente a éste, sino también su circulación endóstica, y de esta manera su viabilidad. Por otra parte, al no tratarse de un colgajo óseo, y por lo tanto rígido, posee la adaptabilidad de la que carece el hueso, y puede ser moldeado alrededor del defecto que se quiere tratar [204]. Además, técnicamente es más sencillo y rápido de levantar, hecho muy importante para disminuir el tiempo quirúrgico en intervenciones complejas. Sumado a esto, el potencial

osteogénico del colgajo perióstico se encuentra en toda su superficie, en el *cambium*, área mucho más extensa que la que posee el colgajo óseo, en el que el potencial osteogénico sólo se encuentra en los extremos [187]. De hecho, Soldado había recomendado el uso de periostio tibial por encima del peroneal por su mayor tamaño y, consecuentemente, su mayor potencial osteogénico [18,214].

Entre los trabajos previamente publicados en la literatura no encontramos ningún estudio comparativo que analice el papel del colgajo perióstico vascularizado asociado a un aloinjerto. Si bien es cierto que estudios clínicos sí habían sugerido la estimulación local de osteointegración mediante el colgajo perióstico [15–17,187,215,221], era necesario un estudio preclínico para dilucidar los efectos biológicos y biomecánicos locales de dicha técnica. En nuestro trabajo hemos demostrado que la asociación del un colgajo perióstico aumenta en 10 veces la tasa de consolidación a las 10 semanas de seguimiento. Estos resultados podrían ser superiores al uso de colgajos de peroné vascularizados en la técnica de Capanna, con la que se ha reportado una disminución del riesgo de no unión del 34% con un aloinjerto óseo intercalar aislado al 8.8% si se asociaba la técnica de Capanna [33,175–177]. En uno de los trabajos, además, mencionaban la capacidad de la técnica de Capanna de inducir la revascularización del segmento diafisario del aloinjerto mediante una interacción entre éste y el colgajo de peroné [169]. Cabe destacar que esta afirmación no estaba respaldada por ninguna demostración histológica. En nuestro estudio se ha conseguido demostrar tanto histopatológicamente, biomecánicamente, como por imagen la capacidad de revitalización que posee el colgajo perióstico vascularizado.

7.2. Limitaciones del estudio

El estudio presentado constituye un trabajo experimental preclínico, y como tal muestra las limitaciones propias de estos trabajos. El modelo animal utilizado es la rata de cepa Sprague-Dawley. Utilizamos el modelo de defecto óseo crítico en fémur de rata descrito y validado por Poser y cols. [232]. La rata es el animal de experimentación más utilizado en modelos de reparación ósea así como en microcirugía [224]. Además de su manejabilidad y fácil mantenimiento y estabulación dado su pequeño tamaño, tienen características como su alta prolificidad. Su buena supervivencia tras complicados procesos quirúrgicos, con un potencial de curación mayor, la convierte en el animal idóneo para realizar investigación básica así como estudios de cribaje iniciales [54,224–229]. A pesar de sus múltiples ventajas, al tratarse de un animal considerado pequeño dificulta su aplicabilidad clínica al humano, al carecer de las similitudes biomecánicas y dimensionales que presentan los animales grandes.

El modelo de colgajo perióstico utilizado en nuestro trabajo ha sido descrito por Nau y cols. [20]. Al tratarse de un colgajo pediculado se preserva la vascularización distal del miembro y de esta manera la morbilidad del animal. Además, no requiere técnicas de sutura microvascular, cuya viabilidad podría haber supuesto un sesgo para nuestro estudio. El principal inconveniente del modelo de colgajo perióstico escogido es que este procedimiento se realiza por medio de un abordaje medial, mientras que para realizar la reconstrucción del defecto óseo se realiza un segundo abordaje lateral, tal como se recomienda en la literatura [226], con las consecuencias que un doble abordaje puede tener tanto para la devascularización regional como para la morbilidad del animal. Además, el

colgajo utilizado presenta un tamaño y longitud del pedículo limitados, que impiden cubrir completamente todo el segmento así como las interfases óseas con este, lo que hubiera constituido una situación idónea. No obstante, esta situación se asemeja más al escenario que podemos encontrar en la práctica clínica, donde defectos óseos masivos difícilmente se pueden cubrir completamente por un colgajo perióstico.

Consideramos que el dispositivo de fijación utilizado en nuestro estudio, dados los resultados obtenidos en cuanto a la tasa de osteolisis periimplante distal, no aportó suficiente estabilidad a la reconstrucción. Si bien es cierto que algunos autores lo posicionan como el implante de elección en el tratamiento de defectos en fémur de rata [237], existe la posibilidad de que una placa o un clavo endomedular bloqueado hubieran dado más estabilidad a la reconstrucción, con la influencia positiva que esta tiene sobre las variables estudiadas, aunque el coste-beneficio de estos implantes también sería un factor a tener en cuenta.

Finalmente, otra de las limitaciones de nuestro estudio, concretamente en el análisis biomecánico, ha sido la imposibilidad de comparar el grupo control reconstruido sólo con aloinjerto y el grupo experimental, que era como había sido diseñado inicialmente. La alta tasa de no unión que existía en el grupo control, produjo una gran inestabilidad de los fémures a analizar. Por este motivo, al que se añadía la dificultad técnica en cuanto al proceso laborioso de preparación de las muestras de pequeño tamaño, los fémures quedaban fijados de una manera precaria, lo que supuso una gran variabilidad de los resultados restando validez. La comparación de los fémures del grupo experimental con el contralateral no tratado mostró resultados a favor del fémur no intervenido. No obstante, probablemente estos resultados se puedan deber a que no había transcurrido el tiempo suficiente

para que el fémur del grupo experimental adquiriera una consistencia similar al no tratado. Si en el diseño inicial del estudio se hubiera contemplado el análisis comparativo que finalmente se llevó a cabo, se podría haber optado por un tiempo de seguimiento mayor para realizar el análisis biomecánico.

7.3. Trascendencia clínica del estudio

Para determinar la trascendencia clínica de este estudio es importante comprender su objetivo principal, que es evaluar la revitalización e osteointegración de un aloinjerto óseo estructural masivo en una reconstrucción de un defecto óseo segmentario en un modelo preclínico en rata.

En el presente estudio hemos demostrado que la asociación de un colgajo perióstico vascularizado a un aloinjerto óseo estimula la tasa de consolidación de las interfases hueso huésped-aloinjerto así como de revitalización del este último. Además se ha evidenciado que la capacidad osteogénica del colgajo perióstico vascularizado, a diferencia de lo que sucede en ausencia de este, se produce mediante una osificación de tipo intramembranosa, hallazgo de suma importancia ya que esta es una vía de osificación directa, que produce hueso de forma más precoz y de mayor calidad, y disminuye así los tiempos de curación, y por tanto en gran medida, reduce las complicaciones más importantes y que más comprometen las reconstrucciones de defectos óseos masivos. De esta manera se justifican los hallazgos de Soldado, en los que objetiva una consolidación precoz con el uso de colgajos periósticos vascularizados [187,214].

La reconstrucción de defectos óseos masivos, ya sea secundaria a patología tumoral, traumática o séptica, sigue siendo actualmente un reto terapéutico. La tasa de no unión con el uso de aloinjertos óseos masivos oscila entre el 12 y el 57% [5,10,57,58], y es, junto con la infección y la fractura, una de las complicaciones principales que compromete la supervivencia de la reconstrucción. El uso de técnicas reconstructivas que aporten vascularización parece ser necesario en estas situaciones biológicamente tan complejas, siendo imperativo aportar fuentes

angiogénicas y osteogénicas. Ante los resultados de nuestro estudio, con el colgajo perióstico vascularizado nos encontramos ante una técnica complementaria con capacidades óptimas de osteogénesis, angiogénesis, osteointegración y revitalización demostradas, y que además carece de la morbilidad de otras técnicas homólogas. El colgajo perióstico es de especial interés en pacientes pediátricos, donde el periostio es más grueso y con un mayor potencial osteogénico [187,210]. Existen pocos tratamientos en la actualidad aplicados a reconstrucciones de grandes defectos óseos con los que se hayan reportado resultados tan favorables como con el colgajo perióstico vascularizado. Por estos motivos, a falta de estudios clínicos prospectivos y randomizados que corroboren nuestros hallazgos, consideramos que las múltiples propiedades de los colgajos periósticos lo posicionan como complemento ideal a los injertos en la reconstrucción de defectos óseos masivos.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El **colgajo perióstico vascularizado** promueve y acelera la **osteointegración** del aloinjerto estructural óseo mediante una **osificación intramembranosa**, y aumenta hasta 10 veces la tasa de consolidación en un modelo experimental.
2. El **colgajo perióstico vascularizado** estimula una **neoformación ósea lineal y organizada** en la superficie del aloinjerto óseo, lo que no interfiere con una aposición ósea sincrónica perivascular.
3. La asociación de un **colgajo perióstico vascularizado** a un aloinjerto estructural óseo estimula su **revitalización** mediante su **revascularización y remodelación**, y adquiere **características histológicas y biomecánicas** similares al hueso huésped en un modelo experimental.
4. Dadas las propiedades osteogénicas y revitalizantes del **colgajo perióstico vascularizado** demostradas en nuestro estudio preclínico, este debe considerarse como una **técnica complementaria** en reconstrucciones con aloinjerto óseo estructural para **disminuir las tasas de complicaciones biomecánicas** que presentan este tipo de reconstrucciones en la práctica clínica.

8. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bacci G, Longhi A, Fagioli F, Briccoli A, Versari M, Picci P. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities: 27 year experience at Rizzoli Institute, Italy. *Eur J Cancer* 2005;41:2836–45. doi:10.1016/j.ejca.2005.08.026.
- [2] Calvo R, Figueroa D, Díaz-Ledezma C, Vaisman A, Figueroa F. [Bone allografts and the functions of bone banks]. *Rev Med Chil* 2011;139:660–6. doi:/S0034-98872011000500015.
- [3] Caldroa P, Donati D, Capanna R, Di Liddo M, Benassi MS, Campanacci DA, et al. A histomorphologic study of explants of massive allografts: preliminary results. *Chir Organi Mov* 1995;80:191–205.
- [4] Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allografts: a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:971–86.
- [5] 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* 1996:86–97.
- [6] Donati D, Di Liddo M, Zavatta M, Manfrini M, Bacci G, Picci P, et al. Massive bone allograft reconstruction in high-grade osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 2000:186–94.
- [7] Gebhardt MC, Flugstad DI, Springfield DS, Mankin HJ. The use of bone allografts for limb salvage in high-grade extremity osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 1991:181–96.
- [8] Mnaymneh W, Malinin TI, Lackman RD, Hornicek FJ, Ghandur-Mnaymneh L. Massive distal femoral osteoarticular allografts after resection of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res* 1994:103–15.

- [9] Muscolo DL, Ayerza MA, Aponte-Tinao L, Ranalletta M, Abalo E. Intercalary femur and tibia segmental allografts provide an acceptable alternative in reconstructing tumor resections. *Clin Orthop Relat Res* 2004;97–102.
- [10] 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;79:97–106.
- [11] Vander Griend RA. The effect of internal fixation on the healing of large allografts. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:657–63.
- [12] Sewell MD, Hanna SA, McGrath A, Aston WJS, Blunn GW, Pollock RC, et al. Intercalary diaphyseal endoprosthetic reconstruction for malignant tibial bone tumours. *J Bone Joint Surg Br* 2011;93:1111–7. doi:10.1302/0301-620X.93B8.25750.
- [13] Babak J, McCarthy J. Repair and grafting bone. In: Mathes S, editor. *Plast. Surg.* 2nd ed., Philadelphia: WB Saunders; 2006, p. 639–718.
- [14] Capanna R, Bufalini C, Campanacci M. A new technique for reconstructions of large metadiaphyseal bone defects. *Orthop Traumatol* 1993;2:159–77. doi:10.1007/BF02620523.
- [15] Soldado F, Fontecha CG, Haddad S, Corona P, Collado D, Llusá M, et al. Composite vascularized fibular epiphyseo-osteo-periosteal transfer for hip reconstruction after proximal femoral tumoral resection in a 4-year-old child. *Microsurgery* 2012;32:489–92. doi:10.1002/micr.21988.
- [16] Soldado F, Diaz-Gallardo P, Sena-Cabo L, Torner F, Bergua-Domingo J, Mascarenhas V V, et al. Vascularized fibular grafts extended with vascularized periosteum in children. *Microsurgery* 2016. doi:10.1002/micr.30063.
- [17] Trignano E, Fallico N, Faenza M, Rubino C, Chen H-C. Free fibular flap with periosteal excess for mandibular reconstruction. *Microsurgery* 2013;33:527–33. doi:10.1002/micr.22159.

- [18] Diaz-Gallardo P, Knörr J, Vega-Encina I, Corona PS, Barrera-Ochoa S, Rodriguez-Baeza A, et al. Free vascularized tibial periosteal graft with monitoring skin island for limb reconstruction: Anatomical study and case report. *Microsurgery* 2015. doi:10.1002/micr.30011.
- [19] Soldado F, Garcia Fontecha C, Haddad S, Hernandez-Fernandez A, Corona P, Guerra-Farfan E. Treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia with vascularized fibular periosteal transplant. *Microsurgery* 2012;32:397–400. doi:10.1002/micr.21985.
- [20] Nau C, Henrich D, Seebach C, Schröder K, Fitzsimmons S-J, Hankel S, et al. Treatment of Large Bone Defects with a Vascularized Periosteal Flap in Combination with Biodegradable Scaffold Seeded with Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells: An Experimental Study in Rats. *Tissue Eng Part A* 2016;22:133–41. doi:10.1089/ten.TEA.2015.0030.
- [21] Pneumaticos SG, Triantafyllopoulos GK, Basdra EK, Papavassiliou AG. Segmental bone defects: from cellular and molecular pathways to the development of novel biological treatments. *J Cell Mol Med* 2010;14:2561–9. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01062.x.
- [22] Lasanianos NG, Kanakaris NK, Giannoudis P V. Current management of long bone large segmental defects. *Orthop Trauma* 2016;24:149–63. doi:10.1016/j.mporth.2009.10.003.
- [23] Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986:299–308.
- [24] Rimondini L, Nicoli-Aldini N, Fini M, Guzzardella G, Tschon M, Giardino R. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:148–54. doi:10.1016/j.tripleo.2004.05.010.
- [25] F2721 AS. Standard Guide for Preclinical In Vivo Evaluation in Critical Size Segmental Bone Defects 2008.

- [26] Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg* 2000;106:360-71; discussion 372.
- [27] Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990;1:60-8.
- [28] Lindsey RW, Gugala Z, Milne E, Sun M, Gannon FH, Latta LL. The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *J Orthop Res* 2006;24:1438-53. doi:10.1002/jor.20154.
- [29] Gugala Z, Lindsey RW, Gogolewski S. New Approaches in the Treatment of Critical-Size Segmental Defects in Long Bones. *Macromol Symp* 2007;253:147-61. doi:10.1002/masy.200750722.
- [30] Oh JK, Bae JH, Oh CW, Biswal S, Hur CR. Treatment of femoral and tibial diaphyseal nonunions using reamed intramedullary nailing without bone graft. *Injury* 2008;39:952-9. doi:10.1016/j.injury.2008.02.024.
- [31] Keating JF, Simpson AHRW, Robinson CM. The management of fractures with bone loss. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87:142-50.
- [32] Hinsche AF, Giannoudis P V, Matthews SJE, Smith RM. Spontaneous healing of a 14 cm diaphyseal cortical defect of the tibia. *Injury* 2003;34:385-8.
- [33] Capanna R, Campanacci DA, Belot N, Beltrami G, Manfrini M, Innocenti M, 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;38:51-60, vi. doi:10.1016/j.jocl.2006.10.008.
- [34] Fuchs B, Ossendorf C, Leerapun T, Sim FH. Intercalary segmental reconstruction after bone tumor resection. *Eur J Surg Oncol* 2008;34:1271-6. doi:10.1016/j.ejso.2007.11.010.

- [35] Bassett CA. Clinical implications of cell function in bone grafting. Clin Orthop Relat Res 1972;87:49–59.
- [36] Bonfiglio M. Repair of bone-transplant fractures. J Bone Joint Surg Am. 1958 Apr; 40-A(2):446-456
- [37] McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg Br 1978;60-B:150–62.
- [38] Harris JS, Bemenderfer TB, Wessel AR, Kacena MA. A review of mouse critical size defect models in weight bearing bones. Bone 2013;55:241–7. doi:10.1016/j.bone.2013.02.002.
- [39] Savaridas T, Wallace RJ, Muir AY, Salter DM, Simpson AHRW. The development of a novel model of direct fracture healing in the rat. Bone Jt Res 2012;1:289–96. doi:10.1302/2046-3758.111.2000087.
- [40] Bolander ME, Balian G. The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. J Bone Joint Surg Am 1986;68:1264–74.
- [41] Lewandrowski KU, Tomford WW, Schomacker KT, Deutsch TF, Mankin HJ. Improved osteoinduction of cortical bone allografts: a study of the effects of laser perforation and partial demineralization. J Orthop Res 1997;15:748–56. doi:10.1002/jor.1100150518.
- [42] de la Piedra C, Vicario C, de Acuña LR, García-Moreno C, Traba ML, Arlandis S, et al. Osteoinductive effect of bone bank allografts on human osteoblasts in culture. J Orthop Res 2008;26:200–7. doi:10.1002/jor.20466.
- [43] Stevenson S, Li XQ, Davy DT, Klein L, Goldberg VM. Critical biological determinants of incorporation of non-vascularized cortical bone grafts. Quantification of a complex process and structure. J Bone Joint Surg Am 1997;79:1–16.

- [44] Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. Instr Course Lect 1996;45:387–99.
- [45] Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. Ann Chir Plast Esthétique 2000;45:346–53.
- [46] Macewen W. Observations concerning Transplantation of Bone. Illustrated by a Case of Inter-Human Osseous Transplantation, Whereby over Two-Thirds of the Shaft of a Humerus Was Restored. Proc R Soc London 1881;32:232–47.
- [47] Lexer E. Die Verwendungs der freien Knochenplastik nebst Versuchen über Gelenkversteifung und Gelenktransplantation. Arch Klin Chir 1908;86:939.
- [48] Muscolo DL, Petracchi LJ, Ayerza MA, Calabrese ME. Massive femoral allografts followed for 22 to 36 years. Report of six cases. J Bone Joint Surg Br 1992;74:887–92.
- [49] Makley JT. The use of allografts to reconstruct intercalary defects of long bones. Clin Orthop Relat Res 1985 Jul-Aug;197:58–75.
- [50] Ito H, Koefoed M, Tiyyapatanaputi P, Gromov K, Goater JJ, Carmouche J, et al. Remodeling of cortical bone allografts mediated by adherent rAAV-RANKL and VEGF gene therapy. Nat Med 2005;11:291–7. doi:10.1038/nm1190.
- [51] Runyan CM, Vu AT, Rumburg A, Bove K, Racadio J, Billmire DA, et al. Repair of a Critical Porcine Tibial Defect by Means of Allograft Revitalization. Plast Reconstr Surg 2015;136:461e–73e. doi:10.1097/PRS.0000000000001637.
- [52] Runyan CM, Ali ST, Chen W, Calder BW, Rumburg AE, Billmire DA, et al. Bone tissue engineering by way of allograft revitalization: mechanistic and mechanical investigations using a porcine model. J Oral Maxillofac Surg 2014;72:1000.e1-11. doi:10.1016/j.joms.2014.01.017.

- [53] Khan SN, Cammisa FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 2005 Jan-Feb;13:77–86.
- [54] Zhang X, Awad HA, O’Keefe RJ, Guldberg RE, Schwarz EM. A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466:1777–87. doi:10.1007/s11999-008-0312-6.
- [55] Enneking WF, Mindell ER. Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:1123–42.
- [56] Berrey BH, Lord CF, Gebhardt MC, Mankin HJ. Fractures of allografts. Frequency, treatment, and end-results. *J Bone Joint Surg Am* 1990;72:825–33.
- [57] Aponte-Tinao L, Farfalli GL, Ritacco LE, Ayerza MA, Muscolo DL. Intercalary femur allografts are an acceptable alternative after tumor resection. *Clin Orthop Relat Res* 2012;470:728–34. doi:10.1007/s11999-011-1952-5.
- [58] Bus MPA, Dijkstra PDS, van de Sande MAJ, Taminiau AHM, Schreuder HWB, Jutte PC, et al. Intercalary allograft reconstructions following resection of primary bone tumors: a nationwide multicenter study. *J Bone Joint Surg Am* 2014;96:e26. doi:10.2106/JBJS.M.00655.
- [59] Frisoni T, Cevolani L, Giorgini A, Dozza B, Donati DM. Factors affecting outcome of massive intercalary bone allografts in the treatment of tumours of the femur. *J Bone Joint Surg Br* 2012;94:836–41. doi:10.1302/0301-620X.94B6.28680.
- [60] 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;66:93–6.
- [61] Voggenreiter G, Klaes W, Assenmacher S, Schmit-Neuerburg KP. Massive intercalary bone allografts in the treatment of primary and secondary bone tumors. A report on 21 cases. *Arch Orthop Trauma Surg* 1995;114:308–18.

- [62] Matejovsky Z, Matejovsky Z, Kofranek I. Massive allografts in tumour surgery. *Int Orthop* 2006;30:478–83. doi:10.1007/s00264-006-0223-7.
- [63] Farfalli GL, Aponte-Tinao L, Lopez-Millán L, Ayerza MA, Muscolo DL. Clinical and functional outcomes of tibial intercalary allografts after tumor resection. *Orthopedics* 2012;35:e391-6. doi:10.3928/01477447-20120222-25.
- [64] Wheeler DL, Enneking WF. Allograft bone decreases in strength in vivo over time. *Clin Orthop Relat Res* 2005:36–42.
- [65] Thompson RC, Garg A, Clohisy DR, Cheng EY. Fractures in large-segment allografts. *Clin Orthop Relat Res* 2000:227–35.
- [66] Mankin HJ, Hornicek FJ, Raskin KA. Infection in massive bone allografts. *Clin Orthop Relat Res* 2005:210–6.
- [67] Lord CF, Gebhardt MC, Tomford WW, Mankin HJ. Infection in bone allografts. Incidence, nature, and treatment. *J Bone Joint Surg Am* 1988;70:369–76.
- [68] San Julian Aranguren M, Leyes M, Mora G, Cañadell J. Consolidation of massive bone allografts in limb-preserving operations for bone tumours. *Int Orthop* 1995;19:377–82.
- [69] Hornicek FJ, Gebhardt MC, Tomford WW, Sorger JI, Zavatta M, Menzner JP, et al. Factors affecting nonunion of the allograft-host junction. *Clin Orthop Relat Res* 2001:87–98.
- [70] Amsel S, Dell ES. Response of the preosteoblast and stem cell of rat bone marrow to a lethal dose of x-irradiation or cyclophosphamide. *Cell Tissue Kinet* 1971;4:255–61.
- [71] Nilsson OS, Bauer HC, Brostrom LA. Comparison of the effects of adriamycin and methotrexate on orthotopic and induced heterotopic bone in rats. *J Orthop Res* 1990;8:199–204. doi:10.1002/jor.1100080207.

- [72] Buecker PJ, Berenstein M, Gebhardt MC, Hornicek FJ, Mankin HJ. Locking versus standard plates for allograft fixation after tumor resection in children and adolescents. *J Pediatr Orthop* 2006;26:680–5. doi:10.1097/01.bpo.0000230333.73286.06.
- [73] DeCoster TA, Gehlert RJ, Mikola EA, Pirela-Cruz MA. Management of posttraumatic segmental bone defects. *J Am Acad Orthop Surg* 2004 Jan-Feb;12:28–38.
- [74] Jaffe KA, Morris SG, Sorrell RG, Gebhardt MC, Mankin HJ. Massive bone allografts for traumatic skeletal defects. *South Med J* 1991;84:975–82.
- [75] McAndrew MP, Nelson RL. Allografting for traumatic intercalary femoral defects: a report of three cases. *J Orthop Trauma* 1989;3:250–6.
- [76] Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 1987;18:187–96.
- [77] Hertel R, Gerber A, Schlegel U, Cordey J, Rügsegger P, Rahn BA. Cancellous bone graft for skeletal reconstruction. Muscular versus periosteal bed--preliminary report. *Injury* 1994;25 Suppl 1:A59-70.
- [78] Weiland AJ, Phillips TW, Randolph MA. Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 1984;74:368–79.
- [79] Stevenson S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clin Orthop Relat Res* 1998:S239-46.
- [80] Goldberg VM, Stevenson S, Shaffer JW, Davy D, Klein L, Zika J, et al. Biological and physical properties of autogenous vascularized fibular grafts in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 1990;72:801–10.
- [81] Enneking WF, Eady JL, Burchardt H. Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects. *J Bone Joint Surg Am* 1980;62:1039–58.

- [82] Krieg AH, Hefti F. Reconstruction with non-vascularised fibular grafts after resection of bone tumours. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89:215–21. doi:10.1302/0301-620X.89B2.17686.
- [83] Hsu RW, Wood MB, Sim FH, Chao EY. Free vascularised fibular grafting for reconstruction after tumour resection. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79:36–42.
- [84] de Boer HH, Wood MB. Bone changes in the vascularised fibular graft. *J Bone Joint Surg Br* 1989;71:374–8.
- [85] Yadav SS. Dual-fibular grafting for massive bone gaps in the lower extremity. *J Bone Joint Surg Am* 1990;72:486–94.
- [86] Schuh R, Panotopoulos J, Puchner SE, Willegger M, M. Hobusch G, Windhager R, et al. Vascularised or non-vascularised autologous fibular grafting for the reconstruction of a diaphyseal bone defect after resection of a musculoskeletal tumour. *Bone Joint J* 2014;96-B:1258–63. doi:10.1302/0301-620X.96B9.33230.
- [87] Platz A, Werner CM KW. Reconstruction of posttraumatic bony defects of the lower extremity: callotaxis or free vascularized fibula graft? *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2004;36:397–404.
- [88] Igarashi K, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Nishida H, Kimura H, et al. The long-term outcome following the use of frozen autograft treated with liquid nitrogen in the management of bone and soft-tissue sarcomas. *Bone Joint J* 2014;96-B:555–61. doi:10.1302/0301-620X.96B4.32629.
- [89] Tsuchiya H, Wan SL, Sakayama K, Yamamoto N, Nishida H, Tomita K. Reconstruction using an autograft containing tumour treated by liquid nitrogen. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87:218–25.
- [90] Harrington KD. The use of hemipelvic allografts or autoclaved grafts for reconstruction after wide resections of malignant tumors of the pelvis. *J Bone Joint Surg Am* 1992;74:331–41.

- [91] Chen TH, Chen WM, Huang CK. Reconstruction after intercalary resection of malignant bone tumours: comparison between segmental allograft and extracorporeally-irradiated autograft. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87:704–9. doi:10.1302/0301-620X.87B5.15491.
- [92] Sys G, Uyttendaele D, Poffyn B, Verdonk R, Verstraete L. Extracorporeally irradiated autografts in pelvic reconstruction after malignant tumour resection. *Int Orthop* 2002;26:174–8. doi:10.1007/s00264-002-0352-6.
- [93] Thompson VP, Steggall CT. Chondrosarcoma of the proximal portion of the femur treated by resection and bone replacement; a six-year result. *J Bone Joint Surg Am* 1956;38-A:357–67.
- [94] 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* 2004:258–66.
- [95] Kim H-S, Kim K-J, Han I, Oh JH, Lee S-H. The use of pasteurized autologous grafts for periacetabular reconstruction. *Clin Orthop Relat Res* 2007;464:217–23. doi:10.1097/BLO.0b013e3181583ae4.
- [96] Liebergall M, Simkin A, Mendelson S, Rosenthal A, Amir G, Segal D. Effect of moderate bone hyperthermia on cell viability and mechanical function. *Clin Orthop Relat Res* 1998:242–8.
- [97] Sugiura H, Takahashi M, Nakanishi K, Nishida Y, Kamei Y. Pasteurized intercalary autogenous bone graft combined with vascularized fibula. *Clin Orthop Relat Res* 2007;456:196–202. doi:10.1097/01.blo.0000246565.03833.73.
- [98] Khattak MJ, Umer M, Haroon-ur-Rasheed, Umar M. Autoclaved tumor bone for reconstruction: an alternative in developing countries. *Clin Orthop Relat Res* 2006;447:138–44. doi:10.1097/01.blo.0000205876.05093.80.

- [99] Sugiura H, Yamamura S, Sato K, Katagiri H, Nishida Y, Nakashima H, et al. Remodelling and healing process of moderately heat-treated bone grafts after wide resection of bone and soft-tissue tumors. *Arch Orthop Trauma Surg* 2003;123:514–20. doi:10.1007/s00402-003-0556-2.
- [100] Shimizu K, Masumi S, Yano H, Fukunaga T, Ikebe S, Shin S. Revascularization and new bone formation in heat-treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 1999;119:57–61.
- [101] Han I, Kim JH, Cho H-S, Kim H-S. Low-heat treated autograft versus allograft for intercalary reconstruction of malignant bone tumors. *J Surg Oncol* 2014;110:823–7. doi:10.1002/jso.23727.
- [102] Inokuchi T, Ninomiya H, Hironaka R, Yoshida S, Araki M, Sano K. Studies on heat treatment for immediate reimplantation of resected bone. *J Craniomaxillofac Surg* 1991;19:31–9.
- [103] Manabe J. [Experimental studies on pasteurized autogenous bone graft]. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1993;67:255–66.
- [104] Ito T, Sakano S, Sato K, Sugiura H, Iwata H, Murata Y, et al. Sensitivity of osteoinductive activity of demineralized and defatted rat femur to temperature and duration of heating. *Clin Orthop Relat Res* 1995:267–75.
- [105] Masquelet AC. Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction. *Langenbecks Arch Surg* 2003;388:344–6. doi:10.1007/s00423-003-0379-1.
- [106] Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J Orthop Res* 2004;22:73–9. doi:10.1016/S0736-0266(03)00165-7.

- [107] Viateau V, Guillemin G, Calando Y, Logeart D, Oudina K, Sedel L, et al. Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: an ovine model. *Vet Surg* 2006;35:445–52. doi:10.1111/j.1532-950X.2006.00173.x.
- [108] Freund R, Wolff TW, Freund B. Silicone block interposition for traumatic bone loss. *Orthopedics* 2000;23:795, 799, 802, 804.
- [109] Pelissier P, Martin D, Baudet J, Lepreux S, Masquelet A-C. Behaviour of cancellous bone graft placed in induced membranes. *Br J Plast Surg* 2002;55:596–8.
- [110] Villemagne T, Bonnard C, Accadbled F, L'kaissi M, de Billy B, Sales de Gauzy J. Intercalary segmental reconstruction of long bones after malignant bone tumor resection using primary methyl methacrylate cement spacer interposition and secondary bone grafting: the induced membrane technique. *J Pediatr Orthop* 2011 Jul-Aug;31:570–6. doi:10.1097/BPO.0b013e31821ffa82.
- [111] Stafford PR, Norris BL. Reamer-irrigator-aspirator bone graft and bi Masquelet technique for segmental bone defect nonunions: a review of 25 cases. *Injury* 2010;41 Suppl 2:S72-7. doi:10.1016/S0020-1383(10)70014-0.
- [112] McCall TA, Brokaw DS, Jelen BA, Scheid DK, Scharfenberger A V, Maar DC, et al. Treatment of large segmental bone defects with reamer-irrigator-aspirator bone graft: technique and case series. *Orthop Clin North Am* 2010;41:63–73; table of contents. doi:10.1016/j.ocl.2009.08.002.
- [113] Apard T, Bigorre N, Cronier P, Duteille F, Bizot P, Massin P. Two-stage reconstruction of post-traumatic segmental tibia bone loss with nailing. *Orthop Traumatol Surg Res* 2010;96:549–53. doi:10.1016/j.otsr.2010.02.010.

- [114] Sancineto CF, Barla JD. Treatment of long bone osteomyelitis with a mechanically stable intramedullar antibiotic dispenser: nineteen consecutive cases with a minimum of 12 months follow-up. *J Trauma* 2008;65:1416–20. doi:10.1097/TA.0b013e31818c6a09.
- [115] Thomas DB, Brooks DE, Bice TG, DeJong ES, Lonergan KT, Wenke JC. Tobramycin-impregnated calcium sulfate prevents infection in contaminated wounds. *Clin Orthop Relat Res* 2005;441:366–71.
- [116] Alman BA, De Bari A, Krajchich JI. Massive allografts in the treatment of osteosarcoma and Ewing sarcoma in children and adolescents. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:54–64.
- [117] Laffosse J-M, Accadbled F, Abid A, Kany J, Darodes P, Sales De Gauzy J. [Reconstruction of long bone defects with a vascularized fibular graft after tumor resection in children and adolescents: thirteen cases with 50-month follow-up]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 2007;93:555–63.
- [118] Tarkin IS. Reamer Irrigator Aspirator: A New Technique for Bone Graft Harvesting from the Intramedullary Canal. *Oper Tech Orthop* 2008;18:108–13. doi:10.1053/j.oto.2008.08.001.
- [119] Lowe JA, Della Rocca GJ, Murtha Y, Liporace FA, Stover MD, Nork SE, et al. Complications associated with negative pressure reaming for harvesting autologous bone graft: a case series. *J Orthop Trauma* 2010;24:46–52. doi:10.1097/BOT.0b013e31819c0ccb.
- [120] Aronson J, Johnson E, Harp JH. Local bone transportation for treatment of intercalary defects by the Ilizarov technique. Biomechanical and clinical considerations. *Clin Orthop Relat Res* 1989:71–9.
- [121] Magyar G, Toksvig-Larsen S, Moroni A. Hydroxyapatite coating of threaded pins enhances fixation. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79:487–9.

- [122] Min W-K, Min B-G, Oh C-W, Song H-R, Oh J-K, Ahn H-S, et al. Biomechanical advantage of lengthening of the femur with an external fixator over an intramedullary nail. *J Pediatr Orthop B* 2007;16:39–43. doi:10.1097/01.bpb.0000236221.91453.90.
- [123] Paley D, Herzenberg JE, Paremian G, Bhavre A. Femoral lengthening over an intramedullary nail. A matched-case comparison with Ilizarov femoral lengthening. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:1464–80.
- [124] Fischgrund J, Paley D, Suter C. Variables affecting time to bone healing during limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res* 1994:31–7.
- [125] Robert Rozbruch S, Weitzman AM, Tracey Watson J, Freudigman P, Katz H V, Ilizarov S. Simultaneous treatment of tibial bone and soft-tissue defects with the Ilizarov method. *J Orthop Trauma* 2006;20:197–205.
- [126] Tsuchiya H, Tomita K, Shinokawa Y, Minematsu K, Katsuo S, Taki J. The Ilizarov method in the management of giant-cell tumours of the proximal tibia. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78:264–9.
- [127] Jarka DE, Nicholas RW, Aronson J. Effect of methotrexate on distraction osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1998:209–15.
- [128] Subasi M, Kapukaya A, Kesemenli C, Balci TA, Buyukbayram H, Ozates M. Effect of chemotherapeutic agents on distraction osteogenesis. An experimental investigation in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121:417–21.
- [129] Minematsu K, Tsuchiya H, Taki J TK. Blood flow measurement during distraction osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1998;347:229–35.
- [130] Sen C, Kocaoglu M, Eralp L, Gulsen M, Cinar M. Bifocal compression-distraction in the acute treatment of grade III open tibia fractures with bone and soft-tissue loss: a report of 24 cases. *J Orthop Trauma* 2004;18:150–7.

- [131] Lerner A, Fodor L, Soudry M, Peled IJ, Herer D, Ullmann Y. Acute shortening: modular treatment modality for severe combined bone and soft tissue loss of the extremities. *J Trauma* 2004;57:603–8.
- [132] Knothe UR, Springfield DS. A novel surgical procedure for bridging of massive bone defects. *World J Surg Oncol* 2005;3:7. doi:10.1186/1477-7819-3-7.
- [133] Knothe Tate ML, Ritzman TF, Schneider E, Knothe UR. Testing of a new one-stage bone-transport surgical procedure exploiting the periosteum for the repair of long-bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:307–16. doi:10.2106/JBJS.E.00512.
- [134] Mahaluxmivala J, Nadarajah R, Allen PW HR. Ilizarov external fixator: acute shortening and lengthening versus bone transport in the management of tibial non-unions. *Injury* 2005;36:662–8.
- [135] Song HR, Cho SH, Koo KH, Jeong ST, Park YJ, Ko JH. Tibial bone defects treated by internal bone transport using the Ilizarov method. *Int Orthop* 1998;22:293–7.
- [136] Paley D, Catagni MA, Argnani F, Villa A, Benedetti GB, Cattaneo R. Ilizarov treatment of tibial nonunions with bone loss. *Clin Orthop Relat Res* 1989;146–65.
- [137] Taylor GI, Miller GD, Ham FJ. The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg* 1975;55:533–44.
- [138] McKee DM. Microvascular bone transplatation. *Clin Plast Surg* 1978;5:283–92.
- [139] Gerwin M, Weiland AJ. Vascularized bone grafts to the upper extremity. Indications and technique. *Hand Clin* 1992;8:509–23.
- [140] Yajima H, Tamai S, Ono H, Kizaki K. Vascularized bone grafts to the upper extremities. *Plast Reconstr Surg* 1998;101:727-35-7.

- [141] Trignano E, Fallico N, Nitto A, Chen H-C. The treatment of composite defect of bone and soft tissues with a combined latissimus dorsi and serratus anterior and rib free flap. *Microsurgery* 2013;33:173–83. doi:10.1002/micr.22067.
- [142] Brenner P, Zwipp H, Rammelt S. Vascularized double barrel ribs combined with free serratus anterior muscle transfer for homologous restoration of the hindfoot after calcanectomy. *J Trauma* 2000;49:331–5.
- [143] Ueng SW, Chuang DC, Cheng SL, Shih CH. Management of large infected tibial defects with radical debridement and staged double-rib composite free transfer. *J Trauma* 1996;40:345–50.
- [144] Ueng WN, Chuang CC, Shih CH. Double-rib composite free transfer to reconstruct a single-spaced lower extremity defect. *J Trauma* 1995;38:210–2.
- [145] Werner CML, Favre P, van Lenthe HG, Dumont CE. Pedicled vascularized rib transfer for reconstruction of clavicle nonunions with bony defects: anatomical and biomechanical considerations. *Plast Reconstr Surg* 2007;120:173–80. doi:10.1097/01.prs.0000263537.57701.8b.
- [146] Zaker Shahrak A, Zor F, Kanatas A, Acikel C, Sapountzis S, Nicoli F, et al. Morphological and morphometric evaluation of the ilium, fibula, and scapula bones for oral and maxillofacial reconstruction. *Microsurgery* 2014;34:638–45. doi:10.1002/micr.22307.
- [147] Campanacci DA, Puccini S, Caff G, Beltrami G, Piccioli A, Innocenti M, et al. Vascularised fibular grafts as a salvage procedure in failed intercalary reconstructions after bone tumour resection of the femur. *Injury* 2014;45:399–404. doi:10.1016/j.injury.2013.10.012.
- [148] Wei FC, El-Gammal TA, Lin CH, Ueng WN. Free fibula osteoseptocutaneous graft for reconstruction of segmental femoral shaft defects. *J Trauma* 1997;43:784–92.

- [149] Hariri A, Mascard E, Atlan F, Germain MA, Heming N, Dubousset JF, et al. Free vascularised fibular graft for reconstruction of defects of the lower limb after resection of tumour. *J Bone Joint Surg Br* 2010;92:1574–9. doi:10.1302/0301-620X.92B11.23832.
- [150] Abarca J, Valle P, Valenti P. Clavicular reconstruction with free fibula flap: a report of four cases and review of the literature. *Injury* 2013;44:283–7. doi:10.1016/j.injury.2013.01.026.
- [151] Onishi K, Maruyama Y. Compound rib-latissimus dorsi osteomusculocutaneous flap in reconstruction of the upper arm. *Ann Plast Surg* 1996;37:191–4.
- [152] Bruck JC, Bier J, Kistler D. The serratus anterior osteocutaneous free flap. *J Reconstr Microsurg* 1990;6:209–13. doi:10.1055/s-2007-1006820.
- [153] Moran CG, Wood MB. Vascularized bone autografts. *Orthop Rev* 1993;22:187–97.
- [154] Brunelli G, Vigasio A, Battiston B, Di Rosa F, Brunelli G. Free microvascular fibular versus conventional bone grafts. *Int Surg* 1991;76:33–42.
- [155] Ceruso M, Taddei F, Bigazzi P, Manfrini M. Vascularised fibula graft inlaid in a massive bone allograft: considerations on the bio-mechanical behaviour of the combined graft in segmental bone reconstructions after sarcoma resection. *Injury* 2008;39 Suppl 3:S68-74. doi:10.1016/j.injury.2008.05.014.
- [156] Lin CH, Wei FC, Chen HC, Chuang DC. Outcome comparison in traumatic lower-extremity reconstruction by using various composite vascularized bone transplantation. *Plast Reconstr Surg* 1999;104:984–92.
- [157] Goldberg VM, Shaffer JW, Field G, Davy DT. Biology of vascularized bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1987;18:197–205.
- [158] Shaffer JW, Field GA, Goldberg VM, Davy DT. Fate of vascularized and nonvascularized autografts *Clin Orthop Relat Res* 1985 Jul-Aug;197:32–43.

- [159] Shaffer JW, Davy DT, Field GA, Bensusan JS, Kellis GJ. The superiority of vascularized compared to nonvascularized rib grafts in spine surgery shown by biological and physical methods. *Spine (Phila Pa 1976)* 1988;13:1150–4.
- [160] Weiland AJ, Moore JR, Daniel RK. Vascularized bone autografts. Experience with 41 cases. *Clin Orthop Relat Res* 1983:87–95.
- [161] Nusbickel FR, Dell PC, McAndrew MP, Moore MM. Vascularized autografts for reconstruction of skeletal defects following lower extremity trauma. A review. *Clin Orthop Relat Res* 1989:65–70.
- [162] Weiland AJ, Moore JR, Daniel RK. The efficacy of free tissue transfer in the treatment of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am* 1984;66:181–93.
- [163] Weiland AJ. Current concepts review: vascularized free bone transplants. *J Bone Joint Surg Am* 1981;63:166–9.
- [164] Hilven PH, Bayliss L, Cosker T, Dijkstra PDS, Jutte PC, Lahoda LU, et al. The vascularised fibular graft for limb salvage after bone tumour surgery: a multicentre study. *Bone Joint J* 2015;97–B:853–61. doi:10.1302/0301-620X.97B6.34692.
- [165] Hou SM, Liu TK. Reconstruction of skeletal defects in the femur with “two-strut” free vascularized fibular grafts. *J Trauma* 1992;33:840–5.
- [166] Zaretski A, Amir A, Meller I, Leshem D, Kollender Y, Barnea Y, et al. Free fibula long bone reconstruction in orthopedic oncology: a surgical algorithm for reconstructive options. *Plast Reconstr Surg* 2004;113:1989–2000.
- [167] Vail TP, Urbaniak JR. Donor-site morbidity with use of vascularized autogenous fibular grafts. *J Bone Joint Surg Am* 1996;78:204–11.

- [168] Bernd L, Sabo D, Zahlten-Hinguranage A, Niemeyer P, Daecke W, Simank HG. [Experiences with vascular pedicled fibula in reconstruction of osseous defects in primary malignant bone tumors]. *Orthopade* 2003;32:983–93. doi:10.1007/s00132-003-0539-6.
- [169] Ceruso M, Falcone C, Innocenti M, Delcroix L, Capanna R MM. Skeletal reconstruction with a free vascularized fibula graft associated to bone allograft after resection of malignant bone tumor of limbs. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2001;33:277–82.
- [170] Minami A, Kasashima T, Iwasaki N, Kato H, Kaneda K. Vascularised fibular grafts. An experience of 102 patients. *J Bone Joint Surg Br* 2000;82:1022–5.
- [171] Chang DW, Weber KL. Use of a vascularized fibula bone flap and intercalary allograft for diaphyseal reconstruction after resection of primary extremity bone sarcomas. *Plast Reconstr Surg* 2005;116:1918–25.
- [172] Zehr R, Enneking W, Heare T, Liang T. Fractures in large structural allografts. In: KLB B, editor. *Complicat. Limb Salvage. Prev. Manag. Outcome*. 6th Int. Symp. Limb Salvage, Montreal: 1991, p. 3–8.
- [173] Chang DW, Weber KL. Segmental femur reconstruction using an intercalary allograft with an intramedullary vascularized fibula bone flap. *J Reconstr Microsurg* 2004;20:195–9. doi:10.1055/s-2004-823106.
- [174] Li J, Wang Z, Guo Z, Chen G-J, Fu J, Pei G-X. The use of allograft shell with intramedullary vascularized fibula graft for intercalary reconstruction after diaphyseal resection for lower extremity bony malignancy. *J Surg Oncol* 2010;102:368–74. doi:10.1002/jso.21620.
- [175] 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;29:361–72. doi:10.1002/micr.20668.

- [176] Bae DS, Waters PM, Gebhardt MC. Results of free vascularized fibula grafting for allograft nonunion after limb salvage surgery for malignant bone tumors. *J Pediatr Orthop* 2006;26:809–14. doi:10.1097/01.bpo.0000235394.11418.c7.
- [177] 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;118:413–9. doi:10.1097/01.prs.0000227682.71527.2b.
- [178] Krieg AH, Davidson AW, Stalley PD. Intercalary femoral reconstruction with extracorporeal irradiated autogenous bone graft in limb-salvage surgery. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89:366–71. doi:10.1302/0301-620X.89B3.18508.
- [179] Muramatsu K, Ihara K, Hashimoto T, Seto S, Taguchi T. Combined use of free vascularised bone graft and extracorporeally-irradiated autograft for the reconstruction of massive bone defects after resection of malignant tumour. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007;60:1013–8. doi:10.1016/j.bjps.2007.03.025.
- [180] Ogura K, Miyamoto S, Sakuraba M, Fujiwara T, Chuman H, Kawai A. Intercalary reconstruction after wide resection of malignant bone tumors of the lower extremity using a composite graft with a devitalized autograft and a vascularized fibula. *Sarcoma* 2015;2015:861575. doi:10.1155/2015/861575.
- [181] Cavadas PC, Landín L. Treatment of recalcitrant distal tibial nonunion using the descending genicular corticoperiosteal free flap. *J Trauma* 2008;64:144–50. doi:10.1097/01.ta.0000249347.35050.3f.
- [182] Rodriguez-Merchan EC, Forriol F. Nonunion: general principles and experimental data. *Clin Orthop Relat Res* 2004:4–12.

- [183] Finley JM, Acland RD, Wood MB. Revascularized periosteal grafts--a new method to produce functional new bone without bone grafting. *Plast Reconstr Surg* 1978;61:1-6.
- [184] Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone* 2004;35:1003-12. doi:10.1016/j.bone.2004.07.014.
- [185] Camilli JA, Penteado C V. Bone formation by vascularized periosteal and osteoperiosteal grafts. An experimental study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 1994;114:18-24.
- [186] Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus* 2001;10:E1. doi:10.3171/foc.2001.10.4.2.
- [187] Soldado F, Fontecha CG, Barber I, Velez R, Llusà M, Collado D, et al. Vascularized fibular periosteal graft: a new technique to enhance bone union in children. *J Pediatr Orthop* 2012;32:308-13. doi:10.1097/BPO.0b013e31824b2843.
- [188] Poussa M, Ritsilä V. The osteogenic capacity of free periosteal and osteoperiosteal grafts. A comparative study in growing rabbits. *Acta Orthop Scand* 1979;50:491-9.
- [189] Takato T, Harii K, Nakatsuka T. Osteogenic capacity of vascularised periosteum: experimental study using rib periosteum in rabbits. *Br J Plast Surg* 1988;41:528-32.
- [190] Zhang X, Xie C, Lin ASP, Ito H, Awad H, Lieberman JR, et al. Periosteal progenitor cell fate in segmental cortical bone graft transplantations: implications for functional tissue engineering. *J Bone Miner Res* 2005;20:2124-37. doi:10.1359/JBMR.050806.
- [191] Doi K, Hattori Y. Vascularized bone graft from the supracondylar region of the femur. *Microsurgery* 2009;29:379-84. doi:10.1002/micr.20671.

- [192] King KF. Periosteal pedicle grafting in dogs. *J Bone Joint Surg Br* 1976;58:117–21.
- [193] Ritsilä V, Alhopuro S, Rintala A. Bone formation with free periosteum. An experimental study. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1972;6:51–6.
- [194] Uddströmer L, Ritsilä V. Osteogenic capacity of periosteal grafts. A qualitative and quantitative study of membranous and tubular bone periosteum in young rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1978;12:207–14.
- [195] Burstein FD, Canalis RF. Studies on the osteogenic potential of vascularized periosteum: behavior of periosteal flaps transferred onto soft tissues. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1985;93:731–5.
- [196] Burstein FD, Canalis RF, Canalis EM, Ariyan S. Scanning electron microscopy and gel electrophoresis of vascularized periosteal autografts. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:500–10.
- [197] Reynders P, Becker JH, Broos P. Osteogenic ability of free periosteal autografts in tibial fractures with severe soft tissue damage: an experimental study. *J Orthop Trauma* 1999;13:121–8.
- [198] Ortak T, Ozdemir R, Uysal A, Ulusoy MG, Sungur N, Sahin B, et al. Osteogenic capacities of periost grafts, periost flaps and prefabricated periosteal flaps: experimental study. *J Craniofac Surg* 2005;16:594–600.
- [199] Bayramiçli M, Ersoy B, Sirinoğlu H. A new experimental flap design: the saphenous artery periosto-fasciocutaneous flap of the rat. *J Reconstr Microsurg* 2012;28:175–9. doi:10.1055/s-0031-1301068.
- [200] Romana MC, Masquelet AC. Vascularized periosteum associated with cancellous bone graft: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 1990;85:587–92.
- [201] Sakai K, Doi K, Kawai S. Free vascularized thin corticoperiosteal graft. *Plast Reconstr Surg* 1991;87:290–8.

- [202] Doi K, Sakai K. Vascularized periosteal bone graft from the supracondylar region of the femur. *Microsurgery* 1994;15:305–15.
- [203] Muramatsu K, Doi K, Ihara K, Shigetomi M, Kawai S. Recalcitrant posttraumatic nonunion of the humerus: 23 patients reconstructed with vascularized bone graft. *Acta Orthop Scand* 2003;74:95–7. doi:10.1080/00016470310013734.
- [204] Choudry UH, Bakri K, Moran SL, Karacor Z, Shin AY. The vascularized medial femoral condyle periosteal bone flap for the treatment of recalcitrant bony nonunions. *Ann Plast Surg* 2008;60:174–80. doi:10.1097/SAP.0b013e318056d6b5.
- [205] Penteadó C V, Masquelet AC, Romana MC, Chevrel JP. Periosteal flaps: anatomical bases of sites of elevation. *Surg Radiol Anat* 1990;12:3–7.
- [206] Psillakis JM, Grotting JC, Casanova R, Cavalcante D, Vasconez LO. Vascularized outer-table calvarial bone flaps. *Plast Reconstr Surg* 1986;78:309–17.
- [207] Sheetz KK, Bishop AT, Berger RA. The arterial blood supply of the distal radius and ulna and its potential use in vascularized pedicled bone grafts. *J Hand Surg Am* 1995;20:902–14. doi:10.1016/S0363-5023(05)80136-4.
- [208] Pierer G, Steffen J, Hoflehner H. The vascular blood supply of the second metacarpal bone: anatomic basis for a new vascularized bone graft in hand surgery. An anatomical study in cadavers. *Surg Radiol Anat* 1992;14:103–12.
- [209] Terranova W. The use of periosteal flaps in scalp and forehead reconstruction. *Ann Plast Surg* 1990;25:450–6.
- [210] Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE. The effects of age on the response of rabbit periosteal osteoprogenitor cells to exogenous transforming growth factor-beta 2. *J Cell Sci* 1994:499–516.

- [211] Qi B, Yu A, Zhang G, Yu G, Shi Y, Zhu S, et al. The treatment of displaced femoral neck fractures with vascularized great trochanter periosteal flap transposition in children. *Microsurgery* 2008;28:21–4. doi:10.1002/micr.20439.
- [212] Trigui M, de Billy B, Metaizeau J-P, Clavert J-M. Treatment of congenital pseudarthrosis of the fibula by periosteal flap. *J Pediatr Orthop B* 2010;19:473–8. doi:10.1097/BPB.0b013e32833cb749.
- [213] Soldado F, Barrera-Ochoa S, Fontecha CG, Haddad S, Barastegui D, Barber I, 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;33:56–9. doi:10.1002/micr.22045.
- [214] Soldado F, Knörr J, Haddad S, Corona PS, Barrera-Ochoa S, Collado D, et al. Vascularized tibial periosteal graft in complex cases of bone nonunion in children. *Microsurgery* 2015;35:239–43. doi:10.1002/micr.22342.
- [215] Crock JG, Morrison WA. A vascularised periosteal flap: anatomical study. *Br J Plast Surg* 1992 Aug-Sep;45:474–8.
- [216] Satoh T, Tsuchiya M, Harii K. A vascularised iliac musculo-periosteal free flap transfer: a case report. *Br J Plast Surg* 1983;36:109–12.
- [217] d’Hauthuille C, Testelin S, Taha F, Bitar G, Devauchelle B. [Part III: free periosteal flaps as a treatment for mandibular osteoradionecrosis]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 2009;110:3–7. doi:10.1016/j.stomax.2008.07.007.
- [218] Roselli R, Muscatello L, Valdatta L, Pavan G, Spriano G. Mandibular reconstruction with frozen autologous mandibular bone and radial periosteal fasciocutaneous free flap: preliminary report. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;113:956–60.
- [219] Kelley P, Klebuc M, Hollier L. Complex midface reconstruction: maximizing contour and bone graft survival utilizing periosteal free flaps. *J Craniofac Surg* 2003;14:779–82.

- [220] Wang Y, Zhu S, Zhao D. Vascularized iliac periosteal transfer for the treatment of avascular necrosis of the femoral head and a new evaluation grading system. *Chin Med J (Engl)* 1996;109:441–5.
- [221] Innocenti M, Delcroix L, Romano GF. Epiphyseal transplant: harvesting technique of the proximal fibula based on the anterior tibial artery. *Microsurgery* 2005;25:284–92. doi:10.1002/micr.20130.
- [222] El-Gammal TA, El-Sayed A, Kotb MM. Hypertrophy after free vascularized fibular transfer to the lower limb. *Microsurgery* 2002;22:367–70. doi:10.1002/micr.10066.
- [223] Thabet AM, Paley D, Kocaoglu M, Eralp L, Herzenberg JE, Ergin ON. Periosteal grafting for congenital pseudarthrosis of the tibia: a preliminary report. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466:2981–94. doi:10.1007/s11999-008-0556-1.
- [224] O’Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90 Suppl 1:79–84. doi:10.2106/JBJS.G.01585.
- [225] Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (I): Comparative anatomical study on rats’ femur. *Biomed Tech (Berl)* 2005;50:107–10. doi:10.1515/BMT.2005.015.
- [226] Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat’s femur. *Biomed Tech (Berl)* 2005;50:137–42. doi:10.1515/BMT.2005.020.
- [227] Koefoed M, Ito H, Gromov K, Reynolds DG, Awad HA, Rubery PT, et al. Biological effects of rAAV-caAlk2 coating on structural allograft healing. *Mol Ther* 2005;12:212–8. doi:10.1016/j.ymthe.2005.02.026.

- [228] Yasuda H, Yano K, Wakitani S, Matsumoto T, Nakamura H, Takaoka K. Repair of critical long bone defects using frozen bone allografts coated with an rhBMP-2-retaining paste. *J Orthop Sci* 2012;17:299–307. doi:10.1007/s00776-012-0196-x.
- [229] Betz VM, Betz OB, Rosin T, Keller A, Thirion C, Salomon M, et al. The effect of BMP-7 gene activated muscle tissue implants on the repair of large segmental bone defects. *Injury* 2015;46:2351–8. doi:10.1016/j.injury.2015.09.016.
- [230] Poser L, Matthys R, Schawalder P, Pearce S, Alini M, Zeiter S. A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs. *Biomed Res Int* 2014;2014:348635. doi:10.1155/2014/348635.
- [231] Hoffman MD, Benoit DSW. Emerging ideas: Engineering the periosteum: revitalizing allografts by mimicking autograft healing. *Clin Orthop Relat Res* 2013;471:721–6. doi:10.1007/s11999-012-2695-7.
- [232] Amorosa LF, Lee CH, Aydemir AB, Nizami S, Hsu A, Patel NR, et al. Physiologic load-bearing characteristics of autografts, allografts, and polymer-based scaffolds in a critical sized segmental defect of long bone: an experimental study. *Int J Nanomedicine* 2013;8:1637–43. doi:10.2147/IJN.S42855.
- [233] Seo SW, Cho SK, Storer SK, Lee FY. Zoledronate reduces unwanted bone resorption in intercalary bone allografts. *Int Orthop* 2010;34:599–603. doi:10.1007/s00264-009-0748-7.
- [234] Xiao C, Zhou H, Liu G, Zhang P, Fu Y, Gu P, et al. Bone marrow stromal cells with a combined expression of BMP-2 and VEGF-165 enhanced bone regeneration. *Biomed Mater* 2011;6:15013. doi:10.1088/1748-6041/6/1/015013.

- [235] Isobe M, Yamazaki Y, Mori M, Amagasa T. Bone regeneration produced in rat femur defects by polymer capsules containing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Oral Maxillofac Surg* 1999;57:695-8; discussion 699.
- [236] Lee FY, Hazan EJ, Gebhardt MC, Mankin HJ. Experimental model for allograft incorporation and allograft fracture repair. *J Orthop Res* 2000;18:303-6. doi:10.1002/jor.1100180219.
- [237] Gebauer GP, Lin SS, Beam HA, Vieira P, Parsons JR. Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect cellular proliferation. *J Orthop Res* 2002;20:587-92. doi:10.1016/S0736-0266(01)00136-X.
- [238] Gazdag, Lane, Glaser, Forster. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg* 1995;3:1-8.
- [239] Davy DT. Biomechanical issues in bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 1999;30:553-63.
- [240] Tencer A, Johnson K. Biomechanics in Orthopaedic Trauma. Philadelphia PA JB Lippincott 1994;109.
- [241] Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:1032-44.
- [242] Anand N, Hamilton JF, Perri B, Miraliakbar H, Goldstein T. Cantilever TLIF with structural allograft and RhBMP2 for correction and maintenance of segmental sagittal lordosis: long-term clinical, radiographic, and functional outcome. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006;31:E748-53. doi:10.1097/01.brs.0000240211.23617.ae.
- [243] Salkeld SL, Patron LP, Barrack RL, Cook SD. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:803-16.

- [244] Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:1544-52.
- [245] Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am* 1992;74:659-70.
- [246] Bong MR, Capla EL, Egol KA, Sorkin AT, Distefano M, Buckle R, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenic protein-7) combined with various adjuncts in the treatment of humeral diaphyseal nonunions. *Bull Hosp Jt Dis* 2005;63:20-3.
- [247] Taguchi S, Namikawa T, Ieguchi M, Takaoka K. Reconstruction of bone defects using rhBMP-2-coated devitalized bone. *Clin Orthop Relat Res* 2007;461:162-9. doi:10.1097/BLO.0b013e318059ae44.
- [248] Vögelin E, Jones NF, Huang JI, Brekke JH, Lieberman JR. Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:1323-31. doi:10.2106/JBJS.C.00913.
- [249] Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 1995;13:357-67. doi:10.1002/jor.1100130309.
- [250] McClellan JW, Mulconrey DS, Forbes RJ, Fullmer N. Vertebral bone resorption after transforaminal lumbar interbody fusion with bone morphogenetic protein (rhBMP-2). *J Spinal Disord Tech* 2006;19:483-6. doi:10.1097/01.bsd.0000211231.83716.4b.
- [251] Lee FY-I, Storer S, Hazan EJ, Gebhardt MC, Mankin HJ. Repair of bone allograft fracture using bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res* 2002:119-26.

- [252] Epstein NE. Complications due to the use of BMP/INFUSE in spine surgery: The evidence continues to mount. *Surg Neurol Int* 2013;4:S343-52. doi:10.4103/2152-7806.114813.
- [253] Gafni Y, Turgeman G, Liebergal M, Pelled G, Gazit Z, Gazit D. Stem cells as vehicles for orthopedic gene therapy. *Gene Ther* 2004;11:417-26. doi:10.1038/sj.gt.3302197.
- [254] O'Keefe RJ, Tiyyapatanaputi P, Xie C, Li TF, Clark C, Zuscik MJ, et al. COX-2 has a critical role during incorporation of structural bone allografts. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:532-42. doi:10.1196/annals.1346.012.
- [255] Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest* 2002;109:1405-15. doi:10.1172/JCI15681.
- [256] Simon AM, Manigrasso MB, O'Connor JP. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:963-76. doi:10.1359/jbmr.2002.17.6.963.
- [257] Abe Y, Takahata M, Ito M, Irie K, Abumi K, Minami A. Enhancement of graft bone healing by intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) in a rat spinal arthrodesis model. *Bone* 2007;41:775-85. doi:10.1016/j.bone.2007.06.025.
- [258] Andreassen TT, Ejersted C, Oxlund H. Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. *J Bone Miner Res* 1999;14:960-8. doi:10.1359/jbmr.1999.14.6.960.
- [259] Kim HW, Jahng JS. Effect of intermittent administration of parathyroid hormone on fracture healing in ovariectomized rats. *Iowa Orthop J* 1999;19:71-7.

- [260] Hashimoto T, Shigetomi M, Ohno T, Matsunaga T, Muramatsu K, Tanaka H, et al. Sequential treatment with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34) and bisphosphonate enhances large-size skeletal reconstruction by vascularized bone transplantation. *Calcif Tissue Int* 2007;81:232–9. doi:10.1007/s00223-007-9056-7.
- [261] Kakar S, Einhorn TA, Vora S, Miara LJ, Hon G, Wigner NA, et al. Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures. *J Bone Miner Res* 2007;22:1903–12. doi:10.1359/jbmr.070724.
- [262] Huang J, Huang H, Wu M, Li J, Xie H, Zhou H, et al. Connective tissue growth factor induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells through ERK signaling. *Int J Mol Med* 2013;32:423–9. doi:10.3892/ijmm.2013.1398.
- [263] Huang X, Li Y, Xu J, Liu K, Yu X, Cheng X, et al. Restoration of murine femoral segmental defect using CTGF-overexpressing MC3T3-E1 cells. *Am J Transl Res* 2016;8:1530–40.
- [264] Ouyang HW, Cao T, Zou XH, Heng BC, Wang LL, Song XH, et al. Mesenchymal stem cell sheets revitalize nonviable dense grafts: implications for repair of large-bone and tendon defects. *Transplantation* 2006;82:170–4. doi:10.1097/01.tp.0000226232.79106.72.
- [265] Zhou Y, Chen F, Ho ST, Woodruff MA, Lim TM, Hutmacher DW. Combined marrow stromal cell-sheet techniques and high-strength biodegradable composite scaffolds for engineered functional bone grafts. *Biomaterials* 2007;28:814–24. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.09.032.
- [266] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180–92. doi:10.1634/stemcells.19-3-180.
- [267] Guilak F, Awad HA, Fermor B, Leddy HA, Gimple JM. Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biorheology* 2004;41:389–99.

- [268] Hutmacher DW, Sittinger M. Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2003;9 Suppl 1:S45-64. doi:10.1089/10763270360696978.
- [269] Shih Y-R V, Chen C-N, Tsai S-W, Wang YJ, Lee OK. Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers. *Stem Cells* 2006;24:2391-7. doi:10.1634/stemcells.2006-0253.
- [270] Park KE, Kang HK, Lee SJ, Min B-M, Park WH. Biomimetic nanofibrous scaffolds: preparation and characterization of PGA/chitin blend nanofibers. *Biomacromolecules* 2006;7:635-43. doi:10.1021/bm0509265.
- [271] Mizumoto S, Tamai S, Goshima J, Yajima H, Yoshii T, Fukui A, et al. Experimental study of vascularized tibiofibula graft in inbred rats: a preliminary report. *J Reconstr Microsurg* 1986;3:1-11. doi:10.1055/s-2007-1007031.
- [272] Mizumoto, S; Tamai, S; Yajima H. Vascularized ulnar graft in inbred rats. *J Jpn Soc Reconstr Microsurg* 1988;1:6-15.
- [273] Sempuku T, Tamai S, Mizumoto S, Yajima H. Vascularized tail bone grafts in rats. *Plast Reconstr Surg* 1993;91:502-10.
- [274] Chen SG, Xu XZ, Zhang F, Hui K, Lineaweaver WC, Buncke HJ. Free vascularized fibular bone flap in the rat. *Microsurgery* 2000;20:1-5.
- [275] Linsell M, Jablonski P, Howden B, Scott D, Marshall V. The thigh flap: an osteomyocutaneous free-flap model in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1988;81:240-5.
- [276] Dunn RM, Mancoll J. Flap models in the rat: a review and reappraisal. *Plast Reconstr Surg* 1992;90:319-28.
- [277] Mutaf M, Tasaki Y, Arakaki M, Fujii T. A true osteomyocutaneous free-flap model in rats: the saphenous artery osteomyocutaneous flap. *Plast Reconstr Surg* 1995;96:1629-35.

- [278] Ozkan O, Akyürek M, Safak T, Kayıkçıoğlu A, Güler G, Erk Y. A new flap model in rats: iliac osteomusculocutaneous flap. *Ann Plast Surg* 2001;47:161–7.
- [279] Nasir S, Aydın A, Kayıkçıoğlu A, Sökmensüer C, Cobaner A. New experimental composite flap model in rats: gluteus maximus-tensor fascia lata osteomuscle flap. *Microsurgery* 2003;23:582–8. doi:10.1002/micr.10212.
- [280] Chen SG, Zhang F, Komorowska-Timek E, Lineaweaver WC, Buncke HJ. Free microvascular transfer of the acromiotrapezius osteomuscular flap in rats. *Br J Plast Surg* 2000;53:612–5. doi:10.1054/bjps.2000.3414.
- [281] Romana MC, Masquelet AC. Vascularized periosteum associated with cancellous bone graft: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 1990;85:587–92.
- [282] Ersoy B, Bayramiçlı M, Ercan F, Şirinoğlu H, Turan P, Numanoğlu A. Comparison of bone prefabrication with vascularized periosteal flaps, hydroxyapatite, and bioactive glass in rats. *J Reconstr Microsurg* 2015;31:291–9. doi:10.1055/s-0034-1396770.
- [283] Fanua SP, Kim J, Shaw Wilgis EF. Alternative model for teaching microsurgery. *Microsurgery* 2001;21:379–82.
- [284] Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, et al. Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. *Tissue Eng Part C Methods* 2008;14:79–88. doi:10.1089/tec.2007.0234.
- [285] Reynolds DG, Takahata M, Lerner AL, O’Keefe RJ, Schwarz EM, Awad HA. Teriparatide therapy enhances devitalized femoral allograft osseointegration and biomechanics in a murine model. *Bone* 2011;48:562–70. doi:10.1016/j.bone.2010.10.003.

- [286] Takahata M, Schwarz EM, Chen T, O'Keefe RJ, Awad HA. Delayed short-course treatment with teriparatide (PTH(1-34)) improves femoral allograft healing by enhancing intramembranous bone formation at the graft-host junction. *J Bone Miner Res* 2012;27:26–37. doi:10.1002/jbmr.518.
- [287] Franch J, Garcia F, J C, M M. Backscattered electron imaging of the calcified tissues present in bone healing. *VCOT Arch* 1998:51–7.
- [288] Zhang X, Awad HA, O'Keefe RJ, Guldberg RE, Schwarz EM. A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466:1777–87. doi:10.1007/s11999-008-0312-6.
- [289] Tiyyapattanaputi P, Rubery PT, Carmouche J, Schwarz EM, O'keefe RJ, Zhang X. A novel murine segmental femoral graft model. *J Orthop Res* 2004;22:1254–60. doi:10.1016/j.orthres.2004.03.017.
- [290] Schilling T, Mueller M, Minne HW, Ziegler R. Mineral apposition rate in rat cortical bone: Physiologic differences in different sites of the same tibia. *J Bone Miner Res* 1992;7:S429–32. doi:10.1002/jbmr.5650071412.
- [291] Fu D, Jiang Q, He F, Yang G, Liu L. Fluorescence microscopic analysis of bone osseointegration of strontium-substituted hydroxyapatite implants. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012;13:364–71. doi:10.1631/jzus.B1100381.
- [292] Rutten S, Nolte PA, Korstjens CM, van Duin MA, Klein-Nulend J. Low-intensity pulsed ultrasound increases bone volume, osteoid thickness and mineral apposition rate in the area of fracture healing in patients with a delayed union of the osteotomized fibula. *Bone* 2008;43:348–54. doi:10.1016/j.bone.2008.04.010.
- [293] Marks S, Odgren P. Structure and development of the skeleton. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, editors. *Princ. bone Biol.* 2nd ed., San Diego: Academic Press; 2002, p. 3–16.

- [294] Harris JS, Bemenderfer TB, Wessel AR, Kacena MA. A review of mouse critical size defect models in weight bearing bones. *Bone* 2013;55:241–7. doi:10.1016/j.bone.2013.02.002.
- [295] Deijkers RLM, Bloem RM, Kroon HM, Van Lent JB, Brand R, Taminiau AHM. Epidiaphyseal versus other intercalary allografts for tumors of the lower limb. *Clin Orthop Relat Res* 2005;439:151–60.