

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARES

Facultat de Ciències

Departamento de

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION EN
CIENCIAS DE LA SALUD (UNICS)

Doctorado de Ciencias Biosociosanitarias



Universitat de les Illes Balears

**Estudio del crecimiento por rebote tras
hemiepifisiodesis**

TESIS DOCTORAL

Laura Corominas Francés

Palma de Mallorca, 2014



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARES

Facultat de Ciències

Departamento de

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION EN
CIENCIAS DE LA SALUD (UNICS)**

Doctorado de Ciencias Bisociosanitarias



**Universitat de les
Illes Balears**

**Estudio del crecimiento por rebote tras
hemiepifisiodesis**

Memoria que para optar al grado de

Doctor en Medicina,

presenta la Licenciada

LAURA COROMINAS FRANCES

Palma de Mallorca, Mayo 2014

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARES

Línea de Investigación: Biomedicina molecular y celular.

D. Ignacio Sanpera Trigueros, jefe de Servicio de Ortopedia y Traumatología Infantil, doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Barcelona y D. Antonio Aguiló Pons, Vicerrector de Campus, profesor Titular del Departamento de Enfermería y Fisioterapia de la Universitat de les Illes Balears.

CERTIFICAN:


Que la presente memoria, cuyo título es:

"Estudio del crecimiento por rebote tras hemiepifisiodesis"

Constituye la Tesis Doctoral de *Laura Corominas Francés*.

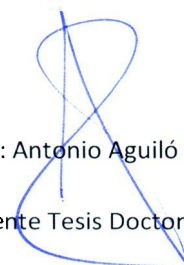
Así mismo certifican haber dirigido y supervisado tanto los diferentes aspectos del trabajo de investigación como la redacción de la presente memoria.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente en Palma de Mallorca, en Mayo de 2014.



Fdo.: Ignacio Sanpera Trigueros

Director Tesis Doctoral



Fdo.: Antonio Aguiló Pons

Ponente Tesis Doctoral

"Caminando en línea recta uno no puede llegar muy lejos".

El Principito. Antonie de Saint- Exupéry.

Esta tesis doctoral está dedicada íntegramente a las tres personas más importantes de mi vida. Tres personas que me han enseñado, de las que he aprendido y aprendo a diario, y que siempre me han apoyado. Tres personas que ocupan los primeros puestos en mi corazón. A las que echo de menos, si no están y con las que cuento al 100%, antes de que "algo" suceda.

En primer lugar, mi querido y añorado Papa Juan, todos los días le echo de menos, no hay día, que no me acuerde de él. Fue y es un ejemplo en mi vida. Dios, quiso que nos separásemos mucho antes de lo que una niña quisiera separarse de su papa, pero sé que desde el cielo, siempre ha guiado mis pasos, e intento vivir con los valores que me ha inculcado.

En segundo lugar, mi madre. La persona que me dio la vida, que siempre ha apoyado mis decisiones, no sin antes aportar un sabio consejo. La persona que ha enderezado mi camino, cual árbol torcido en el libro de Andry. De ella, he aprendido, a superar las adversidades plantándoles la mejor de la sonrisa. Un modelo de constancia en el trabajo y en la vida, una actitud ejemplar ante la enfermedad. Siempre la he visto trabajar, estudiar, y esforzarse por conseguir sus metas, por superar sus logros. Su lema: "la prudencia y la calma deben imperar en todas nuestras decisiones", siempre está presente en mis actos.

Y en tercer lugar, Giorgio, mi amigo, mi compañero de meriendas, mi amor, mi mayor fan y mi mayor crítico. Gracias por estar a mi lado en las situaciones difíciles, por soportar todos mis momentos de desesperación. Por ser el hombro donde descansar, por aportar a mi vida optimismo, amor, alegría, tranquilidad, serenidad y sobre todo por haberme ayudado a sortear las piedras del camino, enseñándome que siempre hay luz al final del túnel. Y como no, gracias por quererme tanto...

Me faltan palabras para expresaros lo mucho que os quiero.

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento al Instituto de Salud Carlos III, por la concesión de la Beca Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), y a la Fundación Mapfre que me han hecho posible llevar a cabo la presente Tesis Doctoral.

De un modo muy especial expresar mi agradecimiento a mi director de Tesis, el Dr. Ignacio Sanpera Trigueros por su continua disponibilidad, por las enseñanzas recibidas y por la enorme paciencia que ha demostrado tener durante todos estos años, para atender cualquier duda surgida, desde los primeros momentos en mi andadura en el mundo de la cirugía experimental hasta la realización de esta memoria. También por la confianza depositada en mí, por enseñarme cada día y por ayudarme en la práctica clínica diaria.

También quiero expresar mi más profundo agradecimiento, al Dr. Carlos Saus, anatómico-patólogo del Hospital Son Espases, un excelente profesional y una gran persona. Gracias por su inestimable ayuda e infinita paciencia con la Histología. Así como al Dr. Guillem Frontera, del departamento de Investigación y Estadística del Hospital Son Espases, por la gran ayuda prestada al proyecto con la estadística, y por estar siempre disponible para mis múltiples dudas y preguntas, y sobre todo gracias por las risas, y por escucharme cuando lo veía todo "negro".

Igualmente expresar mi agradecimiento a las Dras. Silvia Tejada y Yolanda Gómez, por haberme brindado su ayuda y apoyo en el quirófano de experimentación animal. A Silvia por su sonrisa permanente, en aquellos momentos de estrés en quirófano, y por poner banda sonora a las mañanas de los martes. A Yolanda, por el gran trabajo que realizó con la inmuno-histoquímica, y con logística de los conejos. Quiero destacar los buenos momentos vividos en los descansos de la cirugías, en la cafetería del Hospital.+

Brindar una especial mención de agradecimiento, a todo el equipo de técnicos de radiología del Hospital, especialmente a Eulogio y a Guillem, que siempre atendieron todas mis preguntas, acerca del manejo de la reveladora, y acudieron a socorrernos cuando teníamos problemas para grabar las imágenes.

Agradecer de forma muy especial a mis compañeros de trabajo en el Servicio de Ortopedia y Traumatología Infantil del Hospital Son Espases, los Dres. Francisco Izquierdo, Amparo de Juan y Rosa Rossinyol, mención especial al Dr. David Raluy, por la ayuda prestada durante las primeras cirugías y al Dr. Gabriel Piza, por la ayuda en las

correcciones de esta Tesis. Gracias a todos, por escucharme, enseñarme y ayudarme siempre, durante todos estos años que llevo en el Servicio.

También deseo mencionar a otras personas que a lo largo de mi vida académica he tenido la oportunidad de conocer, y que han marcado mis pasos profesionales, al Dr. Javier Albiñana, por ayudarme a cumplir un sueño. Al Dr. José Carlos López-Fanjul, mi adjunto favorito durante la residencia en el Hospital Universitario Central de Asturias, un excelente cirujano, que posteriormente hemos cultivado una gran amistad, por los valiosos consejos recibidos de él, tanto en el ámbito profesional, como en lo personal. Al Dr. José Antonio Morcuende, gran cirujano ortopédico del "University of Iowa Hospitals and Clinics", mi mentor y un gran amigo. Me faltan palabras para expresar lo mucho que agradezco todo el cariño que él y Ulpi siempre me han brindado.

Especial mención de agradecimiento a mis grandes amigos, Mari Luan y Enrique, por la preocupación que siempre han tenido en mi andadura profesional, y el apoyo brindado en mis momentos de crisis durante la realización de esta Tesis.

Muchas gracias a toda mi familia, en especial, a Margarita, y Álvaro, por ser un apoyo importante en mi vida, por siempre estar ahí, y por quererme tanto. A Juan Ignacio, por haber supervisado mi educación y seguir muy de cerca mis pasos y a Carlos, por ese primer "Nelson, Tratado de Pediatría", y sobre todo por animarme a estudiar Medicina.

Agradecer a todas mis amigas, especialmente a Aitana, Coqui, Lucía, Techí, mis amigas del alma, por la carga de energía positiva que me dan siempre. A Jasna, Elsa, Ana y Aina, gracias por el interés mostrado por mi trabajo, los ánimos recibidos en todo momento. Y lo más importante, por su amistad.

Y por último agradecer a mi profesora de dibujo, Mónica, los consejos en la realización de la contra-portada de la Tesis.

A Papa Juan, y a Mamá.

"Enseñarás a volar, pero no volarán tu vuelo. Enseñarás a soñar, pero no soñarán tu sueño. Enseñarás a vivir, pero no vivirán tu vida. Sin embargo... en cada vuelo, en cada vida, en cada sueño, perdurará siempre la huella del camino enseñado".

Teresa de Calcuta.

A Giorgio.

"Wo ai ni, ai zhe ni, jiu xiang lao shu ai da mi"

A mi familia y amigos.

"Si caminas solo, irás más rápido. Si caminas acompañado, llegarás más lejos"

Proverbio chino.

A todo el Servicio de Traumatología y Ortopedia Infantil
del Hospital Son Espases.

"Cuando bebas, recuerda la fuente".

Proverbio chino.

Índice

INDICE

Capítulo primero.

INTRODUCCIÓN	1
1. LA PLACA DE CRECIMIENTO.....	3
1.1. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL TEJIDO ÓSEO.....	3
1.2. LA PLACA DE CRECIMIENTO.....	7
1.2.1. ESTRUCTURA DE LA PLACA DE CRECIMIENTO.....	8
1.2.2. COMPONENTES CARTILAGINOSOS DE LA PLACA DE CRECIMIENTO.....	9
1.2.3. APORTE VASCULAR DE LA PLACA DE CRECIMIENTO.....	14
1.3. CONTROL SISTÉMICO DEL CRECIMIENTO ÓSEO.....	16
1.3.1. FACTORES DE CRECIMIENTO FISARIOS.....	19
1.4. TASA DE CRECIMIENTO DE LA PLACA FISARIA.....	20
1.4.1. TECNICA DE 5´ Bromo-2-desoxiuridina (BrdU).....	22
1.5. CIERRE FISARIO.....	22
2. BIOMECÁNICA DE LA PLACA DE CRECIMIENTO.....	24
2.1. GENERALIDADES.....	24
2.2. EFECTOS MECÁNICOS SOBRE EL CARTILAGO DE CRECIMIENTO.....	27
2.2.1. EFECTOS DE LA COMPRESION	29
2.2.2. EFECTOS DE LA DISTRACCIÓN	30
2.3. MOLDEADO OSEO.....	31
2.4. LA VISCOELASTICIDAD DE LA PLACA DE CRECIMIENTO.....	33
3. LA ORTOPEDIA :EL ARTE DE CORREGIR Y PREVENIR LAS DEFORMIDADES EN EL ESQUELETO DE LOS NIÑOS.....	36
4. TÉCNICAS DE EPIFISIODESIS.....	40
4.1. GENERALIDADES: HISTORIA DE LA EPIFISIODESIS.....	39
4.2. LA PLACA DE CRECIMIENTO Y EFECTO REBOTE.....	44
5. CONEJO BLANCO NUEVA ZELANDA.....	48

5.1. GENERALIDADES: ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	48
5.2. BIENESTAR ANIMAL.....	49
5.3. A EXTREMIDAD POSTERIOR DEL CONEJO.....	50

Capítulo segundo.

OBJETIVO E HIPÓTESIS Y COMITÉ DE ÉTICA.....	57
6. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	59
6.1. OBJETIVO.....	59
6.2. HIPOTESIS.....	59
6.3. EL PORQUÉ DEL PROYECTO.....	59
6.4. COMITÉ DE ETICA.....	60

Capítulo tercero.

DISEÑO EXPERIMENTAL. MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
7. DISEÑO EXPERIMENTAL (MATERIAL Y MÉTODOS).....	65
7.1. INTRODUCCION AL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	65
7.2. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.	68
7.2.1. CONEJO BLANCO NUEVA ZELANDA.....	68
7.2.2. EL PORQUÉ DE ESTE MODELO EXPERIMENTAL.....	70
7.3. MEDICACION UTILIZADA.....	72
7.3.1. ANESTESIA.....	72
7.3.2. ANTIBIOTICO.....	73
7.3.3. ANALGESIA.....	73
7.3.4. PENTOBARBITAL SÓDICO.....	74
7.3.5. TINCIONES.....	74
7.3.5.1 5´-Bromo -2´ deoxirudine (BrdU).....	74
7.3.5.2. OXITETRACICLINA.....	75
7.3.5.3. HEMATOXILINA EOSINA.....	76
7.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	76
7.4.1. PREPARACIÓN QUIRÚRGICA.....	76
7.4.2. TÉCNICA QUIRÚRGICA.....	76

7.4.2.1. PRIMERA CIRUGÍA. COLOCACIÓN MATERIAL DE HEMIEPIFISIODESIS.....	77
7.4.2.2. SEGUNDA CIRUGÍA . EXTRACCIÓN DEL MATERIAL DE HEMIEPIFISIODESIS.....	80
7.4.2.3. CUIDADOS DURANTE LA CIRUGIA Bienestar animal.....	81
7.4.2.4. EUTANASIA.....	81
7.5. TÉCNICA RADIOLÓGICA.....	84
7.6. ESTUDIO HISTOLOGICO.....	88
7.7. VARIABLES ESTUDIADAS.....	92
7.7.1. VARIABLES CLINICAS.....	92
7.7.2. VARIABLES RADIOLOGICAS.....	93
7.7.3. VARIABLES HISTOLOGICAS.....	96
7.8. METODO ESTADISTICO.....	96

Capítulo cuarto.

RESULTADOS DEL ESTUDIO.....	99
8. RESULTADOS.....	101
8.1. CONSIDERACIONES GENERALES.....	102
8.2. RESULTADOS CLINICOS.....	103
8.2.1. PESO, HERIDA, BIENESTAR GENERAL (actitud conejo, pelaje)...	103
8.2.2. LONGITUD DE LA TIBIA.....	107
8.3. RESULTADOS RADIOLOGICOS.....	110
8.3.1. ALDA: ángulo línea articular-diáfisis.....	110
8.3.2. CRECIMIENTO POR REBOTE.....	119
8.4. RESULTADOS HISTOLOGICOS.....	124
8.4.1. GROSOR DE LA PLACA.....	124
8.4.2. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LA PLACA DE CRECIMIENTO.....	128
8.4.3. 5´Bromo 2´deoxiuridina (BrdU).....	147

Capítulo quinto.

DISCUSION Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	157
9. LA FISIS Y LA HEMIEPIFISIODESIS.....	159
9.1. FISIS SOMETIDA A COMPRESIÓN.....	159
10. LA IMPORTANCIA DEL EFECTO REBOTE.....	167
10.1. EL CONCEPTO DE REBOTE. IMPLICACIÓN CLÍNICA.....	165
10.2. EL EFECTO REBOTE EN NUESTRO ESTUDIO.....	168
11. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	172

Capítulo sexto.

CONCLUSIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	175
12. CONCLUSIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	177
12.1. CONCLUSIONES.....	177
12.2. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	178
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	180

Capítulo primero

INTRODUCCION

1. LA PLACA DE CRECIMIENTO

1.1. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL TEJIDO OSEO

El tejido óseo se forma a partir de un tejido conectivo laxo que contiene células estrelladas pluri-potenciales conocido como mesénquima. Su origen puede ser del mesodermo paraxial, de la hoja somática del mesodermo lateral o bien del ectomesénquima proveniente de las células de la cresta neural.

La formación inicial del hueso implica la condensación del mesénquima, y la participación de matriz extracelular rica en ácido hialurónico y proteoglicanos como el condroitín sulfato.

El esqueleto es uno de los sistemas más dinámicos del organismo y presenta fenómenos de crecimiento, moldeado, remodelación y reparación¹.

Existen dos tipos de osificación endocondral y membranosa. La *“osificación endocondral”* es uno de los procesos en el desarrollo del sistema esquelético en los fetos, y que concluye con la producción del tejido óseo a partir del tejido cartilaginoso.

Los huesos, durante el desarrollo embrionario, son un molde de cartílago hialino que va siendo progresivamente reemplazado por tejido óseo. El término "endocondral" significa que el proceso se realiza desde el interior hacia el exterior. El proceso inverso, en el que la osificación se produce desde el exterior del cartílago (pericondrio) se denomina pericondral. La osificación endocondral también es esencial en la formación y crecimiento longitudinal de huesos largos, concretamente el esqueleto apendicular, axial y la mandíbula.

Existe otro proceso del desarrollo de los huesos distinto, que no implica cartílago y se denomina *“osificación intramembranosa”*. En ella no hay tejido calcificado, y la osificación se produce a partir de una membrana, que forma hueso (periostio). El periostio no sólo genera hueso sino que también lo reabsorbe, permitiendo la remodelación¹.

❖ OSIFICACION ENDOCONDRALE.

-Proceso de osificación endocondral.

El desarrollo del sistema esquelético comienza con la osificación endocondral y finaliza con la producción del tejido óseo a partir del tejido cartilaginoso. El hueso durante el desarrollo embrionario, es un molde de tejido cartilaginoso hialino, que tiene una forma similar a la que tendrá el hueso final, y que está recubierta de pericondrio, una capa de tejido conectivo denso que envuelve el cartílago excepto en la superficie de las articulaciones. De ahí que el proceso también se denomine osificación cartilaginosa. El cartílago se forma in situ a partir de la quinta semana de gestación por condensación del mesénquima local, el cual se condensa para formar centros de condricación a partir del cual se diferenciarán condroblastos. Existen tres tipos de cartílago a saber: el cartílago hialino es el más abundante, fibrocartílago y cartílago elástico¹.

✓ *Desarrollo de la diáfisis ósea*

En la segunda fase se produce invasión capilares sanguíneos y células osteogénicas, que dan origen a la médula ósea roja que se extienden por el espacio previamente ocupado por los condrocitos. Los condrocitos, son un tipo de célula que se encuentra en el cartílago, son el único componente celular de este tejido, y se encargan de mantener la matriz cartilaginosa, a través de la producción de sus principales compuestos: colágeno y proteoglicanos. Los condrocitos conforman sólo el 5% del tejido cartilaginoso, pero son esenciales para el mantenimiento de la matriz extracelular que comprende el 95% del tejido cartilaginoso.

En este momento, las células progenitoras se diferencian a osteoblastos que darán origen a los osteocitos mediante un proceso de osificación directa o membranosa. Los osteoblastos son las células encargadas de secretar matriz ósea sobre los tabiques del cartílago calcificado previamente.

Así las primeras trabéculas óseas tienen un eje central de cartílago recubierto por hueso. Con el paso del tiempo, se produce una migración de células hacia los extremos. Esto da lugar al llamado Cartílago de crecimiento¹.

✓ *Desarrollo de la epífisis ósea*

En un paso ulterior aparecen los centros de osificación secundarios en el cartílago que constituirán las futuras epífisis. El desarrollo de estos centros secundarios, denominados placas de crecimiento o epifisario, tiene lugar del interior hacia el exterior. Se produce en la época perinatal, en la que las diáfisis de los huesos largos principales ya están formadas, estableciendo el tejido óseo compacto, mientras que en las epífisis se formará el tejido óseo esponjoso¹.

-Proceso de osificación pericondrial

Durante el proceso de "osificación pericondrial", las células del pericondrio se vuelven osteógenas transformándose éste en periostio (capa de células que recubrirá externamente todo el hueso), y se deposita una capa de hueso subperióstico. Así se formará un anillo alrededor de la zona central del molde cartilaginosa, el llamado "anillo de osificación"¹.

El anillo pericondrial rodea externamente a la placa de crecimiento, ocupando las zonas de transición entre los cartílagos epifisarios y centro primario de osificación. Se compone de tres regiones.

- i. Región ósea: el hueso membranoso forma un cilindro alrededor de la placa de crecimiento. Adosado externamente hay una capa de osteoblastos que generan el hueso. El cilindro óseo no mantiene continuidad con el hueso cortical de la diáfisis porque se encuentran los osteoclastos que lo reabsorben.
- ii. Región celular: existe en esta región gran densidad de células que en la zona media parecen diferenciadas, mientras que en la zona más próxima a la diáfisis son semejantes a los osteoclastos.
- iii. Región fibrosa: posee haces paralelos de fibras colágenas, en donde se disponen los fibroblastos de manera ordenada. Se continúa con el revestimiento fibroso de la diáfisis y de la epífisis. Tiene dos funciones principales. La primera de ellas es mecánica, haciendo de soporte lateral de la placa de crecimiento por la formación de la barra ósea. Siendo la segunda

función, ayudar al crecimiento de la placa y de la metáfisis por transformación de las células mesenquimatosas en condroblastos y osteoblastos¹.

❖ OSIFICACION INTRAMEMBRANOSA.

Es uno de los dos procesos esenciales durante el desarrollo fetal del esqueleto de mamíferos para formar tejido óseo, y en particular huesos planos. La osificación intramembranosa conlleva menos pasos¹. El proceso es el siguiente:

1. Las células mesenquimatosas de las membranas de tejido conectivo fibroso se condensan (agrupan) en el sitio donde se desarrollará el hueso y allí se diferenciarán, primero en células osteógenas y luego en osteoblastos. El lugar donde se lleva a cabo tal condensación se llama centro de osificación. Los osteoblastos secretan la matriz orgánica del hueso hasta quedar completamente envueltos por ésta.
2. Luego se interrumpe la secreción de la matriz y los osteoblastos se convierten en osteocitos, que se localizan en las lagunas y extienden sus delgadas prolongaciones citoplasmáticas por canalículos que se irradian en todas direcciones. Posteriormente, se depositan sales de calcio y otros minerales; la matriz se endurece o calcifica, es decir, la calcificación es tan sólo una parte del proceso de osificación.
3. La matriz ósea se transforma en trabéculas, que se fusionan para crear el hueso esponjoso. En los espacios que hay entre éstas y el mesénquima crecen vasos sanguíneos, a lo largo de la superficie del hueso recién formado. El tejido conectivo relacionado con los vasos sanguíneos trabeculares se diferencia en médula ósea roja.
4. En el exterior del hueso, el mesénquima se condensa y transforma en periostio. Con el tiempo, las capas superficiales esponjosas se convierten en hueso compacto, pero se conserva el tejido esponjoso en el centro. Gran parte del

hueso recién formado se remodela, proceso que los transforma lentamente hasta que adquiere su forma y tamaño adulto¹.

1.2. LA PLACA DE CRECIMIENTO

La placa de crecimiento, también llamada fisis, o cartílago de crecimiento, es una estructura con forma de disco que se halla intercalada entre la epífisis y la diáfisis. Las dos grandes placas de crecimiento en un hueso largo, son extensiones periféricas del centro primario que surge de la porción media del esbozo cartilaginoso del hueso largo durante de vida fetal.

En la placa de crecimiento, tiene lugar un proceso secuencial de proliferación celular: síntesis de matriz extracelular, hipertrofia celular, mineralización de la matriz, invasión vascular y eventualmente, apoptosis, donde el cartílago es reemplazado continuamente por hueso, aumentando así la longitud del mismo. Y simultáneamente, hay un crecimiento radial por la aposición directa de hueso por los osteoblastos en la superficie perióstica y reabsorción de osteoclastos en la superficie endóstica¹.

Cuando el esqueleto se acerca a su madurez disminuye el crecimiento longitudinal y la proliferación de los condrocitos. Así durante la adolescencia se produce una epifisiodesis fisiológica que cierra el cartílago de crecimiento. Se forman pequeños puentes óseos entre el centro de osificación epifisario y la metáfisis, que al disminuir las células y progresar la invasión vascular metafisaria, la fisis desaparece.

Al terminar el crecimiento de un hueso no sería necesaria la desaparición del cartílago de crecimiento, bastaría con que éste estuviese inactivo, como ocurre en los peces, pero sería un punto de menor resistencia mecánica. Para evitar las sollicitaciones a cizallamiento, los cartílagos de crecimiento presentan una estructura ondulada, que en ciertos puntos puede presentar una inclinación de unos 60° en relación con el eje diafisario, que aportan mayor resistencia.(Fig. 1.1)

Cada epífisis tiene su propio patrón de cierre que comienza antes en el sexo femenino que en el masculino, por efecto de los estrógenos, aceleran la sustitución de cartílago por tejido óseo. Los estrógenos promueven el envejecimiento programado de los

condrocitos del cartílago de crecimiento más que acelerar la invasión vascular o la osificación².

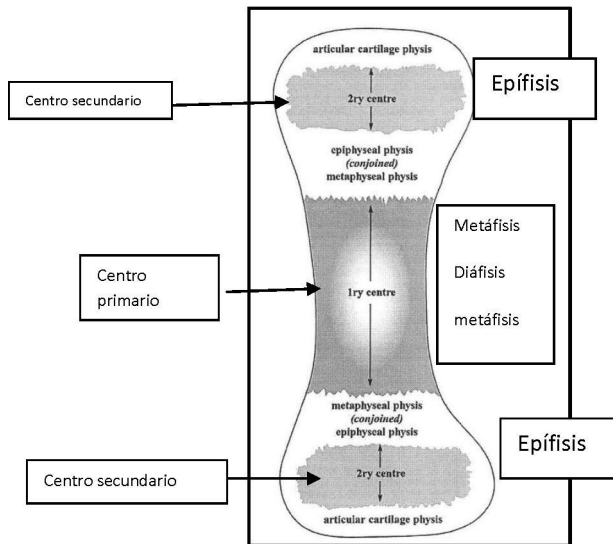


Fig. 1.1. El Hueso: Esquema de las áreas específicas del hueso en crecimiento

1.2.1. ESTRUCTURA DE LA PLACA DE CRECIMIENTO

La placa de crecimiento se divide anatómicamente, en tres componentes diferentes: el componente cartilaginoso, dividido a su vez, en varias capas histológicas, el componente óseo o metáfisis, y el componente fibroso, que rodea la periferia de la placa, dividido en nódulos de Ranvier y anillo pericondrial de LaCroix¹.

La unidad funcional fisaria es una columna de condrocitos que atraviesa por diferentes etapas desde la proliferación, pasando por la hipertrofia hasta llegar a la apoptosis, que es la muerte programada de la célula, con los consiguientes cambios en el metabolismo celular y regulado por diferentes hormonas y factores de crecimiento.

Microscópicamente, en la placa de crecimiento se distinguen cuatro capas: 1) La zona de reserva o germinativa cuya función es almacenar nutrientes y acumular células madre, 2) la zona proliferativa o en pila de monedas también llamada columnar,

proporciona células para la división, donde están los condrocitos orientados en columnas, 3) la zona hipertrófica y 4) la zona metafisaria.

Funcionalmente, se consideran: 1) la zona germinativa, 2) la zona proliferativa con dos capas bien delimitadas, la superior y la inferior, 3) la zona hipertrófica que en sus cuatro quintas partes superiores constituye la matriz no mineralizada y la parte inferior restante la matriz mineralizada, y 4) la metafisis. Estas dos últimas, la zona hipertrófica y la metafisis constituyen la zona de calificación provisional. A este nivel ocurre la mineralización de la matriz intercelular, posteriormente serán reemplazadas por osteoclastos y hueso^{2,3}.

Robertson⁴ distingue en la zona hipertrófica tres partes: una zona de maduración, otra de degeneración, y la última de calificación provisional.

Por su parte Quacci *et al*⁵ considera en el cartílago de crecimiento seis capas (reserva, proliferativa, de maduración, hipertrófica, degenerativa, y de calcificación). En las tres capas cercanas a la epífisis se encargarían de la proliferación de células cartilaginosas, mientras que las tres más próximas a la metafisis están destinadas a la mineralización de la matriz peri-celular⁶.

El crecimiento en longitud de los huesos largos, se debe básicamente a 5 factores, a la proliferación de los condrocitos de la fisis, a la dirección del crecimiento y a la síntesis de matriz que eventualmente se calcifica⁶, además del grosor de la zona de crecimiento y del tamaño de las células cartilaginosas hipertrofiadas⁷.

La proliferación y la hipertrofia son necesarias para conseguir el crecimiento longitudinal de un hueso. La proliferación inicia el crecimiento longitudinal, mientras que la hipertrofia contribuye al crecimiento óseo, con el aumento en el diámetro de las células. Durante la diferenciación, los condrocitos aumentan su volumen intracelular, entre 5 y 10 veces, como señal de una gran actividad de los orgánulos intracelulares⁸.

1.2.2. COMPONENTES CARTILAGINOSOS DE LA PLACA DE CRECIMIENTO

La porción cartilaginosa de la placa de crecimiento está formada, desde la parte superior por la zona de reserva y termina en el septum transversal en la parte distal de las células columnares de la zona hipertrófica. Brighton¹ divide la zona hipertrófica en

tres subzonas, zona de maduración, zona de degeneración y zona de calificación provisional. (Fig.1.2)

La zona de reserva comienza justo debajo del centro secundario de la epífisis. Es seguida de la zona proliferativa, y de la zona hipertrófica.

✓ Zona de Reserva

La zona de reserva descansa adyacente al centro secundario de la epífisis. También ha sido llamada zona germinativa. En ella aparece acumulo de lípidos, y almacén de otros materiales, que posiblemente tenga la función de servir como nutrientes.

Los condrocitos, en esta zona, tienen un contorno esférico, pueden estar en solitario o en formando agrupaciones de pares. Son relativamente poco numerosos si las comparamos con las células de otras zonas. Estas células, están separadas unas de otras, por más matriz extracelular, que la que se puede hallar en cualquier otra de las zonas de la placa de crecimiento¹.

Su citoplasma, exhibe reacción positiva para el glucógeno. En la microscopia electrónica, se puede observar gran cantidad de retículo, una clara indicación de la existencia de una síntesis activa de proteínas. Contiene, gran cantidad de cuerpos lipídicos y vacuolas si la comparamos con las otras zonas, pero menor cantidad de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, y malicodeshidrogenasa así como fosfoglucoisomerasa. En esta zona, la cantidad de alcalino y ácido fosfatasa, así como de fosfato total e inorgánico, calcio, cloro, potasio y magnesio está claramente disminuida.

La matriz en esta zona de reserva, contiene menos lípidos, glicosaminoglucano, proteína polisacárida, que las matrices de otras zonas. La orientación y la distribución al azar de las fibras de colágeno, es característico de la matriz de la zona de reserva. La matriz presenta reacción histoquímica positiva a la presencia de polisacáridos neutrales o proteoglicanos.

Los condrocitos en la zona de reserva, no proliferan, o solo esporádicamente. Esta zona, es por tanto, una capa germinal, que contiene las llamadas "células madre". En realidad, la función de esta capa germinativa o reserva no está muy clara. Como comentamos, posee un almacén importante de lípidos y vacuolas, que son el depósito para futuro requerimiento nutricional de las células.

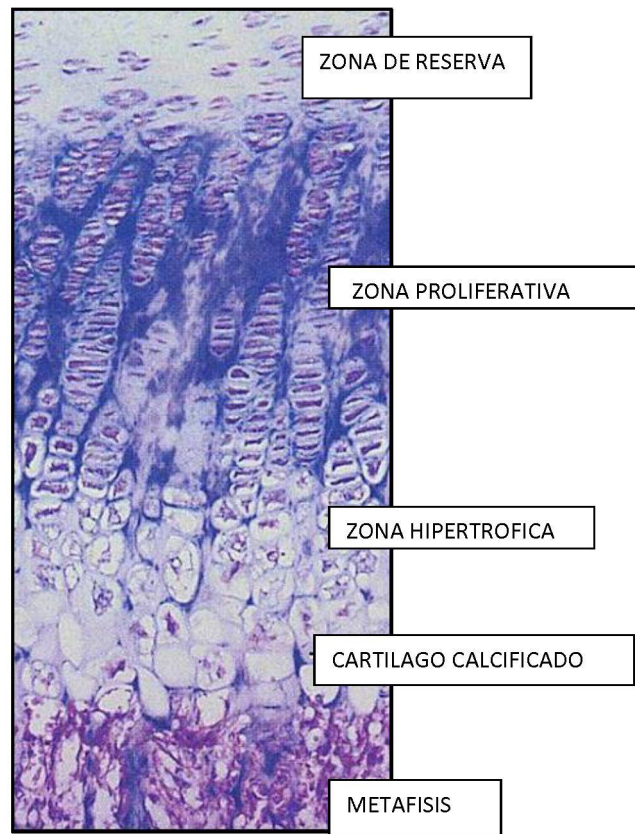


Fig.1.2. Placa de Crecimiento I: Diferentes capas de la placa de crecimiento.

✓ Zona proliferativa

Las células condrocitos, esféricas y solitarias o que formaban agrupaciones de dos, de la zona de reserva, se convierten en esta zona en condrocitos aplanados, que están alineados en columnas, con el eje mayor de la célula perpendicular al eje mayor del hueso. El citoplasma es positivo al glucógeno.

En la microscopía electrónica, se muestran los condrocitos, embalados en el retículo endoplasmático. Esta zona, contiene gran cantidad de hexosamina, pirofosfato inorgánico, sodio, cloro, potasio.

Los estudios con tiamina tritriada, muestran que los condrocitos en esta zona, con pocas excepciones, son las únicas células en la porción cartilaginosa de la placa de crecimiento que pueden dividirse. La célula situada en la parte superior de cada

columna es la verdadera, "célula madre cartilaginosa", para cada columna. La parte superior de la zona proliferativa, es la verdadera "capa germinativa de la placa de crecimiento".

El crecimiento de longitudinal de la placa de crecimiento, es igual a la tasa de producción de nuevos condrocitos en la porción superior de la capa proliferativa multiplicada por el tamaño máximo de condrocitos a la porción distal de la zona hipertrófica.

La matriz de esta zona contiene fibras de colágeno, distribuidas al azar, y vesículas de matriz confinadas a septos longitudinales. La matriz muestra una reacción histoquímica positiva a mucopolisacáridos neutros y agregados de proteoglicanos¹.

La función de esta capa, es doble: 1) la producción de matriz, 2) la proliferación celular. La combinación de estas dos funciones da lugar al crecimiento longitudinal o lineal. Siendo esto algo paradójico, porque aunque los condrocitos son los responsables del crecimiento lineal de los huesos largos, la porción cartilaginosa de la placa, por sí misma, no aumenta de longitud. Esto es debido, a la invasión vascular que ocurre desde la metafisis, con el resultado de la eliminación de los condrocitos en la parte final de la zona hipertrófica, con lo que se equilibra la tasa de producción de cartílago¹.

✓ Zona Hipertrófica

En esta fase, los condrocitos aplanados de la capa proliferativa, se convierten en esféricos, aumentados de tamaño en la zona hipertrófica. Estos cambios en la morfología de las células son bastante bruscos, y en la frontera entre la capa proliferativa y la zona hipertrófica, se puede diferenciar perfectamente cada uno de los dos tipos celulares. Ya que las células aumentan su tamaño hasta 5 veces respecto al tamaño en la capa proliferativa. El citoplasma de los condrocitos en la porción superior de la zona hipertrófica es positivo al glucógeno (reacción del Ácido Peryódico Schiff junto con la digestión de la diastasa), pero en la zona media de esta capa, el citoplasma, pierde la tinción del glucógeno¹.

La última célula en la base de cada columna, es inviable, y muestra excesiva fragmentación de la membrana celular, exceptuando alguna mitocondria y remanentes dispersos de retículo endoplasmático. El destino final de los condrocitos hipertróficos es la muerte.

Las funciones de la zona hipertrófica son dos: 1) preparar la matriz para la calcificación, y 2) calcificar la matriz.

En los tejidos, la homeostasis, se consigue manteniendo un balance entre la muerte celular y la proliferación celular. Si la población celular varia, la proporción de células que deberían sufrir apoptosis debería variar, siendo esto lo que ocurre con los condrocitos durante el cierre del crecimiento de la placa fisaria en la osificación endocondral. Los estudios de Aizama *et al*⁹ sugieren que la apoptosis está estrechamente relacionada con el cierre de la placa de crecimiento y la osificación endocondral. Siendo la muerte celular por apoptosis, un factor muy importante en la regulación de la población celular, y este balance entre la apoptosis y la disminución de la proliferación celular es lo que lleva al cierre de la placa de crecimiento.

Aunque la hipótesis siempre había sido que el destino de los condrocitos hipertróficos, situados en la porción inferior de la capa hipertrófica, era la muerte celular, recientemente se han publicado estudios^{6, 10} que sugieren la existencia de muerte celular programada. Tal es el caso, que en los estudios realizados por Roach *et al*¹⁰, algunos condrocitos morían por apoptosis, mientras que otros se convertían en células formadoras de hueso. Sufriendo un cambio fenotípico, de condrocitos a células osteoblásticas-like, siendo éste, el paradigma en la asimétrica diferenciación celular.

La placa de crecimiento es una compleja estructura compuesta de componentes cartilaginoso, óseo y fibroso donde todos trabajan en armonía para favorecer el crecimiento longitudinal. A continuación, se detalla el resumen de las funciones de los diferentes componentes. (Tabla 1.1)

ZONAS PLACA CRECIMIENTO	A	B	C
PORCIÓN CARTILAGINOSA	ZONA DE RESERVA Almacén lípidos Y otros nutrientes	ZONA PROLIFERATIVA a) producción matriz b) proliferación celular a + b = crecimiento longitudinal	ZONA HIPERTRÓFICA a) prepara matriz para calcificación b) calcificación
COMPONENTE OSEO: METAFISIS	INVASION VASCULAR	FORMACIÓN OSEA	REMODELADO a) interno: eliminación de septos y reemplazo por hueso fibroso y laminar b) externo : formación hueso
COMPONENTE FIBROSO: Estructuras periféricas	OSIFICACIÓN NÓDULOS RANVIER. crecimiento latitudinal de la placa de crecimiento	ANILLO PERICONDRIAL Soporte mecánico a la placa crecimiento	—

Tabla 1.1: Placa de Crecimiento: Esquema de las funciones de los diferentes componentes de la placa de crecimiento

1.2.3. APORTE VASCULAR DE LA PLACA DE CRECIMIENTO

La placa de crecimiento de un hueso largo, es una entidad compuesta de varios tejidos, que tienen características individuales, pero trabajan en armonía para proporcionar el crecimiento longitudinal. Brighton *et al*¹¹ dividió la placa de crecimiento anatómicamente en 3 diferentes componentes: 1) Componente cartilaginosa, que se divide a su vez en varias capas histológicas, anteriormente descritas. 2) Componente óseo o metáfisis 3) Componente fibroso, que rodea la periferia de la placa, formado

por los nódulos de Ranvier y el anillo pericondrial de LaCroix. (Fig.1.3). Cada uno de ellos tiene un aporte vascular propio. La arteria epifisaria nutre la epífisis o núcleo de osificación secundario, que por sí solo no es una parte de la placa de crecimiento. Pequeñas arterias alcanzan en ángulo recto, el centro de osificación secundario, y a través de pequeños canales cartilagosos llegan a la zona de reserva para terminar en la parte superior de las células columnares en la capa proliferativa. Cada pequeña arteriola de la arteria epifisaria se distribuye en forma de ramas de árbol, para suplir la porción superior de 4 a 10 células columnares.

La zona proliferativa, tiene un buen aporte vascular. Ninguna de las arterias epifisarias penetra la porción de cartílago de la placa de crecimiento, más allá de la parte superior de la zona proliferativa. Ningún vaso atraviesa la zona proliferativa para suplir a la zona hipertrófica¹¹.

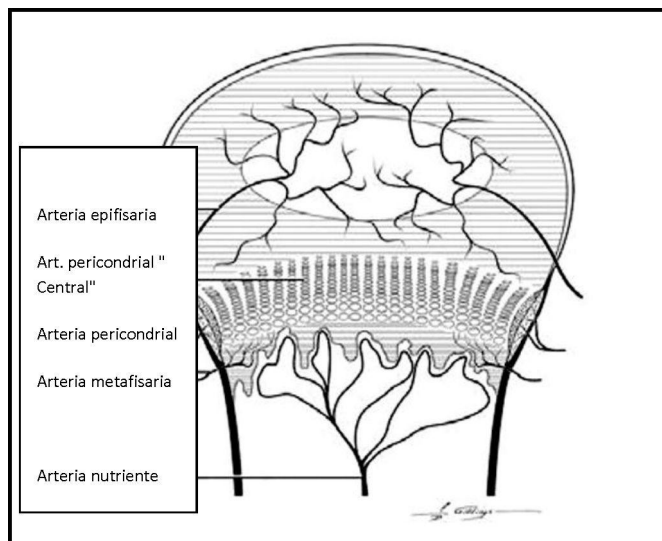


Fig.1.3. Placa de Crecimiento III: Imagen donde se muestra el aporte sanguíneo a la placa de crecimiento

La metáfisis, tiene un rico aporte sanguíneo gracias a las ramas terminales de la arteria nutricia como de las arterias metafisaria que llegan de las arterias del periostio¹². La arteria nutricia alimenta la región central de la metáfisis, alcanzando a nutrir 4/5 de la metáfisis, mientras que los vasos metafisaria, suplen sólo las regiones periféricas de la misma.

Las ramas terminales de la nutricia y de las arterias metafisaria cruzan verticalmente la zona de hueso-cartílago de la placa de crecimiento y terminan en los bucles vasculares o en los penachos capilares justo por debajo de la zona intacta o transversa del septum en la base de la porción cartilaginosa de la placa. Ningún vaso, penetra la zona hueso-cartílago más allá del último septo transverso. Ningún vaso pasa desde la metafisis a la zona hipertrófica¹².

La estructura de tejido fibroso periférico de la placa de crecimiento, los nódulos de Ranvier y el anillo pericondrial de LaCroix, son ricamente vascularizados por arterias pericondriales.

Por lo tanto, la metafisis y el tejido periférico tienen un gran aporte vascular, y sólo la capa proliferativa de la zona cartilaginosa de la placa de crecimiento recibe un adecuado aporte vascular. La zona hipertrófica de la placa crecimiento, es por tanto avascular. La avascularidad de la zona hipertrófica tiene importantes implicaciones en el metabolismo de los condrocitos y en la calcificación de la matriz^{11,12}.

1.3. CONTROL SISTÉMICO DEL CRECIMIENTO ÓSEO

El crecimiento óseo requiere una actividad anabólica intensa basada, fundamentalmente, en la síntesis proteica. Cualquier tipo de trastorno nutritivo o metabólico que afecte a la multiplicación y diferenciación celular, la síntesis de colágeno y la formación de mucopolisacáridos puede alterar el crecimiento óseo. Una alimentación inadecuada durante la primera infancia y, en especial, durante los primeros meses de vida, produce una alteración irreversible en los patrones de crecimiento.

Los factores locales están unidos a factores sistémicos, como la hormona de crecimiento, la hormona tiroidea, las hormonas gonadales, estrógenos y andrógenos, la vitamina D y los glucocorticoides¹³ (tabla 1.2).

La vitamina D es esencial para la mineralización del osteoide teniendo una influencia directa sobre la fisis. Los condrocitos y los osteoblastos producen 1,25(OH)2D3 y 24,25(OH)2D3, que producen esteroides locales que actúan como reguladores autocrinos de los fenómenos que ocurren en la matriz¹⁴. La vitamina D aumenta la

actividad de la fosfatasa alcalina y de las matrixmetaloproteinasas (MMP), aunque muchos de los efectos de la vitamina D sobre el cartílago de crecimiento son secundarios a los efectos hormonales y metabólicos.

Los condrocitos y los osteoblastos producen esteroides locales que funcionan como reguladores autocrinos de los eventos de la matriz, incluyendo la actividad de las enzimas de las vesículas de la matriz y las proteínas de la matriz durante el crecimiento longitudinal, la calcificación y la activación de los factores de crecimiento. Por otra parte, también los efectos de un andrógeno, como la dihidrotestosterona, y del 1,25(OH)2D3 están mediados localmente por la síntesis del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1).

INTRINSECOS	EXTRINSECOS
Ihh (<i>Indianhedgehog</i>)	Hormona de crecimiento
Parathormona	factor de crecimiento similar a la insulina IGF -I , IGF -II
Proteínas morfogénicas (BMP)	Tiroxina
Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)	Vitamina D
Metaloproteinasas MMP	Glucocorticoides
Proteínas ciclo celular	Estrógenos

Tabla 1.2. Placa de Crecimiento II: Factores que intervienen en el control sistémico y local del cartílago de crecimiento)

Las hormonas actúan de formas muy diversas sobre el desarrollo esquelético, alteran el grosor de la fisis, la velocidad y la magnitud del crecimiento. Tanto la hormona de crecimiento (GH) como la hormona paratiroidea (PTH) muestran su mayor actividad en la porción más alta de la zona proliferativa.

La GH afecta directamente a las células de las zonas de reserva que inducen a la división celular y ensanchan la fisis. Es necesario el funcionamiento de la interacción de la GH con el IGF-I. Los nacidos con una deficiencia en la GH presentan crecimiento dentro de los rangos normales, lo que sugiere que otras hormonas controlan el

crecimiento durante la gestación. En ausencia de GH, las hormonas sexuales, la leptina y la insulina activan el sistema IGF fisario que estimula el crecimiento¹⁵.

Las hormonas sexuales, andrógenos y estrógenos, aumentan la vascularización durante un corto espacio de tiempo, que puede ser el responsable de la aposición de hueso nuevo y de la invasión acelerada del cartílago de crecimiento desde la metáfisis produciendo su adelgazamiento y cierre. La testosterona inhibe la GH, reduciendo la actividad de los segmentos germinal y proliferativo¹⁵.

La función de los estrógenos tiene lugar gracias a los dos receptores estrogénicos, a y b, presentes en los condrocitos de la fisis. Los estrógenos inhiben el crecimiento longitudinal, disminuyendo la proliferación de los condrocitos y reduciendo la altura del cartílago de crecimiento y, secundariamente, estimulando la invasión vascular. Los estrógenos llevan la proliferación de los condrocitos al límite, disminuyendo el índice de crecimiento, la proliferación y el número de condrocitos. Los estrógenos no son estimuladores de la osificación del cartílago de crecimiento. Por el contrario, disminuyen la función de los condrocitos cuando se produce la osificación secundaria. El efecto de los andrógenos sobre el cartílago puede ser consecuencia de su transformación por los estrógenos. La testosterona inhibe la GH, inhibiendo a su vez la función de las células germinales y proliferativas¹⁶.

Durante el estirón puberal, en la adolescencia hay una intensa acción del cartílago de crecimiento, marcado por la acción de las hormonas sexuales y el incremento de la GH. La testosterona estimula, inicialmente, la división celular en la fisis. Los estrógenos parecen estimular el crecimiento del tejido óseo diferenciado y pueden frenar el crecimiento cartilaginoso afectando la placa subcondral a cada lado de la fisis¹⁶.

Aunque es evidente la relación entre crecimiento esquelético y hormonas, desconocemos su mecanismo. Los estrógenos pueden suprimir la actividad del cartílago de crecimiento por un efecto indirecto, por la ausencia de receptores fisarios para derivados moleculares esteroideos o por un efecto directo que aumenta la calcificación de la matriz, un requisito para el cierre fisario. Como efecto adicional se ha considerado un aumento de la rigidez del periostio que disminuye el crecimiento longitudinal. Las hormonas esteroideas regulan las células diana por los mecanismos nucleares tradicionales y por los mecanismos de membrana¹⁶.

1.3.1. FACTORES DE CRECIMIENTO FISARIOS

La regulación del crecimiento longitudinal en la fisis se produce por la interacción de las hormonas sistémicas y los factores de crecimiento locales, llevando a cambios en la expresión génica de los condrocitos fisarios. La diferenciación de las células mesenquimales en condrocitos durante la condrogénesis está regulada por la actividad del factor de transcripción Sox9, necesario para la expresión de muchas proteínas de la matriz, como el colágeno II, IX y XI y el agregano.

Un elevado número de proteínas han demostrado tener efectos sobre el cartílago de crecimiento, como son las proteínas de la matriz extracelular, las proteínas que regulan los ciclos celulares (ciclinas), citocinas, interluquina (IL-1, IL-6, IL-10), factores de crecimiento (TGF- β , FGF, BMP), Indianhedgehog (Ihh), MMP y factores angiogénicos y antiangiogénicos (angiopoietin-2), metaloproteasas (METH-1)¹⁷.

La proliferación de los condrocitos fisarios está controlada por mecanismos primarios que comprenden tres tipos de moléculas sintetizadas por los propios condrocitos: 1) el péptido recombinante de la hormona paratiroidea (PTHrP), 2) Indianhedgehog (Ihh) y 3) los factores transformantes/ crecimiento (TGF- β).

Los condrocitos aumentan considerablemente su volumen hasta hipertrofiarse, coincidiendo con la expresión de colágeno tipo X. La mineralización de la matriz cartilaginosa y la invasión vascular introducen precursores de la médula y osteoblastos. Los osteoblastos segregan matriz ósea y proteasas que rompen la matriz de cartílago. El inicio de la proliferación de los condrocitos del cartílago de crecimiento se estimula con el IGF1. La GH aumenta la síntesis local de IGF-1, en las células del cartílago de crecimiento, que lleva a un aumento de la división celular¹⁸.

Las BMP promueven y controlan la proliferación y diferenciación de las células del esqueleto y se localizan preferentemente en el citoplasma y, ocasionalmente, en la matriz extracelular del cartílago. Se presentan más frecuentemente en los osteoblastos y en los condrocitos maduros e hipertróficos que en las células perivasculares. Zoricic *et al*¹⁸ ha sugerido que la BMP-2 induce localmente la condrogénesis y regula la apoptosis durante el desarrollo esquelético.

Las señales de BMP inducen la expresión de Ihh por los condrocitos pre-hipertróficos y aumentan tanto la proliferación de los condrocitos como la longitud de las columnas

proliferativas. Las BMP y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) tienen efectos antagónicos¹⁸.

El Ihh es un regulador del desarrollo óseo que coordina la proliferación y diferenciación de condrocitos y osteoblastos. En el desarrollo endocondral, el Ihh es sintetizado por los condrocitos de la capa proliferativa e hipertróficos iniciales, y las interacciones con la PTHrP son fundamentales para determinar la longitud de las columnas proliferativas en cada hueso y en cada individuo.

El factor de crecimiento endotelial (VEGF) es el factor responsable y necesario para el crecimiento vascular en el cartílago de crecimiento. La ausencia de esta proteína produce importantes alteraciones en la arquitectura de la fisis, afectando al crecimiento longitudinal del hueso. Por el contrario, la invasión de los capilares metafisarios regula la morfogénesis del cartílago de crecimiento y remodela el cartílago. La invasión vascular del cartílago de crecimiento se correlaciona con la expresión, en los condrocitos hipertróficos, de VEGF¹⁸.

La fibronectina (FN) es un factor de unión célula (célula a célula) matriz extracelular que participa en la organización de la matriz. Por su parte, la laminina es abundante en la zona de reposo y disminuye en la zona proliferativa, esto es interesante para identificar los condrocitos de la zona de reserva y para definir áreas durante la condrogénesis inicial. En la fisis, la distribución homogénea de FN y colágeno II señala una regulación de la diferenciación de los condrocitos desde la zona de reserva a la hipertrófica, aunque la presencia de laminina e integrinas en los condrocitos de la zona de reserva indica que son factores de diferenciación celular^{2, 17, 18,19}.

1.4. TASA DE CRECIMIENTO DE LA PLACA FISARIA

Durante el periodo post natal, los huesos largos crecen a través del proceso de osificación endocondral durante el cual los condrocitos de las placas de crecimiento sufren una serie de diferenciaciones que comienzan en las células madre de la zona de reserva. Después de abandonar el pool de proliferación los condrocitos se someten a una diferenciación durante la cual aumenta el volumen y cambian su forma en un proceso denominado hipertrofia, aunque autores como Buckwalter *et al*²⁰ denominan

a este aumento de tamaño como ensanchamiento celular. Los condrocitos hipertróficos sufren apoptosis por una rápida condensación celular en la unión condro-hueso tras la penetración de los vasos metafisarios. La matriz calcificada que se produce de manera simultánea al ensanchamiento condrocito se convierte en el andamio para la formación de hueso nuevo por las células osteoprogenitoras de la metafisis. La velocidad y el grado de crecimiento de una fisis se determinan por la combinación de las tasas de producción celular durante la proliferación, el engrosamiento de los condrocitos durante la hipertrofia que se caracteriza por un aumento de la altura del condrocito y la producción de matriz. La actividad celular en la placa de crecimiento está influenciada por múltiples hormonas y factores de crecimiento integrados dentro de un complejo sistema de regulación del crecimiento con control sistémica, autocrina y paracrina²¹.

El grado de actividad condrocítica es una pregunta sin responder, aunque bio-mecánicamente se ha manipulado la placa de crecimiento tanto en distracción como compresión, y muchos estudios se han realizado para investigar la respuesta de los condrocitos, la actividad de la placa de crecimiento y su funcionamiento son hoy en día, aun un gran desconocido²¹.

Ehrlich *et al*²² y Herwig *et al*²³ utilizaron un modelo de epifisiodesis mediante técnica de grapado, con el análisis de las respuestas metabólicas de los condrocitos a dicho procedimiento. Ehrlich²² observó una disminución de la proliferación indicativa de un descenso de la síntesis de ADN, semejante a los estudios de Farum²¹. Herwig²³ por su parte, describió una reducción de la incorporación de la tiamina trirradiada y un descenso de la tasa de glucosa que se incorporaba a los glicosaminoglicanos. Farum *et al*²¹ muestra la importancia de la regulación del volumen de los condrocitos y de la modulación de su forma, como variables importantes para entender la tasa de crecimiento alcanzada, además, sugiere que el entorno bio-mecánico de una particular placa de crecimiento puede ser determinante para el volumen y la forma alcanzada por los condrocitos durante la hipertrofia.

1.4.1. TECNICA DE 5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU)

La detección de la replicación celular se realiza de manera habitual demostrando la incorporación de [³H] Tiamina en el ADN mediante auto radiografía o recuento por centelleo. Ambos métodos no proporcionan información cuantitativa de la frecuencia de replicación celular dentro de una población. Gratzner *et al*²⁴ desarrolló un método inmunológico basado en anticuerpos heteroclonales de conejo específico para 5.Bromodeoxiuridina, y lo adapto a la citometría de flujo. De los resultados descritos por Gratzner²⁴ se indica que los anticuerpos monoclonales específicos para BrdU pueden proporcionar un método sensible para la detención de la replicación del ADN en una célula, de manera análoga a la [³H] tiamina. La intensidad de fluorescencia por célula debido al anticuerpo monoclonal de BRDU era directamente proporcional a la cantidad de BRDU incorporado y siendo un método rápido para cuantificar la tasa de síntesis celular del ADN²⁴.

La evaluación de la actividad celular fue realizada con BrdU debido a su gran sensibilidad, porque tiene un tiempo relativamente rápido de procesamiento, y por su falta de radioactividad. La BrdU es un análogo de la tiamina, y marca las células en la fase S. El número y distribución de las células marcadas con BrdU son representativas de la población de células proliferativas y pueden ser localizadas usando anticuerpos monoclonales e inmuno-histoquímica.

1.5. CIERRE FISARIO

Cuando el esqueleto óseo se aproxima a la madurez esquelética, la tasa de crecimiento longitudinal disminuye, y la proliferación de condrocitos de la placa de crecimiento decrece. Esta disminución de la tasa de crecimiento está asociada con cambios estructurales en la fisis, incluido un gradual descenso del espesor de la placa de crecimiento, debido a una reducción de la altura de las zonas proliferativa e hipertróficas, así como una reducción del tamaño de las células hipertróficas y la densidad de las columnas. En humanos y en otros mamíferos, la placa de crecimiento se reabsorbe completamente al llegar la pubertad. Resultando una fusión de la epífisis y de la metáfisis⁸.

Recientemente, se ha hecho evidente que este proceso de cierre fisario, está controlado primariamente por el control de estrógenos en ambos sexos. En los pacientes con mutaciones genéticas en el gen que codifica la enzima aromatasa (que convierte el andrógeno en estrógeno), o mutaciones en el gen que codifica el receptor estrogénico, no se producen el cierre fisario al llegar la madurez, y estos pacientes muestran un incremento de altura, debido al crecimiento longitudinal del hueso, en la edad adulta. Contrariamente, los pacientes con pubertad precoz, que están expuestos a carga estrogénica prematuramente, presentan un cierre fisario antes que el predecible⁸.

2. BIOMECANICA DE LA PLACA CRECIMIENTO

2.1. GENERALIDADES.

Los huesos crecen hasta la edad adulta y están en continuo proceso de remodelado. Los procesos de modelado, y remodelado son sensibles a los procesos mecánicos que los rodean. Las influencias biomecánicas en el hueso deben de considerarse en un contexto general del control y la regulación del crecimiento esquelético.

El remodelado óseo, se rige por la ley de Wolff, mientras que la influencia mecánica en el crecimiento longitudinal del hueso está controlada por la ley de Hueter-Volkmann^{25, 26}. La ley de Wolff se basa en la adaptación del hueso a su entorno mecánico, que implica que el hueso esta estimulado por un estrés intermitente, y la reabsorción ósea siguiente al disminuir el estrés intermitente. En contraste, la ley de Hueter-Volkmann, se refiere a la supresión del crecimiento óseo inmaduro por una carga adicional de compresión y aceleración por la reducción de carga²⁷.

Los huesos crecen longitudinalmente principalmente mediante la síntesis de tejido cartilaginoso que es posteriormente transformado en hueso por la osificación endocondral. El crecimiento longitudinal del hueso tiene lugar en la placa de crecimiento que descansa entre la epífisis y la metáfisis de ambos extremos de los huesos largos, mientras que el crecimiento transversal ocurre en el periostio a través del proceso de osificación intramembrana²⁸.

La tasa de crecimiento longitudinal del hueso depende de la velocidad a la que las células se dividen en la zona proliferativa, y del tamaño que alcanzan en la zona hipertrófica y la velocidad a la que realizan la síntesis y degradación de la matriz.

Basado en el hecho de que la placa de crecimiento produce un crecimiento básicamente lineal, una simplificación de este enfoque fue utilizada por Stokes *et al*²⁹ para analizar el crecimiento mecánicamente-modulado, basando en el análisis de Kember *et al*³⁰. Este análisis²⁹ considera la contribución de los condrocitos de las columnas para el aumento de la longitud del hueso, en lugar del análisis volumétrico como hizo Wilsman *et al* (1996)²⁸.

En un estado estacionario el crecimiento lineal se puede expresar como:

$$\text{Crecimiento} = Nsh_{\max}$$

El Crecimiento ($\mu\text{m}/\text{día}$ se refiere a las 24 horas (diarias) de crecimiento, N (células / día) es el número de nuevos condrocitos creados por día en la zona proliferativa, que a su vez es el producto de número de células proliferativas y su tasa de división, y h_{\max} ($\mu\text{m}/\text{células}$), representa la media de altura alcanzada por la mayoría de los condrocitos maduros en la zona hipertrófica³¹.

Así la regulación de la tasa de crecimiento ya sea por maduración normal, o bien alterada por patología, o bien modulada mediante una carga mecánica, podría alcanzarse por la combinación de 1) cambio en la tasa de proliferación (tiempo de ciclo celular), 2) cambios en el número (pool) de condrocitos que se someten a la proliferación y 3) la diferente altura final de las células hipertróficas en la dirección del crecimiento. Este análisis simple asume que las células que se producen en la zona proliferativa completan su diferenciación en células maduras hipertróficas, y que también la síntesis de matriz entre las células en la zona de crecimiento es mínima. El engrosamiento de los condrocitos y la síntesis de la matriz celular están fuertemente correlacionados, ya que la síntesis de la matriz celular es requerida para llenar el aumento de volumen que rodea lateralmente a cada célula a medida que crece en dirección longitudinal. (Fig.2.1)

Hay una evidencia sustancial de que la carga mecánica afecta al proceso de crecimiento del hueso endocondral, de manera que una mayor presión sobre la fisis retarda el crecimiento y por el contra la reducción de la presión acelera el crecimiento. En estudios experimentales, se ha observado que la hipertrofia de condrocitos es un proceso clave en la respuesta biomecánica de la placa de crecimiento, como también lo es en la regulación normal del crecimiento. La zona hipertrófica es la región menos rígida de la placa de crecimiento y experimenta mayor deformidad cuando se somete al cartílago de crecimiento a alguna carga³¹.

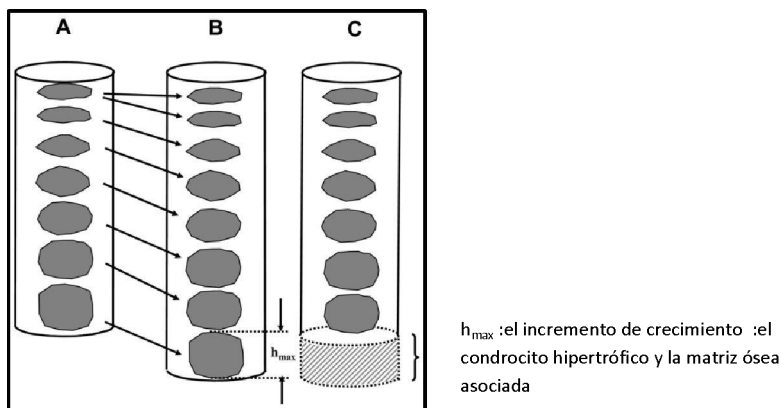


Fig.2.1. Crecimiento Óseo: Incremento de crecimiento óseo asociado con la creación de nuevos condrocitos en la zona proliferativa seguida de hipertrofia condrocitos (A -B) y la eventual osificación de las células ensanchadas que tiene una altura h_{max} (B-C). (Extraído de Villemure et al)

Si bien los índices de formación y remodelación de hueso están determinados genéticamente, el cartílago de crecimiento es sensible a los cambios de las sollicitaciones mecánicas. Las sollicitaciones fisiológicas sobre el cartílago de crecimiento son necesarias para alcanzar un correcto desarrollo esquelético.

El cartílago de crecimiento está sometido a sollicitaciones provocadas por las fuerzas internas y externas. Entre las fuerzas internas hay que considerar el propio crecimiento fisario y el del núcleo de osificación secundario. Al crecer precisan de espacio y chocan contra estructuras vecinas. Entre las fuerzas externas hay que considerar el periostio, los nódulos de Ranvier y los músculos, que crecen y se contraen, ejerciendo su fuerza a través de sus tendones que se insertan en el hueso³¹.

Dentro de los límites fisiológicos, el aumento de la distracción o de la compresión estimula el crecimiento, mientras que por debajo de los límites, el crecimiento puede verse disminuido o incluso detenido. Estos principios son conocidos como ley de Hueter-Volkmann^{25, 26}, que señala la relación inversa entre las sollicitaciones a compresión paralelas al eje longitudinal del cartílago fisario y el índice de crecimiento fisario. Stokes *et al*²⁹ estudiando las influencias mecánicas en la cola de la rata, vio que las variaciones mecánicas actúan sobre la velocidad de crecimiento de la fisis de los vertebrados, y esto se consigue por una modificación de la altura de los condrocitos hipertróficos. Las fuerzas de compresión tienen mayores que los conseguidos con la distracción.

El propio crecimiento genera deformaciones y presiones en el esqueleto en desarrollo, que influyen sobre la morfogénesis por uno o varios de los cuatro patrones siguientes: modulando la velocidad de crecimiento, modulando la diferenciación de los tejidos, influyendo en la dirección del crecimiento o deformando los tejidos².

2.2. EFECTOS MECÁNICOS SOBRE EL CARTÍLAGO DE CRECIMIENTO

La modulación mecánica del crecimiento fisario sigue las leyes de “Hueter–Volkman”^{25,26}. La modulación mecánica del crecimiento longitudinal por fuerzas de compresión es la fuerza más reconocida, pero la tensión, torsión y flexión tienen también influencia en el desarrollo longitudinal, rotacional y angular. Mientras el crecimiento responde a una carga sostenida, el remodelado óseo responde primariamente a una carga transitoria. (Fig. 2.2)

La medida de tiempo o ritmo relativo de los estímulos mecánicos, y la consecuente respuesta de crecimiento son desconocidas, las variaciones diurnas en el metabolismo óseo, interaccionan con esto^{29,32}.

Cuando la fisis produce un incremento en longitud del hueso, varios eventos tienen lugar simultáneamente. 1) Las células en la zona proliferativa se dividen, 2) las células en la zona hipertrófica se agrandan en la dirección del crecimiento, y se produce matriz extracelular, y 3) las células en la zona provisional de calcificación completan la apoptosis, y son reemplazadas por cartílago calcificado.

La regulación del crecimiento es compleja, con factores genéticos, vasculares, hormonales, y biomecánicas, que juegan un papel importante. Las variaciones en la tasa de crecimiento entre las placas de crecimiento normales y patológicas, y entre las diferentes fisis según sus localizaciones anatómicas, proporcionan los medios para fuentes de estudio de las diferencias de crecimiento³³. De estos estudios parece que las variables clave en el control de la velocidad de crecimiento son: la tasa de creación de nuevos condrocitos en la zona proliferativa, la tasa de engrosamiento de condrocitos y la síntesis de matriz en la zona hipertrófica.

El crecimiento longitudinal resulta del producto de estas variables. Una carga mecánica en la placa de crecimiento, tiene poco efecto en la tasa de proliferación, mientras que el grado de modulación mecánica del crecimiento tiene correlación con el aumento de engrosamiento de condrocitos en la zona hipertrofica³³.

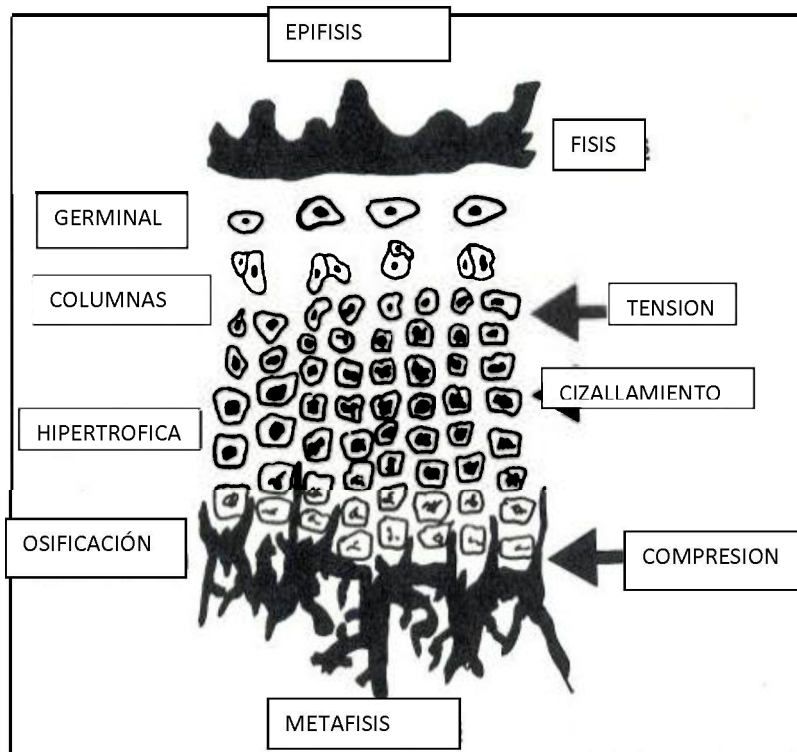


Fig.2.2. Placa de Crecimiento VI: Representación de las zonas histológicas según el tipo de carga aplicada. Extraído de Stokes et al³³

Las tensiones mecánicas se creen que también, tienen influencia en los centros de osificación secundaria. Se ha propuesto que los estreses mecánicos, tienen un papel en el desarrollo de los cambios fenotípicos en el límite entre la zona proliferativa y la zona hipertrofica. La polaridad de la placa de crecimiento, es unidireccional porque solo se produce en las células hijas del lado diafisario de la zona proliferativa. Las variaciones de la carga mecánica resultante de las variaciones de estrés en la superficie articular adyacente, dan lugar a la forma ondulada de la placa de crecimiento³³.

La magnitud de la modulación mecánica del crecimiento probablemente difiere según el tamaño de las placas de crecimiento, y según la actividad de la misma. Compresiones mecánicas sostenidas reducen el engrosamiento de los condrocitos en la zona hipertrófica (esto por sí mismo no explica la alteración de crecimiento que se observa tras estos estreses), pero es probable que la carga mecánica reduzca también el número de nuevas células producidas en la zona proliferativa de la placa de crecimiento³³.

2.2.1. EFECTOS DE LA COMPRESIÓN

La compresión produce una reducción de la zona proliferativa y un aumento de la zona hipertrófica con una desorganización progresiva de las capas y de las columnas de condrocitos.

Se ha observado que se produce un estrechamiento radiológico de la fisis al comprimir el cartílago de crecimiento independiente del mecanismo utilizado (grapas o fijadores externos). El crecimiento longitudinal se reanuda si desaparece el agente compresor, siempre y cuando el hueso no haya alcanzado la madurez esquelética, o no se haya producido una lesión irreversible aunque el ritmo y la cantidad del crecimiento posterior son impredecibles.

El efecto de las solicitaciones a compresión de baja magnitud sobre la fisis es controvertido y algunos autores no creen que fuerzas pequeñas inhiban el crecimiento, si bien Peruchon *et al*³⁴ demostraron que pequeños aumentos de la presión disminuía el crecimiento. En un estudio basado en elementos finitos, Lerner *et al*³⁵ vieron que las solicitaciones a compresión elevadas están correlacionadas con menores índices de crecimiento.

Cuando una fisis es sometida a una fuerza de compresión parece que existe un efecto compensatorio del crecimiento de un mismo hueso. El cartílago de crecimiento intacto (cartílago del lado opuesto del hueso) compensa, al menos en parte, el crecimiento óseo perdido en esa fisis. Cuando el efecto mecánico sólo afecta a una parte del cartílago de crecimiento (hemiepifisiodesis), la parte no afectada sigue creciendo, por lo que se puede producir una desalineación axial (crecimiento asimétrico).

La compresión de la fisis, afecta tanto a la morfología como a la función de los condrocitos. Una compresión que exceda el peso del cuerpo del individuo puede causar epifisiodesis. Alberty *et al* (1993)³⁶, en su estudio, tras aplicar una fuerza de compresión progresiva no observó aumento en el grosor de la fisis, sino al contrario una reducción en la altura de la capa proliferativa e hipertrófica. Las células proliferativa en la zona columnar estaban casi detenidas. Poniendo en entredicho los artículos de Trueta³⁷ y Herwig²³ en los que se observó, una hiperplasia transitoria semejante a lo descrito tras la aplicación de una fuerza de distracción en la fisis³⁰.

2.2.2. EFECTOS DE LA DISTRACCIÓN

La distracción fisaria es una técnica que se ha utilizado en la corrección de las disimetrías y desviaciones angulares de los huesos largos. En modelos animales, la distracción pequeña y a ritmo lento aumenta la longitud del hueso mediante hiperplasia del cartílago de crecimiento, sin producir una epifisiólisis, con un aumento de la actividad celular fisaria.

Si la distracción puede producir un crecimiento efectivo del hueso, sino se produce una epifisiólisis, ha sido motivo de controversia. Ring³⁸ en 1958 mostró que la fuerza de distracción a través de la fisis causaba ruptura a través de la zona hipertrófica, mientras que otros como de Bastiani *et al*³⁹ en 1986, sugerían que efectivamente pequeñas fuerzas de distracción incrementaban la longitud del hueso, simplemente mediante la hiperplasia de la placa de crecimiento sin necesidad de fractura.

Sin embargo, al efectuar una distracción sobre el cartílago de crecimiento, aunque sea muy pequeña, durante un tiempo lo suficientemente prolongado, se acaba produciendo una separación entre la capa hipertrófica y la metafisis⁴⁰.

El aumento en la altura fisaria originada por la distracción, antes de producirse la epifisiólisis, puede deberse a un acumulo de condrocitos en la capa hipertrófica debido a la afectación de la irrigación metafisaria, ya que no habría llegada de células óseas por la isquemia metafisaria. Los vasos en estas condiciones están elongados y tienen que realizar un mayor recorrido hasta alcanzar la capa hipertrófica del cartílago de crecimiento, disminuyendo su diámetro y el flujo sanguíneo efectivo⁴⁰.

Es decir, de acuerdo con la literatura tenemos dos posibles mecanismos para explicar el engrosamiento encontrado en la fisis, bien una hiperplasia celular secundaria a un incremento en la proliferación o bien el aumento a expensas de la ausencia de calcificación de la zona hipertrófica. Apte *et al*⁴⁰ en 1994, estudió como afectaba la distracción a la producción celular en la zona proliferativa y a la consecuente osificación de la zona hipertrófica de la fisis. En su estudio se mantenía una fuerza en tensión axial de 20 Newton(N) durante 4-5 días, produciendo una fractura fisaria Salter-Harris tipo I. Histológicamente, se observó un incremento en el grosor a nivel de la zona hipertrófica de la placa de crecimiento en los especímenes sometidos a la fuerza de distracción, sobre todo a nivel central. De ello, dedujeron que la acumulación de condrocitos hipertróficos era debido a la inducción de la isquemia metafisaria. En este estudio no se observaron incrementos en las células proliferativa en la zona proliferativa⁴⁰.

Así pues, parece que una distracción gradual da lugar a un incremento en la altura de las zonas proliferativa e hipertrófica, pero no incrementa el número de proliferación de condrocitos, (si lo medimos mediante el número de células en fase S). El efecto de distracción en la regulación del mecanismo de la placa de crecimiento permanece incierto. La compresión, por otro lado, conduce a una reducción significativa en la altura de la zona hipertrófica y proliferativa y una disminución de la proliferación de condrocitos³⁶.

2.3. MOLDEADO ÓSEO

Es el mecanismo que permite una renovación constante del esqueleto antes de que cese el crecimiento, permitiendo que los distintos huesos conserven su forma durante el proceso de crecimiento. Aunque los huesos en crecimiento están cambiando continuamente su organización interna, mantienen de modo aproximado la misma forma externa desde el inicio del desarrollo fetal hasta la vida adulta. La forma del hueso se mantiene gracias a una continua remodelación de su superficie¹.

Esto significa que debe existir un balance entre el depósito de hueso en el periostio y la absorción en otro punto. El remodelado óseo es el resultado de dos actividades: a) la

producción (formación) de nuevo hueso, mediada por osteoblastos y b) la pérdida (reabsorción) de hueso que es realizada por osteoclastos. La cantidad de masa ósea depende del balance entre estas dos actividades, es decir, del ritmo del recambio óseo. Si el balance es igual a cero, y la masa ósea no variará en función del tiempo¹.

El proceso de remodelado óseo se puede dividir en cuatro etapas, fase inicial o de activación, fase de resorción, fase intermedia o de reposo, y fase de formación. Se describe a continuación de manera esquemática¹(Fig. 2.3).

✓ Fase inicial o de activación

En ella tiene lugar la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de los osteoclastos procedentes de los vasos próximos. Interacción entre los precursores de osteoblastos y osteoclastos.

✓ Fase de resorción.

En esta fase los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral, secretando iones de hidrogeno y enzimas lisosomales, en especial la catépsina K que a pH ácidos es capaz de degradar los componentes de la matriz ósea. Esta produce cavidades irregulares en el hueso trabecular llamadas lagunas de Howship o de resorción.

✓ Fase intermedia de reposo o de inversión

Al terminar los osteoclastos su actividad resorptiva, desaparecen de la zona mediante el fenómeno de apoptosis. La laguna queda libre y es colonizada por macrófagos que acaban de degradar el colágeno, depositando proteoglicanos formando una línea. Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de pre-osteoblastos.

✓ Fase de Formación

Los pre-osteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfo-genéticas óseas), responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas. A los 30 días del depósito osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical, y a los 90 días en el hueso trabecular.

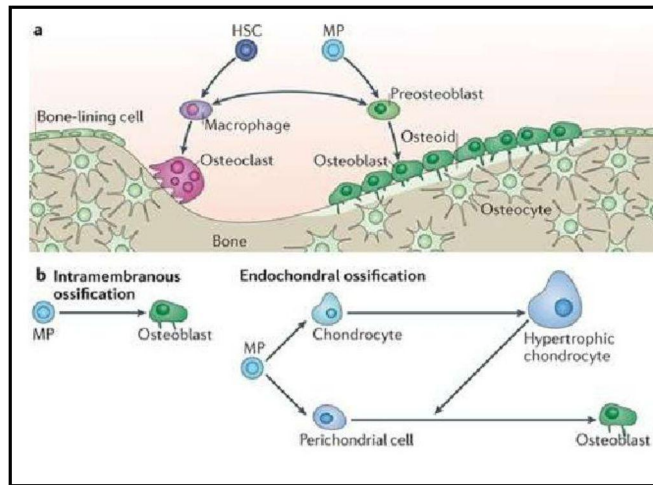


Fig. 2.3. Placa de Crecimiento VIII: Esquema de la regulación del remodelado óseo. En él se pueden distinguir sus cuatro etapas, fase inicial o de activación, fase de resorción, fase intermedia o de reposo, y fase de formación. HSC: células hematopoyéticas, MP: Progenitores mesenquimales, Perichondrialcell: célula pericondrial, Chondrocyte: condrocito: Hypertrophic Chondrocyte: Condrocito Hipertrofico. Osteoblast: osteoblasto. (Extraído Nature Reviews Molecular Cell Biology 13, 27-38)

2.4. VISCOELÁSTICIDAD DE LA PLACA DE CRECIMIENTO.

El hueso y la placa de crecimiento, son materiales con características viscoelásticas, lo que implica que son capaces de sufrir deformidades elásticas, es decir que son reversibles. Si se suprimen las fuerzas que provocan la deformidad, (siempre que estas fuerzas no superen un cierto límite) el hueso vuelve al estado inicial previo a la aplicación de las cargas⁴¹.

Este comportamiento constituye la ley de Hooke (Fig.2.4) que se aplica sólo para pequeñas deformaciones, hasta un límite denominado límite de proporcionalidad. En este tramo, el comportamiento del material (Fisis/hueso) es elástico, esto es, si se disminuye el esfuerzo aplicado lentamente, se recorre el mismo tramo de la curva en sentido contrario, hasta alcanzar el punto de origen donde el esfuerzo y la deformación son nulos. La proporcionalidad entre el esfuerzo y la deformación en el

tramo de la ley de Hooke, permite definir el módulo de Young, o módulo de elasticidad, (E).

Este módulo es la constante de proporcionalidad, de manera que:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

Donde E es el módulo de elasticidad longitudinal, ϵ es la deformación unitaria en cualquier punto de la barra, y σ es la presión ejercida sobre el área de sección transversal del objeto

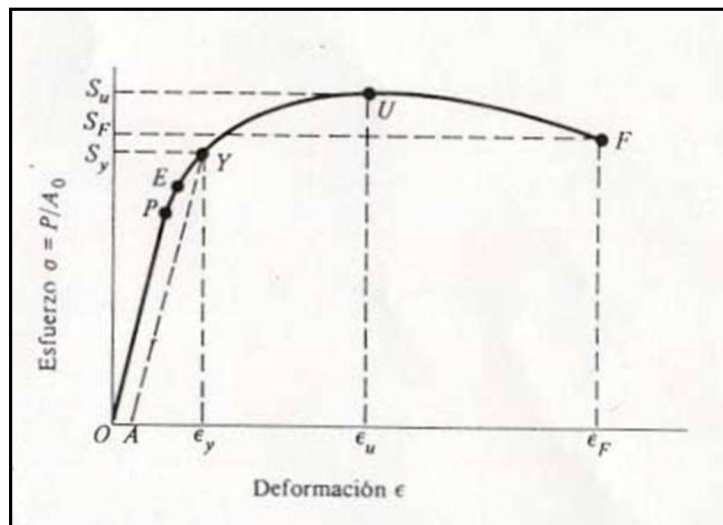


Fig. 2.4 Curva esfuerzo real-deformación real: Diagrama esfuerzo-deformación obtenido a partir del ensayo normal a la tensión de una manera dúctil. El punto P indica el límite de proporcionalidad; E, el límite elástico Y, la resistencia de fluencia convencional determinada por corrimiento paralelo (offset) según la deformación seleccionada OA; U; la resistencia última o máxima, y F, el esfuerzo de fractura o ruptura. Extraído de Collins et al

El punto P, recibe el nombre de límite de Proporcionalidad (límite elástico proporcional). Este es el punto en que la curva comienza primero a desviarse de una línea recta. El punto E se denomina límite de elasticidad (límite elástico verdadero). No se presentará ninguna deformación permanente en el material (Fisis/hueso) si la carga

se suprime en este punto. Entre P y E el diagrama no tiene la forma de una recta perfecta, aunque el material sea elástico.

La placa de crecimiento tiene una mayor visco-elasticidad que el hueso, por lo tanto tiene un módulo de Young superior y soporta una mayor deformidad elástica.

3. LA ORTOPEDIA: EL ARTE DE CORREGIR Y PREVENIR DEFORMIDADES EN EL ESQUELETO DE LOS NIÑOS

La capacidad para alterar el crecimiento del esqueleto mediante la aplicación de fuerzas externas es conocida desde antaño. En los tratados antiguos remontándonos hasta los egipcios, se pueden encontrar artículos que relatan las prácticas que se realizaban en la antigüedad para deformar el esqueleto de los seres inmaduros. Mediante crueles y salvajes prácticas detenían el crecimiento de los niños, para producirles deformidades o simplemente para crear "nanus o pumilo" palabras utilizadas para describir a los "enanos artificiales", como ocurría en la antigua Roma⁴². Desde que Andry⁴³ publicase en 1741 el libro, L'Orthopaedia, en la versión inglesa, llamado "Orthopaedia or the art of correcting and preventing deformities in children". (Fig.3.1). La corrección de las deformidades, quedó ligada íntimamente a la Cirugía Ortopédica. La palabra <<Orthopedia>> se forma a partir de dos palabras griegas: "Orthos" que significa recto, y " paidon " que quiere decir niño.

El arte de guiar el crecimiento, aprovechando la capacidad que tiene el hueso en crecimiento a sufrir deformaciones plásticas, constituye uno de los principios más antiguos de la Ortopedia. La imagen del árbol torcido, que es enderezado gracias a un tutor y una cuerda que sería la contención externa, para crecer recto, es el icono de la Ortopedia Pediátrica, y representa a la perfección el principio de plasticidad del esqueleto en crecimiento de los niños⁴⁴.

La palabra "plástica" se define como con capacidad de los objetos para ser moldeado. El hueso durante el crecimiento puede ser deformado, si se aplica la fuerza de una manera más o menos continuada. La manipulación del crecimiento óseo, para corregir una deformidad es un concepto técnicamente muy atractivo, ya que permite la corrección gradual mediante métodos no invasivos o mínimamente invasivos⁶.

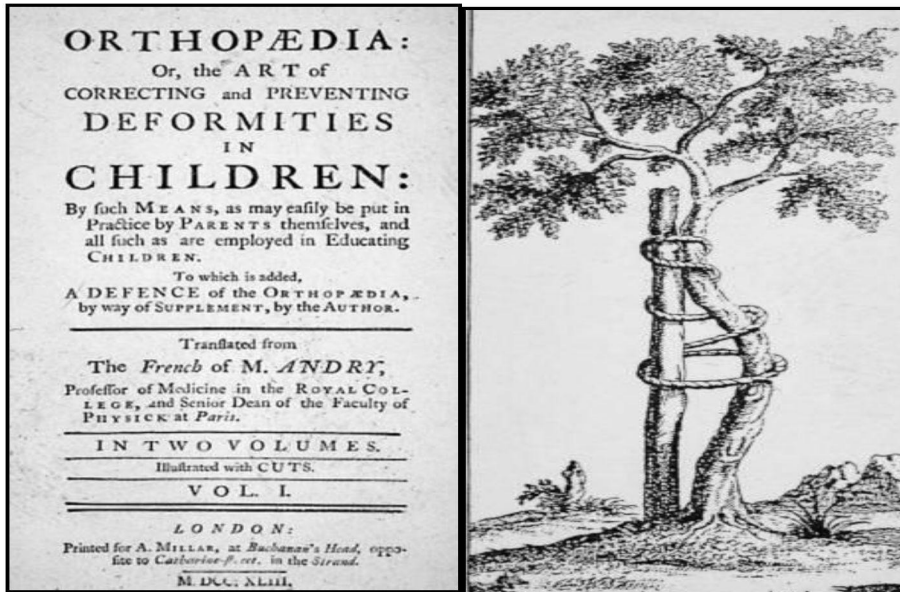


Fig.3.1. Árbol de Andry: Imagen de la portada de la edición inglesa de "Orthopaedia" (1743)

El crecimiento epifisario, es el principal mecanismo en la respuesta plástica del hueso. La presión aplicada en la fisis puede ser clasificada de dos maneras, paralela en dirección a la placa de crecimiento y en ángulo recto en esta dirección. Cualquier fuerza o grupo de fuerzas aplicadas en alguna dirección intermedia entre estas dos, puede resolverse en vectores paralelos a una u otra¹⁵.

El crecimiento longitudinal es el resultado de la proliferación y el engrosamiento de los condrocitos de la placa de crecimiento, con variaciones en el grado de células hipertróficas entre las diferentes fisis y representa hasta un 50% de variación en las tasas de crecimiento⁴⁵. El aumento de tamaño de las células está controlado por la membrana de transporte, que es regulada hormonalmente⁴⁶. El crecimiento esquelético está influenciado por muchos factores, incluyendo, altura paterna, raza, sexo, salud y grupo social. Se han descrito que las curvas de crecimiento puedan estar influenciadas por hormonas durante las etapas de crecimiento de los niños tales como Infantil o infancia temprana, infancia tardía, pubertad^{46, 47}.

El componente Infantil/ infancia temprana está presente durante los tres primeros años de vida, es una curva pendiente no lineal de desaceleración influenciada por la

nutrición y factores insulino-dependientes. La lenta curva de desaceleración de la infancia tardía es dependiente de la hormona de crecimiento, se ve afectada por las estaciones, se afecta ligeramente de manera precoz en las chicas⁴⁷.

El componente puberal es esteroide dependiente. Tanto en chicas como en chicos, el estrógeno es la hormona dominante. Bajos niveles estimulan el eje de la hormona del crecimiento que causa un brote de crecimiento temprano en las niñas y un brote de crecimiento puberal más tardío en los niños. Los niveles elevados de estrógenos estimulan el eje de la hormona de crecimiento, causando estrechamiento y posterior fusión de la placa de crecimiento, con el cese del crecimiento esquelético. Sin embargo, el efecto de las hormonas en el esqueleto en crecimiento es muy complejo. Se cree que la hormona de crecimiento produce aumento del número de células en las columnas de proliferación de la fisis, mientras que la hormona tiroidea potencia la proliferación citoplasmática, y los estrógenos, los cuales juegan un papel fundamental, desencadenan el cierre fisario después de un periodo de crecimiento longitudinal⁴⁷.

Durante los últimos cien años, se ha discutido mucho sobre la influencia de las fuerzas de compresión y de tensión sobre los huesos en crecimiento. En 1862 Hueter²⁵ y Wolkman²⁶ avanzaron la teoría que la compresión inhibía el crecimiento de los huesos y producía atrofia, mientras que la distracción incrementaba el crecimiento y la formación de hueso, Wolff pone en duda ésta creencia y formula su hipótesis sobre la transformación del hueso, según la cual tanto la compresión como la tensión conducían a la formación de hueso y al crecimiento del hueso^{45, 47}. El motivo de discrepancia radica en que muchos autores no hacían distinción entre el crecimiento y la madurez del hueso.

Según el trabajo de Arkin *et al*⁴² cuando la placa de crecimiento está sujeta a stress, la velocidad y la dirección de crecimiento de la fisis se ven modificada. La presión aplicada en dirección paralela a la placa de crecimiento inhibe la velocidad del crecimiento. Mientras que una presión considerable es necesaria para detener el crecimiento completamente, pequeñas o incluso intermitentes presiones pueden disminuirlo o dificultarlo. En cambio, la presión aplicada en dirección perpendicular a la placa de crecimiento, desvía la dirección de dicho crecimiento, resultando en un desplazamiento traslacional del hueso. La facilidad con la que se producen deformidades angulares o torsionales en el hueso en crecimiento, es inversamente

proporcional al diámetro del mismo. Cuanto más estrecho es el hueso, mayor es su plasticidad⁴².

Phemister⁴⁸, publicó en 1932, la detención quirúrgica del crecimiento longitudinal del hueso, introduciendo una idea nueva en la corrección del crecimiento excesivo en longitud y las deformidades angulares, era una técnica basada en la lesión permanente de la fisis. En 1945, Haas⁴⁶ propuso retardar el crecimiento del hueso anudando un alambre al hueso. Describiendo por primera vez, el concepto del arresto temporal del crecimiento. En su descripción técnica detalla, como se produce la detención y como tras la retirada del material tiene lugar la reanudación del crecimiento de la placa de crecimiento, sin destruirse el poder de proliferación de la fisis. Estas ideas de Haas⁴⁶ establecieron los principios para la corrección de las deformidades angulares valgo-varo.

Otro de los pioneros en los estudios de corrección de deformidades de las extremidades, fue Gelbke⁴⁹. Las conclusiones alcanzadas por Gelbke, son las siguientes: 1) una presión permanente y en máximo grado inhibe longitudinalmente el crecimiento del hueso y no permite un incremento compensatorio en circunferencia⁴⁹. La inhibición del crecimiento es debido a la inhibición de la proliferación del cartílago de crecimiento que se estrecha y se vuelve irregular en su distribución, 2) La tensión permanente y fuerte no incrementa el crecimiento de hueso endocondral, al contrario, produce el mismo efecto que la compresión, cuando se aplica directamente sobre el hueso, 3) Los cambios causados por fuerzas mecánicas pueden ser reversibles, si estas fuerzas se retiran antes de la madurez esquelética⁴⁹.

Heuter *et al*⁵⁰ fue el primero que explico de manera científica el fenómeno de manipulación mecánica del hueso en crecimiento en 1862, cuando publicó que el incremento de fuerza paralela al eje axial de la epífisis inhibía el crecimiento, mientras que disminución de fuerza lo promovía. Siete años más tarde Volkmann²⁶ observó que modificaciones en el grado de aplicación de la fuerza de compresión causaban crecimiento asimétrico en la articulación. Estas observaciones fueron realizadas ya hace más de 150 años, pero son las bases del concepto de "epifisiodesis"⁴⁵.

4. TÉCNICAS DE EPIFISIODESIS.

4.1. GENERALIDADES: HISTORIA DE LA EPIFISIODESIS

En 1933, Pheemister⁴⁸ describió el primer procedimiento quirúrgico de epifisiodesis. El sistema consistía en la creación de un puente óseo a través de la fisís, mediante la extracción de un segmento rectangular de hueso que incluía una asimétrica porción de metáfisis y epífisis en cada lado de la fisís, y después lo reinsertaba en dirección opuesta lo que conllevaba a la lesión permanente de la fisís y la formación de un puente óseo a través de la fisís. Este método de epifisiodesis es permanente y requiere una adecuada predicción del crecimiento remanente, ya que el crecimiento posterior no es posible. (Fig.4.1)

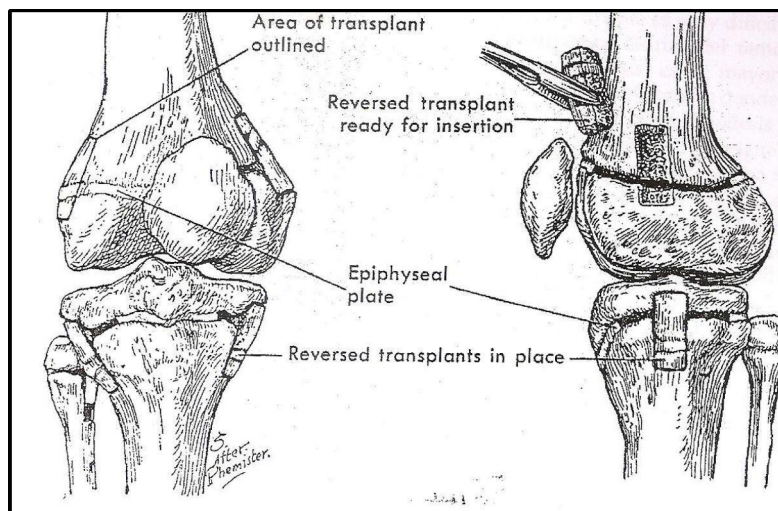


Fig.4.1. Epifisiodesis: Esquema de la técnica quirúrgica de Pheemister

En 1945, después de realizar estudios en animales y en posteriormente en niños, Haas⁴⁶ propuso el cierre del crecimiento fisario con alambres. Durante sus estudios observó que una vez retirados los alambres, el crecimiento longitudinal se restablecía. Esta técnica abrió el camino para nuevos métodos para el tratamiento de las

dismetrías y de las deformidades angulares. Posteriormente en 1949, Blount y Clarke⁵¹ modificaron el método quirúrgico mediante la colocación de grapas, a través de la placa de crecimiento puenteando la fisis sin llegar a lesionarla, además unifican la técnica quirúrgica.(Fig.4.2). Las indicaciones del procedimiento incluían detener el crecimiento, o bien la realización de una corrección gradual de las deformidades angulares. Blount en una comunicación personal junto con Phemister⁴⁸ citó que las grapas no deberían permanecer más de dos años para asegurar el crecimiento normal de la fisis, después de la retirada del material.



Fig.4.2. Epifisiodesis II: Técnica de grapado con grapas de Blount.

En 1979, Zuege⁵² describió que la epifisiodesis con grapas es una técnica efectiva y segura para el tratamiento de las deformidades angulares. Anotando que es importante una adecuada evaluación clínica y radiológica para predecir el tiempo exacto para retirar las grapas así como el llamado efecto “rebote”.

En 1984, Bowen⁵³ propone una técnica de epifisiodesis percutánea usando fluoroscopia y curetaje de la fisis, produciendo un arresto permanente de la fisis, sin embargo no detalla que cantidad ni diámetro de la fisis es necesario lesionar para asegurar el efecto. Otras técnicas que utilizan tornillos canulados, pins han sido descritas tales como las de Metaizeau⁵⁴ en 1988.

Experimentalmente, la hemiepifisiodesis con grapas ha demostrado que reduce, pero no que detiene, la actividad celular fisaria⁵⁵. La preservación del periostio y el anillo

pericondrial es esencial, tanto durante la colocación como durante la retirada de la placa, para prevenir la formación de puentes fisarios^{56, 57, 58}.

El Dr. Peter M.Stevens⁵⁹ de la Universidad de Utah, en 1999 creó un implante compuesto por una placa con dos agujeros en forma de ocho, con dos tornillos canulados, que se utilizaban de manera semejante a las grapas para crear epifisiodesis. La técnica ofrece una rápida corrección de la deformidad, mientras que evita la teóricamente la compresión de la fisis, y el arresto permanente de la fisis. La pérdida de fijación y el fallo del implante es raro. (Fig.4.3)

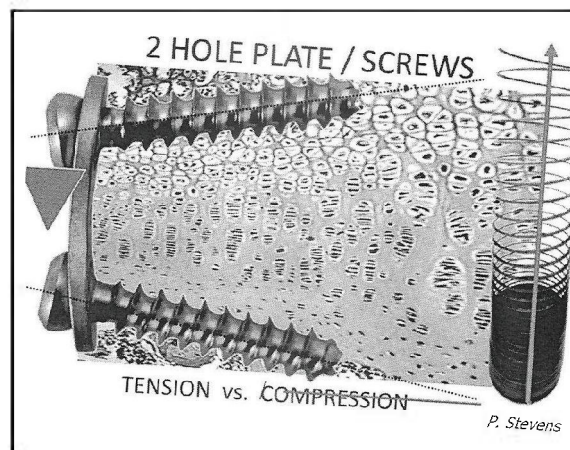


Fig.4.3. Epifisiodesis II: Esquema de las bases del funcionamiento de la técnica Crecimiento guiado según Stevens, y que hoy en día constituye uno de los mecanismos más utilizados. Extraído de Stevens et al⁵⁹

Las grapas han proporcionado un sistema efectivo de corrección de las deformidades angulares y de epifisiodesis temporales. Desde que Stevens introdujo el concepto de placa en 8, como método de tratamiento para las deformidades angulares, ha disminuido el número de complicaciones que se observaban con las grapas, tales como fallo en el sistema de osteosíntesis, rotura, extrusión⁶⁰. El concepto de la placa en 8, se basa en su actuación como banda de tensión con el fulcro situado fuera de la fisis, de manera que más que producir una fuerza de compresión como en la grapa, actuaría por distracción. Este simple sistema funciona a tensión sin compresión, y consiste en una placa no bloqueada extra-perióstica y dos tornillos, los cuales tienen la capacidad de divergir hasta 30º, conteniendo la fisis⁶¹. Mientras que la grapa, impone un fulcro

rígido sobre la fisis, la placa en 8, creando un brazo de palanca más largo sobre la placa fisaria. Teóricamente, permitiendo una corrección más rápida, mientras mantiene el crecimiento total. (Fig. 4.4)

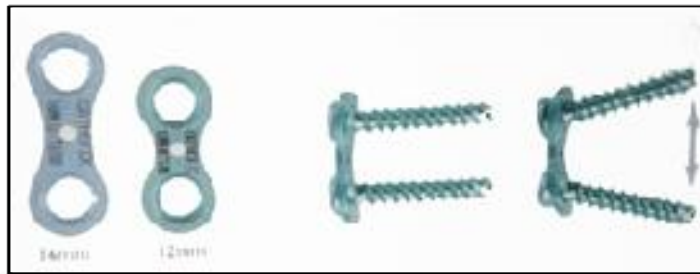


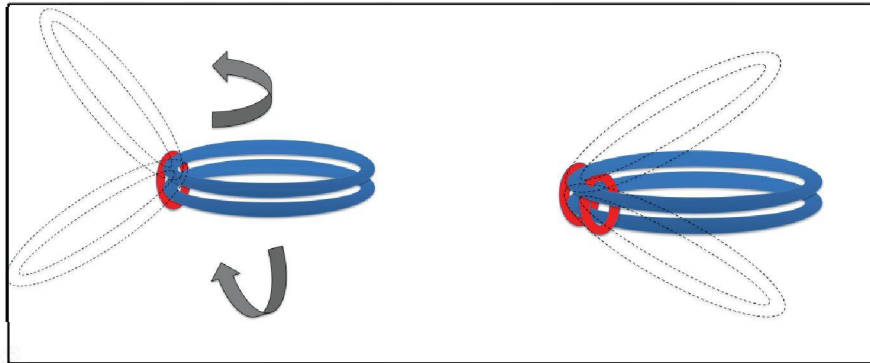
Fig. 4.4 Eight-plate o placa en 8 (Orthofix, Texas USA): Imagen que muestra el pivotaje de los tornillos en la placa en 8, responsable de crecimiento fisario.

La habilidad de los tornillos para pivotar tiene como resultado una baja presión que se transmite a través de la fisis, reduciendo el riesgo de fusión fisaria. Ballal *et al*⁶² sugerían que la compresión si podía existir, pero si ésta ocurriese sería durante un corto periodo de tiempo, ya que el movimiento de los tornillo, libera la fisis de la compresión. Sin embargo todas estas argumentaciones teóricas no han podido ser refrendadas en estudios experimentales que han demostrado que en ambos mecanismos la placa de crecimiento está sometida a fuerzas de compresión^{63, 64}. Los tornillos y la placa son una construcción más resistentes a la extrusión que las grapas, sobretodo en niños más jóvenes con epífisis más cartilaginosas⁴⁵.

Sanpera *et al*⁶⁵, mostraron que el sistema en placa en 8, de hecho produce correcciones angulares más rápidamente que las producidas por las grapas o los tornillos transfisarios⁶⁶ al menos durante algunos periodos de la hemiepifisiodesis.

Este modelo único de acción se basa en la necesidad de 1 sola placa por fisis, siendo la longitud de los tornillos irrelevante^{61, 65}, ya que la placa en 8 comprime la placa de crecimiento en un solo punto, a diferencia de la técnica de grapado que comprimía la placa de crecimiento en varios puntos de su circunferencia. La placa en 8, al comprimir solo en un punto de la fisis, permite el crecimiento libre a través de ese punto. En la grapa por el contrario, la compresión se realiza en varios puntos, y la capacidad de

crecimiento está limitada por la longitud del arco sobre la que se aplica la compresión⁶⁵. (Fig. 4.5)



MODELO DE APERTURA EN LA PLACA EN 8

MODELO DE APERTURA EN EL GRAPADO FISARIO

Fig.4.5. Teoría de los Círculos. La placa en 8 realiza la compresión en un punto, mientras que la grapa realiza la compresión en varios puntos. Comunicación personal Dr. Sanpera

4.2. LA PLACA DE CRECIMIENTO Y EFECTO REBOTE

La tasa de crecimiento longitudinal de la placa fisaria está en función del número de células en la zona proliferativa, la tasa media de mitosis de estas células, y la cantidad de matriz que las envuelve en la zona hipertrofica. La cantidad de matriz está determinada por la sustracción de la matriz sintetizada menos la que se ha degradado antes de la última calcificación⁷. El grosor de la zona proliferativa, nos da una aproximación del número de células de esta zona. Siendo una excelente correlación el grosor de la zona proliferativa y la tasa de crecimiento.

Cuando se comparan las tasas de crecimiento entre las diferentes fisis, el crecimiento rápido está asociado con una gran hipertrofia celular en la zona hipertrofica. Las pequeñas contribuciones para aumentar el crecimiento son causadas por una mayor proliferación celular y un aumento en la producción de matriz. El crecimiento de la placa fisaria es un complejo fenómeno que depende básicamente de tres diferentes factores⁶⁷.

Desde el punto de vista sistémico, el crecimiento está sujeto a factores nutricionales, y factores hormonales (hormona de crecimiento, factor insulina-dependiente, hormona tiroidea, glucocorticoides, hormonas sexuales). Pero también hay influencias de tipo regional; el crecimiento de la fisis es intrínsecamente diferente, dependiendo de la localización, por ejemplo, la fisis distal del fémur crece más rápido que otras del cuerpo. Lo que hace que estas células cartilaginosas, se comporten diferente según la localización, es un misterio, se cree que posiblemente están influenciadas por factores del huésped, incluido estrés local, que puede ser fisiológico o patológico. Otros factores que afectan al crecimiento, son fenómenos tales como inflamaciones adyacentes, (incluyendo infección, artritis, neoplasias). O alteraciones del periostio tal tal y como se demuestra en técnicas experimentales en el laboratorio, donde la simple resección periótica, produce un incremento en la tasa de crecimiento⁶⁷.

El crecimiento longitudinal está influido por factores mecánicos, tales como compresión y distracción. El cartílago es más resistente, a las fuerzas rápidas de compresión pero se deforma fácilmente con tasas más lentas de compresión por la salida gradual de agua de las moléculas. Los efectos de la fisis a la compresión varían según la magnitud y la frecuencia del estrés aplicado.

Histológicamente, la compresión conlleva un estrechamiento de la placa de crecimiento, y una desorganización de la arquitectura columnar, con una disminución del número de células proliferativa y una disminución de la altura de las células hipertróficas⁶⁷.

Siffert *et al*⁶⁸ estudió el efecto de las grapas sobre la fisis, y lo comparó con el de las agujas transfiseales y comprobó que mientras la grapa tenía un efecto por un mecanismo de inhibición del crecimiento asociado a una inhibición de la fase proliferativa del crecimiento, la fisis se recuperaba sin lesión al retirar las grapas, mientras que cuando las agujas eran retiradas no volvía a crecer el cartílago de crecimiento, sino que se producía un defecto trans-epifisario con crecimiento de hueso.

Aykut *et al*⁵⁵ estudió el efecto temporal producido por las placas de tensión en la placa de crecimiento, evaluando la actividad de las células de la zona proliferativa, y también valoró el efecto que tenía colocar la grapa extraperióstica vs subperióstica. De su estudio se deduce que la hemiepifisiodesis con grapa es un método de arresto

temporal del crecimiento, seguro y efectivo para controlar el crecimiento fisario de los huesos largos, pero de él también se deduce la importancia de no lesionar el periostio durante la colocación de las grapas, porque su lesión conlleva la aparición de puentes fisarios y una detención permanente del crecimiento.

Estudios recientes han mostrado que cuando la placa fisaria está sometida a un sistema de hemiepifisiodesis, ésta pierde altura, no solo debido a la disminución del número de condrocitos proliferativos, sino también a cambios en la morfología y en el volumen de los condrocitos hipertróficos. Estos cambios no ocurren de una manera uniforme a lo largo de la placa de crecimiento, y están relacionados no sólo con el tiempo de grapado, sino también con la distancia a la que se encuentra la fisis estudiada de la grapa²¹.

Todos estos cambios observados son reversibles siempre que la compresión ejercida no supere una cierta intensidad ni duración en el tiempo. La placa de crecimiento tiende a recobrar su arquitectura normal tal y como describieron Gelbke⁴⁹ y Aykut⁵⁵. La inhibición del crecimiento después de la compresión de la fisis es inversamente proporcional a la fuerza aplicada⁶⁹.

Con una frecuencia desconocida, especialmente en los casos después de una hemiepifisiodesis, la recuperación de la actividad normal fisaria puede estar asociada con el rebote del crecimiento. El *efecto rebote* consiste en un sobre crecimiento del lado en que se ha realizado la hemiepifisiodesis, y que aparece después de la retirada del material. La consecuencia clínica más importante es que puede conllevar a una pérdida de la corrección de la deformidad angular⁶⁵.

No existe una definición claramente establecida⁷⁰. Además este fenómeno no siempre aparece, y su incidencia exacta se desconoce, así como también se desconoce su etiología.

Por ello, se ha recomendado, esperar a una ligera hipercorrección antes de retirar el material de hemiepifisiodesis⁴⁵, y así compensar la pérdida de corrección. El problema principal de esta estrategia es que si el hiper-crecimiento no se produce, acabaremos con una deformidad contraria a la inicial. Aunque si bien es cierto, que en la mayoría de los casos se tratará de una deformidad moderada. Pero, no hay que olvidar que si transformamos una deformidad de valgo a varo, cada grado de varo, tiene un efecto mecánico equivalente a 4º de valgo.

En el humano, la incidencia del efecto rebote varía desde un rango de 10% al 50%^{60, 70, 71}, Burghardt⁶⁰ propone que los factores que podrían favorecer el efecto rebote estarían relacionados con la edad, localización anatómica de la fisis, y la etiología de la deformidad.

Las causas etiológicas del efecto Rebote, son desconocidas, Blount⁵¹ lo atribuyó a un mecanismo intrínseco al acto quirúrgico, secundario una hiperemia alrededor de la placa de crecimiento como respuesta a la agresión quirúrgica asociada a la retirada de la grapa. También puede ser debido a la alteración del flujo sanguíneo y metafisario⁷⁰. Sin embargo, en estudios previos^{60, 61, 64, 72, 73} se ha demostrado que el simple hecho de realizar la cirugía (cirugías control: donde se realiza el abordaje y las lesiones ósea a la colocación del material, pero sin finalmente realizar la cirugía de hemiepifisiodesis), no se asocia a una estimulación del crecimiento.

5. CONEJO BLANCO NUEVA ZELANDA

5.1. GENERALIDADES: ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La experimentación animal conlleva la utilización en la investigación de seres vivos, lo que nos debe llevar a una utilización racional, coherente, y ordenada de los mismos; evitando abusos y otorgándoles el adecuado trato. Utilización que viene regulada por el Real Decreto 53/2013, de 1 de Febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Por otro lado, la investigación debe ser un proceso riguroso y fiable, desarrollando una metodología científica concreta y detallada. Por ello, se deben escoger los aparatajes, materiales y técnicas más adecuadas, los reactivos y fármacos correctos, y el cronograma que sea más concreto y apropiado atendiendo al objetivo del estudio. Se tiene que hacer lo propio con el animal de experimentación seleccionado, debe ser el más adecuado al estudio a realizar. El cuidado y mantenimiento de los animales debe ser exquisito, manteniéndolos sanos, bien alimentados, alojados en el hábitat adecuado y con las condiciones ambientales propias para cada especie animal usada como modelo experimental o de docencia.

Se deben tener también en cuenta las particularidades concretas de cada especie animal, desde el punto de vista técnico (tamaño), anatómico (particularidades la estructura anatómica), fisiológico (adecuación fisiológica del experimento), económico (coste del animal) y legislativo. Los animales que no reúnan los requisitos necesarios para una investigación concreta no pueden ser utilizados, dado que la respuesta aportada tiene todas las probabilidades de no ser correcta y/o aportar datos no fiables. Las especies animales se adecuan al experimento a realizar dependiendo de condicionamientos técnicos (tamaño), anatómicos (particularidades la estructura anatómica que se estudia), fisiológicos (adecuación fisiológica del experimento), económicos (coste del animal).

La posibilidad de la existencia de alternativas al animal de laboratorio en la investigación biomédica, por desgracia, está muy limitada o no existe. Si se disponen de métodos complementarios o alternativos que puedan colaborar en la utilización de un menor número de animales deben de ser utilizados, de hecho, se debe buscar un modelo que pueda sustituir los experimentos antes de decidir utilizar un modelo animal para la experimentación.

5.2. BIENESTAR ANIMAL

La historia de la especie humana ha estado estrechamente ligada a su relación con otros animales, esta relación se ha ido plasmando en un uso cada vez más diversificado de éstos. Con frecuencia y erróneamente se ha asociado el Bienestar animal al concepto de salud física, y teniendo en cuenta que la ausencia de salud física y mental tiene que ver directamente con el sufrimiento, se ha considerado el bienestar como sinónimo de éste. Sin embargo *bienestar animal* es un concepto bastante ambiguo y difícil de definir, por lo que el enfoque que expondré se centrará más que en una definición concreta, en una serie de aspectos como son: que el animal debe encontrarse en armonía con el medio, que debe gozar de salud física y mental y que se deben cubrir sus necesidades específicas. Los seres vivos estamos contruidos según las demandas de nuestro entorno, es decir estamos *adaptados* a nuestro medio. Vivimos en ambientes cambiantes y predecibles y a lo largo de la vida cualquier animal se encuentra con condiciones adversas que debe evitar a fin de mantener la homeostasis. Si esto no se consigue se produce una reducción real o potencial de la *eficacia biológica* del animal, en cuya situación éste sufrirá o se reducirá su bienestar. La presencia o ausencia de estrés se considera un indicador potencial del bienestar animal⁷⁴.

Según el ministerio de Ciencia e Innovación, (CSIC)⁷⁵ la supervisión de los animales debe realizarse mediante la valoración de ciertos parámetros indicativos del bienestar animales. Puesto que, dependiendo del procedimiento, el bienestar del animal puede verse comprometido de muy distintas maneras, a continuación se especifican los

parámetros "generales" comúnmente utilizados en la descripción del "estado de salud" de los animales de experimentación.

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor...
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos tales como respiración, temperatura, temblores...

5.3. LA EXTREMIDAD POSTERIOR DEL CONEJO

La estructura esquelética del conejo (Fig. 5.1) se puede dividir en dos partes principales: axial y apendicular⁷⁶. El esqueleto axial del conejo se refiere a la parte del esqueleto que se dispone en el eje axial del cuerpo del conejo y está formado por la cabeza, la columna vertebral y el esqueleto torácico. El esqueleto apendicular lo forman los dos pares de miembros (dos anteriores o torácicos y dos posteriores o pelvianos), que a modo de apéndices sobresalen del cuerpo del conejo e intervienen en el sostén y movimiento del cuerpo. Ambos pares son estructuralmente homólogos y para su estudio se pueden dividir en varios segmentos o regiones⁷⁶ (Fig. 5.2).

El primer segmento lo forma el llamado esqueleto zonal (zona esqueleto), constituido por aquellas estructuras óseas que funcionan como nexo de unión entre la columna vertebral y las extremidades. Genéricamente son conocidas como cinturas: la cintura torácica o escapular en el miembro anterior y formada por dos huesos a cada lado en el animal adulto (escápula y clavícula); en el miembro posterior es la cintura pélvica o abdominal y formada en el adulto por un único hueso de cada lado (el coxal)⁷⁶.

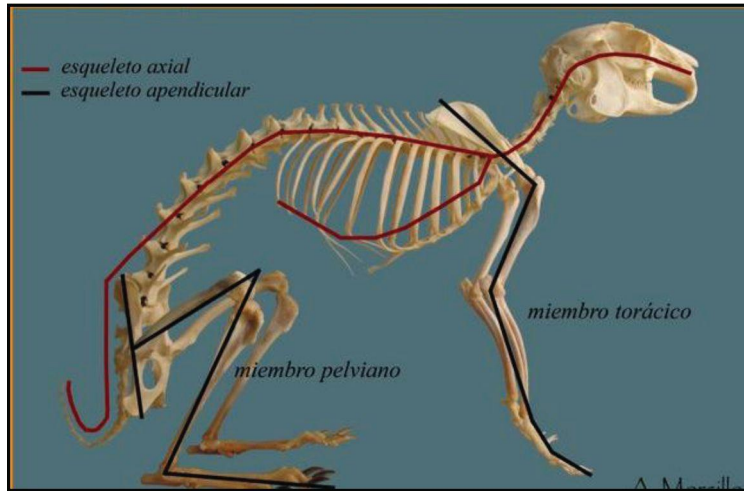


Fig.5.1. Conejo: Esqueleto del conejo donde se indica la parte axial (línea roja) y la apendicular (línea negra).

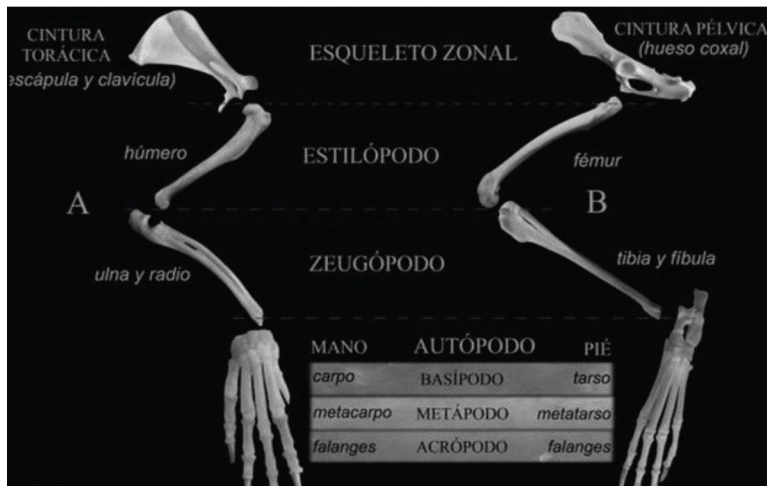


Fig.5.2. Conejo II: Esquema del esqueleto apendicular torácico (A) y pélvico (B) del conejo.

El esqueleto de las extremidades se divide en tres segmentos:(Fig. 5.2)

- ❖ El primer segmento, estilopodio, está formado por un único hueso largo. Siendo el húmero y fémur. Los huesos proximales de la extremidad anterior y posterior del animal.
- ❖ El segundo segmento, zeugopodio, está formado por un par de huesos largos que forman la base ósea de distal de la extremidad anterior, (cubito y radio) y la base ósea distal de la extremidad posterior (tibia y perone).
- ❖ El tercer segmento, autopodio, lo constituyen las estructuras óseas que dan forma a las estructuras más distales de las extremidades. y que de nuevo se divide en tres segmentos:
 - Basipodio: huesos que forman el carpo y el tarso.
 - Metapodio: huesos que forman los metacarpianos y el metatarsianos.
 - Acropodio: huesos que forman las falanges en la extremidad anterior y posterior.

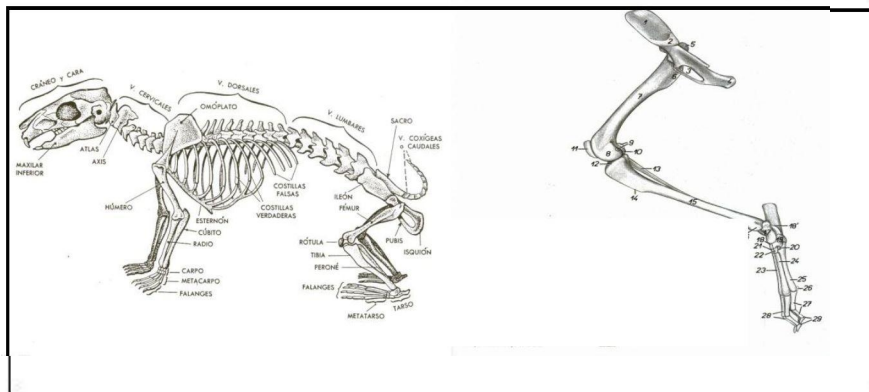


Fig. 5.3A -B: Conejo III: Esqueleto del conejo, y detalle de la pata posterior del conejo o esqueleto del miembro pelviano. Correspondiendo los números 1. Ilión, 7 fémur, 11. patela, 13. Perone, 15 .Tibia, 17. Astrágalo, 18. Calcáneo Extraído del Atlas d'anatomie du lapin. Extraído Barone et al⁷⁶

El esqueleto de los miembros posteriores, (Fig. 5.3 A-B) lo constituyen básicamente el ánimo pelviano y los huesos de las extremidades posteriores. La pelvis del conejo es alargada, y está compuesta por la fusión de tres núcleos óseos denominados íleon, isquion y pubis, fijados al cuerpo del sacro, con el cual se relacionan, a su vez, con la columna vertebral. El anillo pelviano constituye la base ósea del abdomen, insertándose en el mismo numerosos músculos. El conejo tiene además un rudimento óseo acetabular en la parte inferior del coxis⁷⁶.

El Fémur, es el hueso más largo y fuerte del conejo; en su extremo inferior se halla implantado en el cóndilo femoral y unido a éste mediante un ligamento grueso y resistente, articulación que se halla rodeada por una prolongación cartilaginosa. (Fig.5.4). En estrecha relación con la articulación de la rodilla, se forma un gran hueso sesamoideo (desarrollado sobre un tendón). La articulación de la rodilla del conejo, reúne las diferentes inserciones musculares que forman el cuádriceps en una sola, el tendón rotuliano. En su parte distal, el fémur se articula con la tibia mediante cartílagos de conjunción a modo de meniscos.

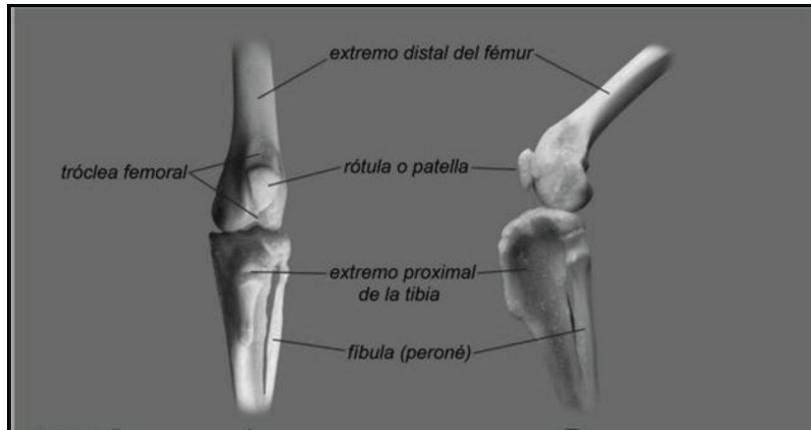


Fig.5.4. Conejo IV: Visión antero-posterior y lateral de la articulación de la rodilla del conejo

Al igual que en la anatomía de los animales corredores, en el segmento zeugopodo de la extremidad pelviana, existe una atrofia y/o fusión importante de la fibula (peroné) en relación a la tibia, que acaba completamente fusionada distalmente con esta última. En este caso, concreto del conejo, la articulación tibio-astragalina, es más

potente, y los dos maléolos forman parte del mismo conjunto óseo. Así, la tibia tiene en su extremo proximal dos superficies articulares o cóndilos (medial y lateral), separados por la eminencia intercondilar, y donde se articulan los cóndilos del fémur, mientras que distalmente. También tiene dos superficies articulares, una interna, para el astrágalo y otra externa para el calcáneo. (Fig.5.5).

La articulación del tarso está formada, por seis huesos de considerable tamaño, entre los que destacan el astrágalo y el calcáneo, el astrágalo, forma parte de la articulación del "tobillo" del conejo, y el calcáneo se caracteriza por tener fijo en él el tendón del musculo gastrocnemio (tendón de Aquiles).

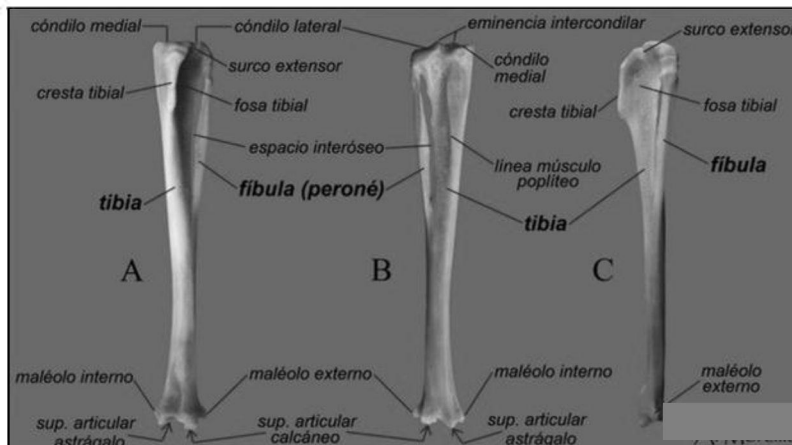


Fig.5.5. Conejo V: Visión anatómica craneal, caudal y lateral de la tibia y peroné del conejo.

La musculatura a nivel del fémur del conejo es de gran importancia para la movilidad del animal. A nivel de la tibia tiene como musculo más destacado, para la locomoción el gastrocnemio, su trayecto va desde la parte inferior y posterior del fémur, hasta la punta del calcáneo, junto con el tendón del soleo y del flexor de los dedos, forman el tendón Calcáneo común (tendón de Aquiles). El gastrocnemio, se divide en dos vientres: el lateral a nivel cóndilos laterales de la tibia y fémur, y el medial, a nivel del cóndilo medial del fémur y el hueso sesamoideo. El gastrocnemio, se extiende hasta el pie. Este musculo, da volumen a la pantorrilla de la pata del conejo. Los dos vientres

musculares, lateral y medial, se fusionan junto con las fibras tendinosas del musculo soleo, para insertarse a nivel del os calcáneo formando una banda tubular fibrosa muy potente, que será el tendón de Aquiles⁷⁶.

Capítulo segundo

**OBJETIVO, HIPOTESIS Y COMITE DE
ETICA.**

6.PROYECTO DE INVESTIGACION

6.1. OBJETIVOS

Las experiencias presentadas en esta memoria responden a los siguientes objetivos fundamentales

- ❖ Valorar la frecuencia e intensidad del crecimiento por rebote tras la hemiepifisiodesis
- ❖ Definir un modelo que sea trasladable al humano y permita evitar el crecimiento por rebote tras la realización de un arresto fisario temporal

6.2. HIPOTESIS

“La recuperación de la placa de crecimiento tras ser sometida a una epifisiodesis temporal, es un fenómeno complejo y los cambios asociados a ello se prolongan durante un tiempo hasta que la fisis recupera su aspecto normal”

La concepción de que tras la retirada de una epifisiodesis temporal el crecimiento se reanuda como si nada hubiera sucedido y que la placa empieza a crecer de nuevo, e inmediatamente recupera su morfología y grosor normal, nos parece simplista y poco probable. A pesar de que los sistemas de epifisiodesis y hemiepifisiodesis son conocidos desde hace más de 50 años, siguen existiendo aspectos sobre ellos que son totalmente desconocidos.

6.3. EL PORQUÉ DEL PROYECTO

Las deformidades angulares de los miembros inferiores (Varo/Valgo) cuando son severas pueden provocar cargas asimétricas sobre las articulaciones, especialmente sobre la rodilla resultando en una degeneración artrosica precoz⁶². El tratamiento de

estas deformidades consiste en una osteotomía de realineación, sin embargo en el niño en crecimiento y en el adolescente es posible la corrección de la deformidad mediante la práctica de una hemiepifisiodesis de la placa de crecimiento⁵⁹.

La técnica de hemiepifisiodesis consiste en frenar el crecimiento de la fisis (o placa de crecimiento) de forma asimétrica, de manera que el crecimiento es detenido en uno de los lados de la fisis mientras continua sin alteración en el lado contrario (externo/interno), este crecimiento asimétrico podría resultar en la corrección del eje de alineación del miembro⁵⁹.

La técnica de hemiepifisiodesis puede ser definitiva o temporal, en la forma definitiva la fisis se lesiona de manera irreversible, mientras que en el cierre temporal lo que se provoca es una fuerza de compresión en un lado de la placa de crecimiento lo que inhibe el crecimiento en ese lado, permitiendo que una vez se retire la fuerza compresiva la placa reasuma el crecimiento.

Aparte de los problemas técnicos asociados con el material de fijación en la hemiepifisiodesis, como aflojamiento o extrusión, uno de los problemas más importantes es el del crecimiento por rebote. Se define "crecimiento de rebote, efecto o fenómeno de rebote"^{77,78}, como el crecimiento que aparece inmediatamente después de la retirada del sistema de fijación y que provoca que parte de la corrección obtenida se pierda. Algunos autores la definen como la pérdida de más del 20% de corrección o el aumento de más de 3º-5º de angulación^{45,79}. No existe una definición clara del concepto, de su incidencia y mucho menos de su fisiopatología.

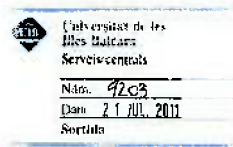
Revisando la literatura, la incidencia del efecto rebote varía desde un 10% hasta una incidencia superior al 50%^{70, 71, 80}. La intensidad del rebote parece estar relacionada con factores tales como la edad del paciente y la etiología de la deformidad, y también parece influir la localización anatómica de la deformidad⁸¹.

6.4. COMITÉ DE ETICA

Para la realización de este trabajo se utilizaron como animales de experimentación 22 conejos hembra blancos de Nueva Zelanda, mantenidos en el servicio de Estabulario de la Universitat de les Illes Balears. Durante el proceso de manipulación

de animales, se cumplieron en todos sus extremos el Real Decreto 53/2013 del 1 de Febrero y la Directiva Europea 86/609/CEE sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.

De conformidad con el art. 3 letra a) del Acuerdo Normativo del 23 de Julio se ha evaluado la idoneidad del protocolo en relación con los objetivos de estudio y de su eficiencia científica. Por todo lo anterior y previa deliberación, la Comisión de Bioética en fecha de 18 de julio de 2011, decidió por unanimidad de sus miembros presentes informar favorablemente el proyecto de investigación.



Informe de la Comisión de Bioética relativo al proyecto de investigación titulado *¿Es El Crecimiento Por Rebote Tras Hemiepifisiodesis Evitable?*, cuyo investigador principal es el Dr. Ignaci Sanpera Trigueros.

Vista la documentación presentada a esta Comisión por el Dr. Ignaci Sanpera Trigueros.

Visto el Acuerdo Normativo de 23 de julio de 2001, por el que se crea la Comisión de Bioética de la *Universitat de Les Illes Balears* (FOU núm. 194), modificado por los acuerdos normativos de 26 de julio de 2005 (FOU núm. 254) y de 3 de mayo de 2006 (FOU núm. 266);

De conformidad con el art. 3. letra a), del Acuerdo Normativo de 23 de julio, la Comisión ha revisado el proyecto de investigación desde el punto de vista ético y jurídico.

De conformidad con el art. 3. letra b), del Acuerdo Normativo de 23 de julio se ha evaluado la idoneidad del protocolo en relación con los objetivos de estudio y su eficiencia científica.

Por todo lo anterior, y previa deliberación, la Comisión de Bioética, en fecha 18 de julio de 2011, decidió por unanimidad de sus miembros presentes.

Informar favorablemente el proyecto de investigación titulado *¿Es El Crecimiento Por Rebote Tras Hemiepifisiodesis Evitable?*, cuyo investigador principal es el Dr. Ignaci Sanpera Trigueros.

Palma, 19 de julio de 2011

Pedro Grimalt Servera
Secretario de la Comisión de Bioética

Capítulo tercero

DISEÑO EXPERIMENTAL. MATERIAL Y METODOS

7.DISEÑO EXPERIMENTAL (MATERIAL /METODOS)

7.1. INTRODUCCION AL DISEÑO EXPERIMENTAL.

En base a los objetivos se estableció un diseño experimental con la finalidad de estudiar la intensidad del crecimiento por rebote tras la hemiepifisiodesis.

El trabajo experimental se realizó en el Servicio de Experimentación Animal del Estabulario de la Universitat de les Illes Balears y se contó con la aprobación del Comisión de Bioética de la Universitat de les Illes Balears en base al decreto del 26 de Julio de 2005 (FOU núm. 254) y del 3 de mayo de 2006 (FOU núm. 266)

Para el estudio se utilizaron conejos de Nueva Zelanda, de 6 semanas de edad, que se mantuvieron 1 semana en la sala de aclimatación del Estabulario, previo a la cirugía. Todos los conejos a su llegada, fueron marcados con rotulador indeleble en la oreja con marcación de números arábigos del 1 en adelante y pesados, realizándose control de peso semanalmente.

El número de animales utilizados en este estudio fue tomado teniendo en cuenta que éste es un estudio piloto, en busca de la presencia de efecto rebote después de la hemiepifisiodesis, fenómeno con incidencia desconocida. Como no existían datos sobre los cambios histológicos después de la hemiepifisiodesis, se decidió de manera arbitraria determinar 4 puntos de corte en el tiempo: 3 días, 1 semana, 2 semanas y 3 semanas post-hemiepifisiodesis. Basándonos, en estudios previos en la literatura^{21,29}, se consideró que tres controles histológicos para cada punto de corte serían suficientes para la comparación histológica.

En el diseño del estudio se decidió que cada grupo incluiría cinco conejos, excepto el grupo de las 3 semanas, que estaría formado por siete conejos (de esa manera se contaría con suficiente número de animales al final del experimento). Y que dentro de cada grupo a tres conejos se les realizaría la cirugía de manera unilateral, usando la pata contra-lateral como control, y a los dos conejos restantes de cada grupo se les realizaría la cirugía de manera bilateral, aumentando así el número de tibias "patológicas". Así de esta manera, las patas traseras de los conejos, fueron

aleatoriamente escogidas para formar parte de un grupo control (tibias no sometidas a cirugía) o grupo de hemiepifisiodesis, según un esquema previamente planificado.

La cirugía consistía en la realización de una hemiepifisiodesis en la zona proximal y medial de la tibia, usando un placa extra-perióstica sin bloquear con dos agujeros, y dos tornillos, (Normed®, Tuttlingen, Germany) muy semejante al sistema utilizado en humanos(Fig.7.1). Los tornillos tienen la capacidad para divergir hasta 30°, actuando así como una banda de tensión conteniendo la fisis.

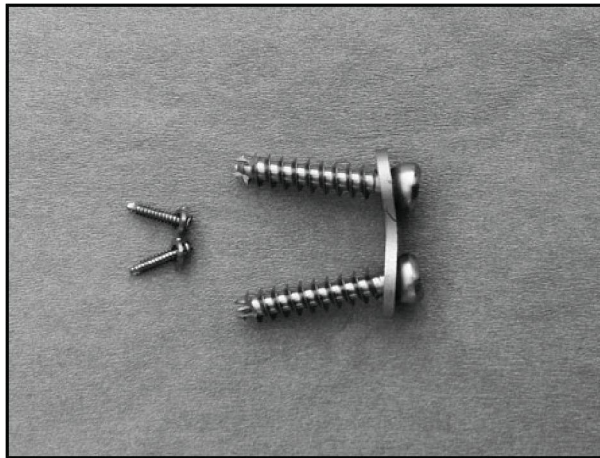


Fig. 7.1. Placa en 8: la imagen muestra el tamaño de placa en 8 original, a la derecha de la imagen, y el dispositivo utilizado en el trabajo experimental, a la izquierda. Extraído del Raluy et al⁶¹

El material se retiró a las 3 semanas de la cirugía, y los animales fueron sacrificados a intervalos que van desde los 3 días a las 3 semanas desde la retirada del implante. A todos los conejos, previo el sacrificio, 1 hora antes se les inyectó Bromoxiuridina (BrdU) intra-abdominal.

En la Tabla 7.1 se observan los grupos de los conejos, y la cirugía que se ha realizado a cada conejo según el grupo al que pertenecían.

Conejos	1era Cirugía Tibia Derecha	1era Cirugía Tibia Izquierda	2nda Cirugía Tibia Derecha	2nda Cirugía Tibia izquierda	Momento Eutanasia Según Grupo
Conejo 1	Placa 8		EMO		3días Grupo 1 (G1)
Conejo 2	Placa 8	-	EMO	-	3días Grupo 1 (G1)
Conejo 3	Placa 8	Placa 8	EMO	EMO	3días Grupo 1 (G1)
Conejo 4	Placa 8	-	EMO	-	3días Grupo 1 (G1)
Conejo 5	Placa 8	Placa 8	EMO	EMO	3días Grupo 1 (G1)
Conejo 6	-	Placa 8	-	EMO	1 semana Grupo 2 (G2)
Conejo 7	Placa 8	-	EMO	-	1 semana Grupo 2 (G2)
Conejo 8	Placa 8	-	EMO	EMO	1 semana Grupo 2 (G2)
Conejo 9	Placa 8	Placa 8	EMO	EMO	1 semana Grupo 2 (G2)
Conejo 10	Placa 8	Placa 8		EMO	1 semana Grupo 2 (G2)
Conejo 11	Placa 8	Placa 8	EMO	EMO	2 semanas Grupo 3 (G3)
Conejo 12	Placa 8	Placa 8		EMO	2 semanas Grupo 3 (G3)
Conejo 13	Placa 8	-	EMO	-	2 semanas Grupo 3 (G3)
Conejo 14	Placa 8		EMO		2 semanas Grupo 3 (G3)
Conejo 15	Placa 8		-	EMO	2 semanas Grupo 3 (G3)
Conejo 16	Placa 8	-	EMO	-	3 semanas Grupo 4 (G4)
Conejo 17	Placa 8	Placa 8	EMO	EMO	3 semanas Grupo 4 (G4)
Conejo 18	Placa 8	Placa 8	EMO	EMO	3 semanas Grupo 4 (G4)
Conejo 19	Placa 8	Placa 8	EMO	EMO	3 semanas Grupo 4 (G4)
Conejo 20	Placa 8	Placa 8	EMO	EMO	3 semanas Grupo 4 (G4)
Conejo 21	Placa 8		EMO		3 semanas Grupo 4 (G4)
Conejo 22	Placa 8	-	EMO	-	3 semanas Grupo 4 (G4)

Tabla 7.1: Conejos-Cirugía-Grupo: Cirugías realizadas en cada conejo y el grupo experimental al que pertenecían, diferenciado en la tabla por colores según grupo. Todos los grupos (G1,G2,G3) estaban formado por 3 patas control y 7 operadas, el grupo 4 (G4) está formado por 3 patas control y 11 patas operadas.

7.2.ANIMAL DE EXPERIMENTACION.

7.2.1. CONEJO BLANCO NUEVA ZELANDA

El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de raza Nueva Zelanda blanco, es un animal muy utilizado en experimentación animal.

Se han utilizado 22 Conejos Nueva Zelanda hembras, (White New Zealand Rabbits, WNZR) con una media de 1,36 kilogramos de peso, para un total de 44 extremidades posteriores estudiadas (tanto derechas como izquierdas). Se han dividido en 4 grupos experimentales.

Los animales, fueron suministrados por Charles River laboratorios (L'Arbresle, France) y trasladados al Estabulario, sito en la Universitat de les Illes Balears. Pasaron los controles pertinentes realizados por la Veterinaria del Estabulario. El Estabulario mantiene la normativa de aislamiento Specific Pathogen Free⁸² (SPF).

Los animales fueron alojados en las instalaciones de la Unidad de Estabulario de la Universitat de les Illes Balears (Palma de Mallorca), en una sala para 8 conejos en jaulas individuales. Las jaulas usadas estaban construidas de acero inoxidable (material inalterable por el animal, y no tóxico), de limpieza y desinfección sencilla. Disponían de un aplicador tanto para la alimentación como para la bebida (Fig. 7.2).



Fig. 7.2. Conejo VII: Imagen del conejo en la jaula individual. Cada jaula tenía agua y alimento para el conejo, y estaban correctamente numeradas.

Para la alimentación de los conejos se utilizó en una dieta Global Diet 2030 de Harlan (Interfauna Ibérica, Spain), con suministro "*ad libitum*" de agua corriente del grifo (pasada por un descalcificador).

La alimentación de los animales es uno de los factores importantes a considerar en experimentación animal, por varios motivos:

- ❖ Condiciona el estado nutricional de los animales.
- ❖ Una alimentación incompleta puede provocar la aparición de enfermedades en los animales.
- ❖ Una alimentación que contenga determinados fármacos o productos puede alterar los resultados de la investigación.

Los conejos se mantuvieron durante todo el estudio, libres dentro de las jaulas, sin ningún tipo de inmovilización. El cuidado de los animales fue supervisado por la veterinaria del Estabulario.

El animalario se mantuvo a una temperatura que osciló entre 18º y 22ºC, con una humedad relativa del 40%-60%, con aire acondicionado exterior climatizado y filtrado, detector de incendios, ruidos de poca intensidad, y ciclos de luz oscuridad, de 12 horas de luz y 12 de oscuridad en horario de 08:00 h a 20:00 h del periodo de luz.

Los conejos son animales sumamente dóciles, que fácilmente acceden a la manipulación, deben sujetarse con una técnica adecuada. Los conejos poseen una piel sumamente elástica en la espalda y de ella se debe sujetar. Es importante tomar suficiente piel utilizando toda la mano. (técnica adecuada para conejos de uno a dos y medio kg). (Fig.7.3)



Fig. 7.3. Conejo VIII: Modo de coger al animal, acercándose al pecho para que se sienta seguro y tranquilo

7.2.2. EL PORQUÉ DE ESTE MODELO EXPERIMENTAL

El fémur y la tibia de los conejos blancos de Nueva Zelanda han sido utilizados en multitud de experimentos en investigación sobre el crecimiento y las alteraciones del mismo. Es un modelo barato, fácil de criar, transportar, el abordaje de la fisis de la tibia proximal, es relativamente sencillo, nos aporta un modelo animal, cuyo método quirúrgico es fácilmente reproducible.

En orden a disminuir la variabilidad del estudio, se decidió unificar a los animales no solo para edad sino también para sexo, ya que la velocidad y picos de crecimiento son diferentes, en nuestro caso se eligió un modelo con conejo hembra.

La placa de crecimiento (fisis) y el tiempo de cierre de la misma, no son uniformes y varía según la especie. Es importante reconocer las diferencias entre especies para elegir el modelo animal para el estudio experimental. Según el artículo de Kilborn *et al*⁸³, si comparamos humanos con primates no humanos, vacas u ovejas, estos son considerados adultos a la edad de cierre de placa de crecimiento, en cambio, conejos, perros, gatos se les describe como adultos jóvenes cuando la placa de crecimiento se cierra. Esta información es importante para estimar la edad a la que el modelo animal detiene el crecimiento, y para calcular la duración del crecimiento óseo mientras dure el estudio.

La pubertad de los conejos se alcanza entre las 10-12 semanas de vida, a los 9 semanas asemeja a 5-6 años de edad en un humano, y el cierre fisario se alcanza entre a las 22-28 semanas^{84,85}.

El crecimiento longitudinal de la tibia del conejo sigue la siguiente ecuación:

$$x_0 = 15,99 + 0,9051 \times \text{edad} - 0,002456 \times \text{edad}^2$$

Basado en el estudio de Heikel *et al*⁸⁴. Si comparamos el desarrollo del esqueleto humano con el del conejo, se puede resumir que el conejo envejece tanto en 1 día como un hombre en 40 días. Según la tabla en la que Heikel *et al*⁸⁴ compara la edad de fusión de las líneas epifisarias en el hombre y en el conejo, la edad de cierre de la tibia proximal en el hombre está en un rango de 6205- 8760 días, (que equivale a 17-24 años) y la del conejo entre 150- 225 días. Similares estudios fueron realizados por Massoud⁸⁵.

Esta velocidad de crecimiento elevada y la estructura y morfología similares de la placa de crecimiento del humano y el conejo, es lo que hace atractivo este modelo experimental, ya que nos permite observar en un plazo relativamente corto de tiempo, lo que en humanos precisaríamos años para observar. Sin embargo no podemos olvidar que este modelo experimental también tiene limitaciones, como son las diferencias en peso y sollicitaciones mecánicas de las articulaciones o el diferente ritmo de crecimiento que puede hacer que las respuestas observadas no sean directamente extrapolables.

La elección de la tibia se basa en que la fisis en la tibia proximal es la más plana y la más rectilínea de las fisis en el conejo, lo que facilita el abordaje y la identificación en radiografías y la manipulación. Las fisis, adyacentes a la rodilla (fémur distal y tibia proximal) son las de crecimiento más rápido, contribuyendo más a la longitud de la extremidad. Esto hace que sean el punto ideal para el ensayo de los modelos de deformidades⁷⁶.

7.3. MEDICACION UTILIZADA

7.3.1. ANESTESIA

Los conejos han sido anestesiados con una solución compuesta por Ketamina (Imalgene® 1000, Merial Lyon, France), 35 mg /kg y Xilacina (Xilagesic 1%®, Calien Barcelona, Spain) a dosis de 5mg /kg, en una misma jeringuilla de 10 mililitros, a nivel del vasto lateral del cuádriceps.(Fig.7.4)

La Ketamina es un hipnótico disociativo de acción rápida, con potente acción analgésica. Produce sus efectos conservando algunos reflejos y no produce depresión respiratoria, es de recuperación relativamente lenta. En los humanos se asocia hasta en una 12% con alucinaciones y delirios, sin embargo es un anestésico muy utilizado en veterinaria.

La Xilacina al 2%, tiene acción tranquilizante, analgésica, anestésica y relajante muscular. Es un potente sedante, miorelajante y analgésico no narcótico. La actividad sedante y analgésica se relaciona con una depresión del sistema nervioso central. El efecto relajante muscular está basado en la inhibición de la transmisión intraneural de los impulsos en el sistema nervioso central; los efectos principales se desarrollan dentro de los 10 a 15 minutos después de la inyección intramuscular y dentro de los 3 a 5 minutos después de la inyección endovenosa.

Además adicionalmente se añadió a la anestesia intramuscular, anestesia local subcutánea de Mepivacaína 1%(Mepivacina normon® Normon, Madrid, Spain), a nivel de la incisión quirúrgica, previo al comienzo de la misma tanto de la primera como de la segunda cirugía.

Mepivacaína 1% es un anestésico local de inicio de acción rápido y duración intermedia. La Mepivacaína pertenece al tipo amida, con propiedades similares a la lidocaína. La ventaja es que provoca una suave y benigna vasoconstricción que permite reducir los niveles del anestésico o eliminar los vasoconstrictores, se une a las proteínas de la membrana en 75%, lo que determina su razonable duración de acción. El mecanismo de acción es bloqueando la propagación del impulso nervioso, impidiendo la entrada de iones de sodio a través de la membrana nerviosa.



Fig.7.4. Medicación: Material de anestesia y antibiótico utilizado para los procedimientos quirúrgicos realizados en conejos.

7.3.2. ANTIBIOTICO

Se administró de manera profiláctica, previa a la intervención una dosis de cefazolina 1gr(Kurgan® Normon, Madrid, España) de 50mg/ kg vía intramuscular en la pata contra lateral a la utilizada para la anestesia.

La cefazolina es un antibiótico del grupo de las cefalosporinas de primera generación. Se administra de forma parenteral bien por inyección intramuscular, o bien en infusión intravenosa. Es el antibiótico preferido entre las cefazolinás de primera generación por su mayor vida media, alcanza mayores niveles de concentración y tiene menor nefrotoxicidad que las otras. Es el estándar en profilaxis quirúrgica especialmente por su buena actividad frente a St. Aureus meticilin sensible. Tiene una mayor sensibilidad a β -lactamasas estafilocócicas. La concentración inhibitoria mínima (CIM) para cocos gram positivos sensibles es de 0,1 a 1 μ g/ml. Es por ello que lo utilizamos como cobertura antibiótica, tiene un amplio espectro para los *St. Aureus*, presente en la piel, y una buena cobertura para los gram negativos.

7.3.3. ANALGESIA

Previo a la intervención quirúrgica, se administró una solución de meloxicam (Metacam® Boehringer Ingelheim Vetmedica Missouri USA)mezclada con el agua de

beber que se inicia 24 horas antes de los procedimientos, y se mantuvo un mínimo de 72 horas post intervención. Después de las primeras 72 horas, se administró la analgesia según protocolo de supervisión.

El meloxicam es un fármaco inhibidor de la ciclooxigenasa, del grupo de los antiinflamatorios no esteroideos. El meloxicam inhibe la ciclooxigenasa(COX), la enzima responsable de convertir el ácido paraquinoico en prostaglandina H₂, el primer paso en la síntesis de prostaglandinas, el cual es un mediador en la inflamación. El meloxicam ha demostrado ser un inhibidor selectivo, a dosis bajas terapéuticas de los COX-1 y COX-2. Indicado en dolor moderado de origen musculo esquelético y eficaz en el dolor postoperatorio. Ampliamente utilizado en veterinaria.

7.3.4. PENTOBARBITAL SÓDICO

Para la eutanasia química se utilizó Pentobarbital (Dolethal® solución inyectable Vetequinol, Cedex France) a una dosis de dosis de 100mg /kg.

El pentobarbital sódico, solución inyectable es un compuesto derivado del ácido barbitúrico, de acción corta, y margen terapéutico estrecho, cuyo principal efecto es deprimir el sistema nervioso central debido a una disminución en el consumo de oxígeno por el cerebro. Aunque su mecanismo de acción aún no está del todo aclarado, se le considera un agente GABA-mimético. A dosis altas, produce depresión respiratoria y miocárdica y también del sistema nervioso central y finalmente shock.

El pentobarbital sódico, fue inyectado por vía intravenosa, a nivel de la vena marginal de la oreja del conejo. Tras la administración intravenosa, permanece en sangre en concentraciones detectables durante unos minutos, hasta que rápidamente es captado por los tejidos de todo el organismo. Es el agente más aceptable para el sacrificio de los conejos.

7.3.5. TINCIONES

7.3.5.1. 5'-Bromo-2'Deoxyuridine (BrdU)

Una hora previa a la eutanasia se administró de forma intraperitoneal, una dosis de Bromodeoxyuridine (BrdU) (Bromodeoxyuridine® Sigma-Chemical Co, St. Louis MO, USA), 40 mg/Kg.

La 5-Bromo-2'-Deoxyuridine, es un análogo bromado de Tiamina(Fig.7.5). La BrdU, se incorpora selectivamente en el ADN celular en la fase S del ciclo celular. El uso de BrdU, como análogo de Tiamina, ha hecho posible la identificación de la síntesis de ADN en las suspensiones de células, frotis de células, y las secciones de tejido. La aplicación de anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con BrdU para la detección de la replicación del ADN en células linfoides y otras preparaciones normales o patológicas^{15, 24, 86,87}.

Se incorpora,*in vivo*, mediante la inyección de 10-100mg / kg a 10mg/ml en solución salina. Se incorpora en las células de médula ósea en cultivo a una concentración final de 10 mM a 37°C durante 1 hora.

El método de preparación utilizado con la BrdU, fue el siguiente, se disolvió el preparado en una concentración 100mg/ml disuelta en suero salino, según el peso los conejos al momento del sacrificio, y se introdujo en un tubo de Eppendorf. Posteriormente, se congela a una temperatura de -20°C. Previa a la inyección intraperitoneal en el conejo, se descongeló.

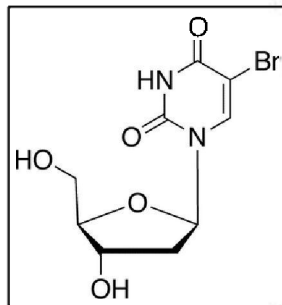


Fig.7.5. BrdU: Esquema de la molécula de 5'-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU).

7.3.5.2. OXITETRACICLINA

Se le administró una inyección de oxitetraciclina,(Terramicina® Pfizer Cedex France) 24 horas antes del sacrificio, a dosis de 5 mg/Kg vía intraperitoneal.

La oxitetraciclina es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro, efectivo contra bacterias grampositivas (Actinomycespp, Bacillusanthracis, Clostridium spp, Corynebacterium spp, Erysipelothrixrhusiopathiae, Listeria spp. Staphylococcuspp.,

Streptococcuspp.) Ygram negativas (Actinobacilluspp., Bordetellaspp., Brucellaspp., Campylobacterspp).

Su uso durante el desarrollo dentario en la lactancia puede causar coloración permanente de los dientes, por lo que se utiliza como marcador aprovechando su capacidad de tinción, por su tendencia a unirse al hueso en crecimiento^{88,89}, en zonas del hueso y en las uñas, e interfieren en el crecimiento del hueso cuando se administran a dosis terapéuticas en niños de corta edad o en mujeres embarazadas.

7.3.5.3. HEMATOXILINA EOSINA

La tinción hematoxilina-eosina corresponde a la mezcla de hematoxilina y eosina. La tinción hematoxilina y eosina es uno de los métodos más populares de tinción utilizado en histología y medicina diagnóstica.

El método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y el uso de eosina que tiñe componentes básicos (acidófilas) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma

7.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Previa a la cirugía, el cirujano realizó una preparación apropiada, que incluye, lavado quirúrgico de manos, uso de ropa esterilizada, mascara, y bata quirúrgica, así como guantes estériles.

A todos los conejos se les aplicó la misma técnica de preparación pre-quirúrgica, de inducción anestésica, tanto en la primera como en la segunda cirugía.

7.4.1. PREPARACIÓN QUIRURGICA

Con el conejo anestesiado, y tras haberle administrado la dosis profiláctica de antibiótico (Cefazolina), se procedió al rasurado del animal, mediante una rasuradora (Aesculap Braun®Spain). Es importante evitar dañar la piel del animal, para evitar infecciones. Esta técnica de rasurado, se realizó previa a la cirugía tanto de colocación del implante, como antes de la cirugía de retirada del material.

7.4.2. TÉCNICA QUIRURGICA

7.4.2.1. PRIMERA CIRUGIA. COLOCACION MATERIAL DE HEMI-EPIFISIODESIS.

Una vez rasurada la pata, se colocó al conejo en decúbito supino sobre una manta térmica para mantener la temperatura del animal durante el procedimiento. Posteriormente, se preparó la pata trasera del conejo con solución del povidona yodada, y se cubrió con un campo estéril desechable.

Se realiza una infiltración de anestésico local (Mepivacaína al 1%), en la zona de incisión quirúrgica, produciéndose un habón. (Fig.7.6)El abordaje se realiza por una incisión medial, centrada en la tibia proximal (Fig.7.7), tras la apertura de la fascia se localiza macroscópicamente la fisis.

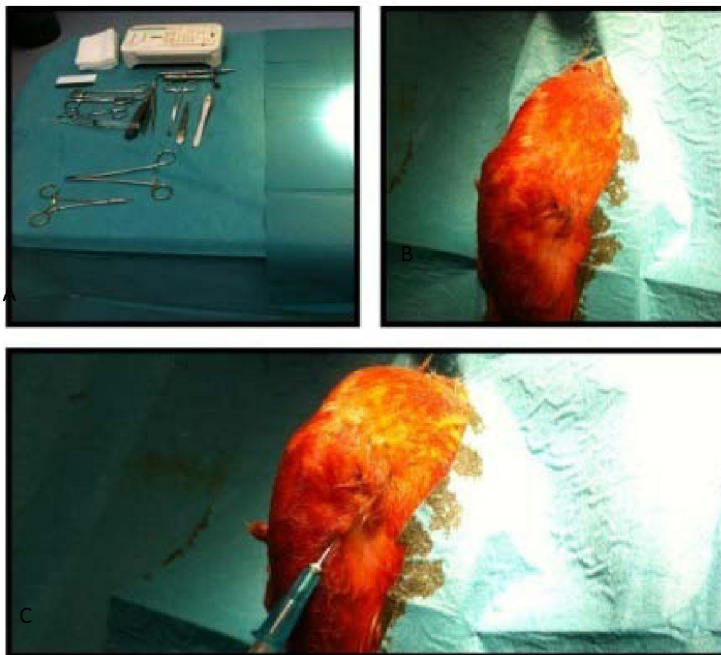


Fig.7.6.Cirugía: En la imagen se muestra la mesa quirúrgica, preparación del campo con paños estériles desechables, e infiltración anestésica.



Fig.7.7. Cirugía II .Abordaje quirúrgico por incisión medial centrada en la tibia proximal del conejo.

Sin dañar el periostio, se insertó una placa de titanio en 8 de dos agujeros, sobre la fisis, quedando esta centrada en el plano sagital para evitar deformidades. Se finalizó la hemiepifisiodesis fijando la placa con dos tornillos de 1,5 mm de diámetro (Normed®, Tuttlingen, Germany) cada uno de ellos colocado a un lado de la fisis, de manera que la placa puentee la fisis. (Fig.7.8) Los tornillos se colocaron de manera divergentes para evitar dañar la fisis durante la cirugía. Es importante que durante el proceso el periostio y pericondrio sean preservados.

Para realizar la epifisiodesis con la placa en 8, las placas fueron previamente conformadas para adaptarse al hueso. (Fig.7.9). Al finalizar la colocación del material de hemiepifisiodesis, se realizó lavado de la pata con suero estéril y se procedió al cierre con Trofilene 4/0 (Lorca Marin® Murcia, España), sutura monofilamento de polivinil difluoretileno (PVDF) reabsorbible. Posteriormente se colocó un vendaje con apósito estéril transparente resistente al agua (Tegaderm 3M® CA, USA)

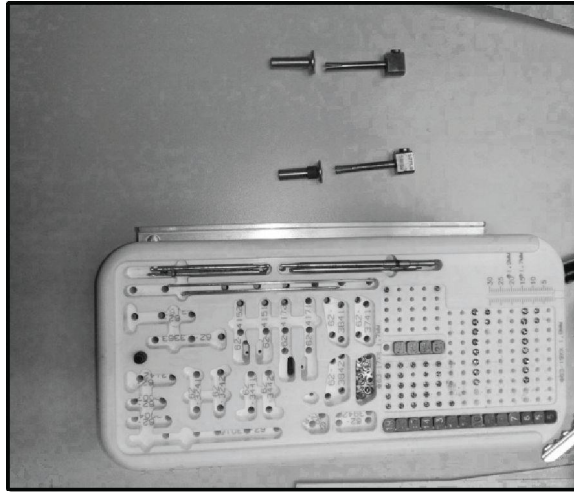


Fig.7.8.Cirugía III: Caja de instrumental específico para animal de experimentación que incluye placa en 8, tornillos y destornilladores

El procedimiento finalizó o bien se realizó el mismo proceso en la pata contra lateral según fuera un conejo con cirugía uni o bilateral.

Durante la intervención se monitorizó la respiración, se mantuvo la hidratación de los ojo, con una solución salina de suero fisiológico. Y en caso de detectarse cambios en el ritmo respiratorio o inicio movimientos se repitió la dosis anestésica.

Posteriormente a la cirugía y aún con el animal anestesiado, se realizaron las radiografías de control, para comprobar la correcta posición de las placas, y el animal pasa al área de despertar, una zona acondicionada, con una mesa acolchada, con un foco de calor, que mantuvo la temperatura, hasta que el animal se hubiese despertado y paso de nuevo a la jaula.

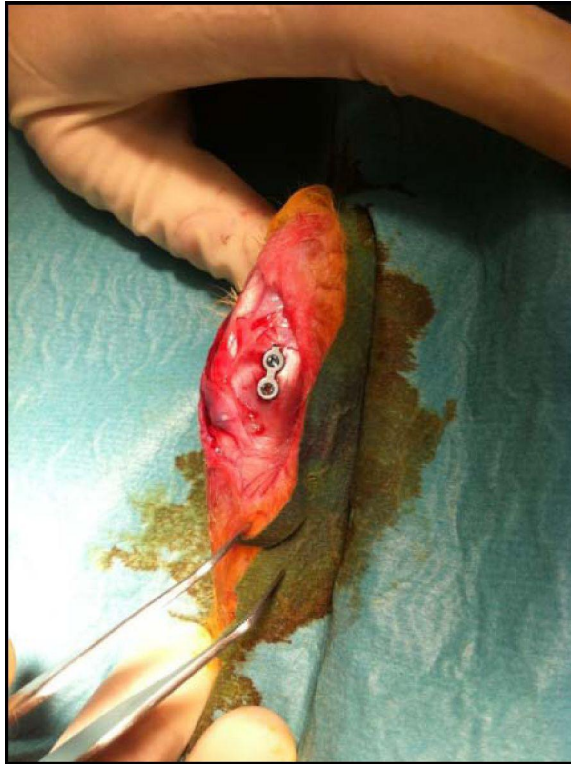


Fig. 7.9. Cirugía IV: .Detalle del proceso quirúrgico de hemiepifisiodesis con placa en 8 en pata de conejo.

7.4.2.2. SEGUNDA CIRUGIA. EXTRACCION MATERIAL DE HEMI-EPIFISIODESIS

A las tres semanas, para la realización de la extracción del material se siguieron exactamente los mismos pasos que la cirugía previa; anestesia, rasurado, preparación y abordaje a través de la misma incisión quirúrgica. El protocolo de profilaxis antibiótica fue modificado durante el estudio, añadiendo una dosis de cefazolina previa a la extracción del material.

Mediante el mismo abordaje se procedió a realizar la extracción del material de hemiepifisiodesis. Finalizada la intervención, se realizó el cierre por planos y se aplicó el apósito de plástico transparente. (Fig. 7.10)

Inmediatamente tras la cirugía, aún bajo la anestesia, se le practicó una radiografía de control y el animal paso a la zona de despertar, siguiendo la rutina previamente descrita.



Fig.7.10. Conejo IX:Detalle de la colocación de apósito de plástico estéril transparente y resistente al agua (Tegaderm®) en las patas intervenidas de un conejo.

7.4.2.3. CUIDADOS DURANTE LA CIRUGIA<< BIENESTAR ANIMAL>>

Durante la cirugía, y el postoperatorio, se monitorizó el bienestar del animal, mediante la aplicación de un protocolo de supervisión⁹⁰.

7.4.2.4. EUTANASIA

24 horas previas a la eutanasia, la veterinaria les inyectó una dosis de oxitetraciclina, a dosis de 5 mg/Kg vía intraperitoneal. En el mismo día de la eutanasia, una hora previa al sacrificio de los animales, se inyectó por vía intraabdominal, una dosis 40 mg/Kg. de BrdU, [5'-Bromo-2'-deoxyridina (BrdU, Sigma Chemical Co®, St. Louis, MO)] y el animal fue devuelto a su jaula durante el periodo de 1 hora, necesario para la fijación de la BrdU.

Para eliminar el efecto de la conocida variación diurna de la síntesis de ADN, todos los conejos fueron sacrificados a la misma hora del día.

Previo a la eutanasia, se procedió a anestesiarse al conejo, con la mezcla de Xilacina y Ketamina, a dosis previamente descrita. Posteriormente, se inyectó una dosis de Pentobarbital en la vena marginal de la oreja del conejo. Se preparó la oreja, previamente con un algodón impregnado en alcohol, se retiró el pelaje de la oreja del

conejo, y con una aguja fina, se inyectó la dosis de pentobarbital, a dosis previamente descritas(100mg/kg peso). (Fig.7.11)

La muerte del animal se confirmó, por la ausencia de latido cardíaco, de respiración y porque la pupila del ojo del animal, adquiriendo una coloración gris blanquecina.

La eutanasia se realizó de manera individual, en una sala alejada, del resto de los conejos.

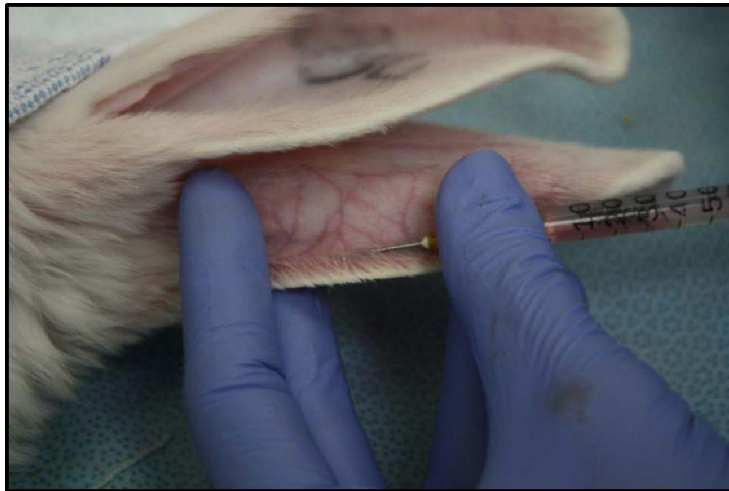


Fig.7.11. Conejo X: Detalle de la administración del pentobarbital en la vena marginal de la oreja del conejo anestesiado

Una vez el animal ha muerto se procedió a la disección de los miembros posteriores.(Fig.7.12).Las tibias se extrajeron cuidadosamente mediante una disección por planos y con especial cuidado de no dañar las piezas. Al finalizar la disección las tibias fueron medidas, tanto desde la meseta tibial interna hasta el maléolo interno, como desde la meseta tibial externa hasta el maléolo tibial externo con un pie de rey (Fig. 7.13 A-B). Las tibias fueron marcadas con una goma elástica radiopaca de silicona tipo vasseloop® (Medica Europe Ev, Netherlands), en la pata derecha. Para permitir la identificación del lado.

A continuación se realizó la radiografía Antero-posterior y lateral de las piezas, y posteriormente, se introdujeron en un bote, bien en formol o en alcohol, según protocolo. Cada bote fue rotulado con el número del conejo, y la fecha de extracción.



Fig.7.12. Conejo XI: Detalle de la disección de las piezas tras la eutanasia de los animales de experimentación en condiciones no estériles

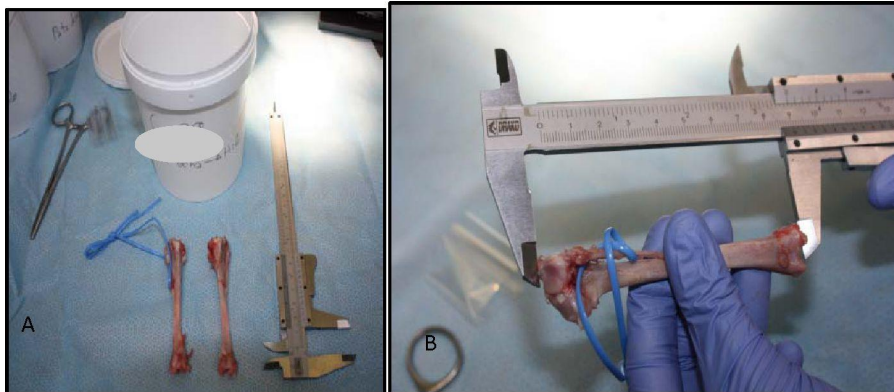


Fig.7.13A-B. Conejo XII:Detalle de las piezas óseas extraídas del conejo nº 20, pie de rey y bote para anatomía patológica. B: Detalle de la medición de la pieza desde la meseta tibial hasta la superficie articular de la tibia distal, la medición se realiza tanto desde el borde interno como desde el borde externo.

De acuerdo con un calendario prefijado, la eutanasia se realizó a distintos intervalos post-retirada de material, con sacrificio los 3 días, 1 semana, 2 semanas, y 3 semanas. Según con el momento de sacrificio, los animales fueron divididos en diferentes grupos A todos se les practicó la misma técnica de sacrificio.

7.5. TECNICA RADIOLOGICA

El estudio radiológico fue realizado en una de las salas contiguas al quirófano. Las instalaciones estaban supervisadas por el servicio balear de radio protección y el personal cumplía las normativas y precauciones correspondientes para este tipo de tareas.

Todas las radiografías se realizaron según técnica estandarizada, tanto en lo referente a la colocación del animal como a la distancia del emisor de rayos y las características del disparo. (Fig.7.14 A, B, C).

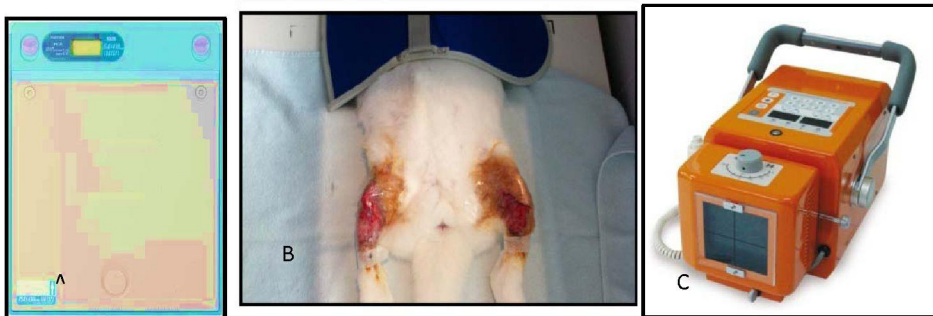


Fig.7.14 (A-B-C). Radiología: Imagen del chasis, de la colocación del animal sobre el chasis y aparato de rayos

Para el estudio se utilizó un aparato de rayos, unidad portable Orange 8016HF, de 40 - 80 kw, que posee un tubo de disparo focal, aparato de baja radiación diseñado para radiología veterinaria. Los Chasis utilizados fueron de la marca Fujifilm® (Tokio, Japón), tipo CC y soporte de imagen (IP) ST-VI que son los utilizados para exploraciones o exámenes de radiología simple.

Se realizaron dos tipos de proyecciones radiológicas, proyección anteroposterior (AP) de tibia y lateral de tibia. Para minimizar los errores secundarios a la colocación del animal se determinó una rutina. Para realizar la proyección anteroposterior, se colocó al conejo en decubito supino, envuelto en una toalla, dejando la pelvis y las extremidades inferiores libres, la proyección se realizó con las patas traseras en semiextensión, y con las rotulas mirando hacia el techo y con los tobillos también mirando al frente. (Fig 7.15) Se marcó la pata derecha del animal con un clip. Para la proyección lateral, se colocó al conejo en decubito lateral con la pata derecha pegada

al chasis manteniéndose en flexión marcada y la izquierda en semiextensión hacia atrás. (Fig 7.16)

En orden a validar la proyección obtenida en el caso de la AP solo se admitieron aquellas que en el estudio radiológico se observaba una proyección de frente de la tibia y a nivel de tobillo se podía observar la escotadura del tobillo perfectamente centrada (Fig.7.17). Para la proyección lateral la visión completa de la tuberosidad tibial fue considerada imprescindible. (Fig 7.16)



Fig. 7.15. Radiología II: Colocación del conejo para realizar la radiografía antero-posterior. Patas traseras en semi-extensión.



Fig .7.16. Radiología III: Radiografía lateral del conejo. Con la pata Derecha en flexión y la pata Izquierda hacia atrás. Marcación con clip pata Derecha.



Fig.7.17. Radiología IV:Radiografía anteroposterior del conejo operado. Se observa la V radiológica en la articulación tibioastragalina y el varo en la tibia derecha. Se incluye detalle del implante (placa en 8). D: derecha.

Se realizaron radiografías de manera seriada, siguiendo el protocolo previamente establecido:

- ❖ Después de la primera cirugía, Antero-posterior y lateral del conejo, marcando la pata derecha (D) con un clip.
- ❖ Semanalmente se realizaron radiografías Antero- posterior hasta la segunda cirugía
- ❖ Postoperatorio tras la extracción del material de osteosíntesis, se realizó radiografía antero-posterior
- ❖ Se realizaron radiografías antero posterior, semanalmente hasta la eutanasia.
- ❖ En el día de la eutanasia, se tomaron radiografías AP de la tibia, y Post mortem de las piezas del espécimen Antero-posterior y lateral marcando la pata derecha con un clip. (Fig7.18 A-B)

Las radiografías fueron realizadas en soporte digital. Una copia de todos los estudios fue almacenada en CD en formato DICOM para su posterior estudio. Para el estudio se utilizó el programa digital "Picture archiving and communication system" (PACS), que incluía herramientas para la medición de distancias y medición de ángulos.

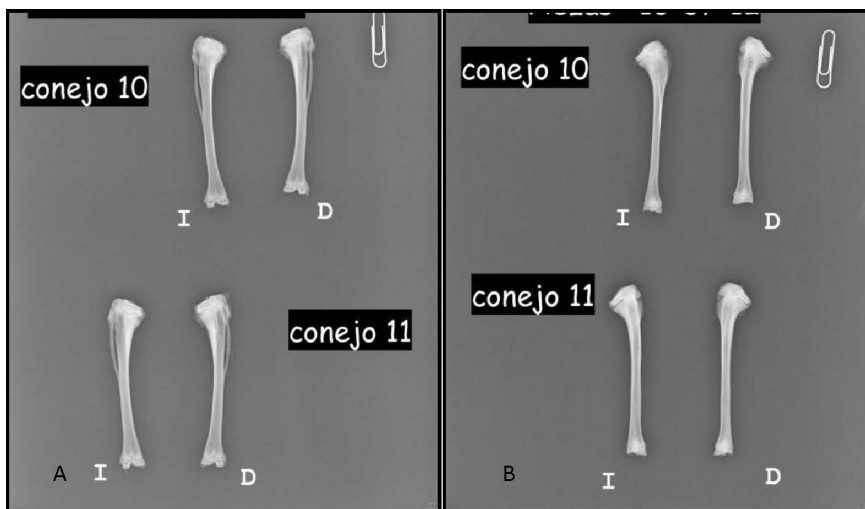


Fig. 7.18 (A-B). Radiología V: Ejemplos representativos de las radiografías antero-posteriores (A) y laterales (B) de las piezas extraídas de los especímenes realizadas tras los sacrificios. D: Derecha, I: Izquierda

7.6. ESTUDIO HISTOLOGICO.

Las muestras para estudio fueron remitidas al servicio de Anatomía Patológica del Hospital Son Espases, donde fueron procesadas. Las muestras eran fijadas en formaldehído al 4% durante 24-48 horas, decalcificada en ácido fórmico al 40%. Posteriormente, se realizaron cortes completos de 3 mm de grosor en la parte más ancha del platillo tibial. Estos cortes fueron incluidos en bloque de parafina. De los bloques se obtuvieron cortes histológicos de 4-5 micras que fueron teñidos con hematoxilina eosina según proceso estándar. El estudio histológico se realizó con un microscopio óptico Olympus Bx14.

Para el estudio histológico, se utilizó la zona de máximo diámetro en el plano coronal de la epífisis tibial proximal. Para el estudio y análisis de los cambios de la placa de crecimiento, ésta se dividió de manera arbitraria en 3 aéreas idénticas, medial, central y lateral de acuerdo con su relación anatómica. (Siguiendo un protocolo previamente establecido).

La altura de la placa de crecimiento fue estudiada en estas diferentes áreas. Y dado que la placa de crecimiento no es una estructura uniforme, las alturas, fueron medidas en 3 diferentes puntos de cada una de las zonas de estudio y la media fue usada como referencia³⁶, esta rutina está descrita en la imagen Fig.7.19. En orden a determinar la altura, la medición fue siempre hecha trazando una línea perpendicular a la fisis.

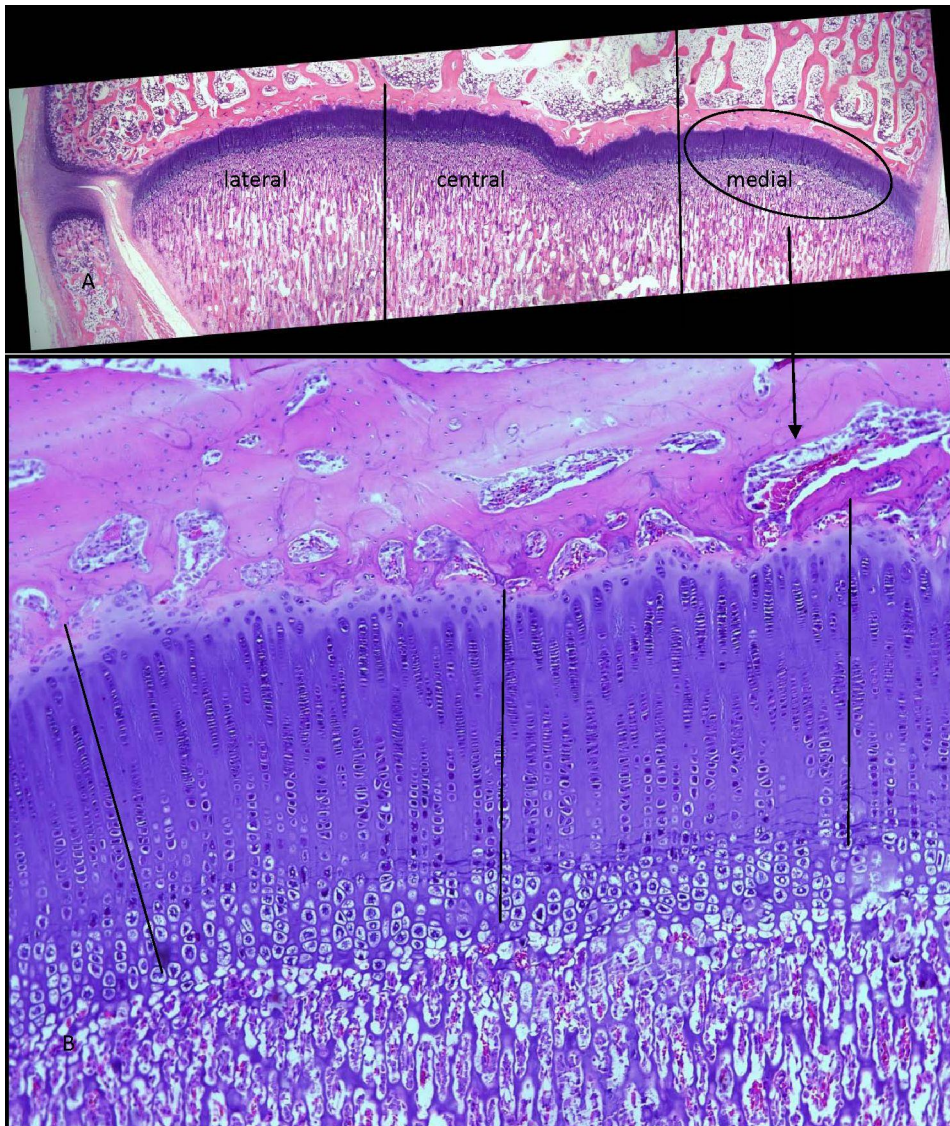


Fig.7.19. A-Histología:Imágenes microscópicas de los cortes realizados de la fisis de las piezas anatómicas extraídas de los animales. A: fisis dividida en 3 aéreas (lateral, central y medial). B: Área medial usada como referencia y, a su vez, dividida en tercios.

Para realizar las mediciones se utilizó un sistema de microscopia con sistema fotográfico Olympus DP71, (Olympus Corporation®, Tokio, Japan). Mediante un programa informático e-cell, se realizó con ayuda de este paquete informático una medición de las distancia. (Fig.7.20)

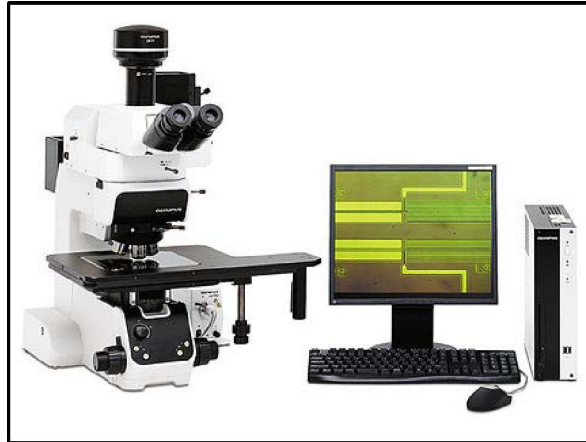


Fig.7.20 Material: Sistema de captación fotográfico Olympus DP71

Los huesos destinados a estudio con 5^o-Bromo-2^oDeoxyuridine (BrdU) se procesaron inicialmente de la misma forma, se retiraron los cortes que se desean estudiar, y se fijaron en formaldehído al 4% a las 24 horas del sacrificio. Se decalcificaron con ácido fórmico al 5%, se seccionaron por la zona central de la placa de crecimiento y se incluyeron en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes con un micrótopo a 5 micras, que se montaron sobre portaobjetos de inmuno-histoquímica sin teñir.

El protocolo seguido para realizar la tinción de Inmuno-histoquímica, fue el siguiente:

PROTOCOLO KIT PROLIFERACIÓN CELULAR (GE health-care-life-sciences):

*Desparafinar cortes:

- Estufa 10 min
- Deshidratar: Sumergir la cubeta de lavado con los cortes en las siguientes soluciones:
 - Xilol (5 min) x 3 veces
 - Etanol 100% (5 min) x 2 veces
 - Etanol 96% (5 min) x 2 veces
 - Etanol 70%
 - H₂O destilada (3 min)

1. Rehidratar. Lavar 3 veces con PBS cambiando la solución en cada lavado. A continuación sumergir la cubeta de lavados en las siguientes soluciones:
 - H₂O destilada (3 min)
 - Etanol 70% (3 min)
 - Etanol 96% (3 min)
 - Etanol absoluto (3 min)
 - Xilol (5 min)
2. Cubrir el corte con solución nucleasas/anticuerpo primario (100ul por corte. Esparcir con la pipeta si es necesario)
3. Incubar 1h a T ambiente.
4. Lavar 3 veces con PBS (tampón fosfato salino) (lavados de 3min). Eliminar el exceso alrededor del corte.
5. Cubrir con suficiente volumen de solución de anticuerpo secundario (100ul. Esparcir con la pipeta)
6. Incubar 30min a T ambiente.
7. Descongelar una alícuota de DAB (1ml) y diluir en 50 ml de tampón fosfato (Se consiguen buenos resultados utilizando volúmenes grandes de DAB. 50 ml para 1-10 cortes).
8. Añadir el sustrato a los 50 ml de DAB en tampón fosfato (100ul por cada 50 ml de DAB). Mezclar bien y transferir a una cubeta de tinción capaz de teñir todos los cortes.
9. Lavar 3 veces con PBS (lavados de 3min). Dejar los cortes con el último lavado mientras se prepara el paso 9.
10. Sumergir los cortes en la cubeta de tinción durante 5-10 minutos. (El tiempo de tinción puede ser variable, dependiendo de la sensibilidad requerida, ruido de fondo etc.)
11. Lavar los cortes 3 veces en agua destilada.
12. Hacer contra-tinción (Hematoxilina previamente filtrada 10 segundos) para permitir la visualización de los núcleos teñidos.
13. Lavar con agua corriente (5 min).
14. Rehidratar, limpiar y montar.

Para la valoración de la captación del BrdU, se usó un anticuerpo monoclonal biotinilado, ya que fija a las células con captación de BrdU, siguiendo un protocolo previamente estandarizado^{21,24,36,87}. La BrdU se incorpora a las células en la fase S del ciclo celular (de la síntesis del DNA). Por lo tanto, la distribución y el número son buenos representantes de la población de células proliferantes. Para determinar el número de células captantes se utilizó un índice (brdU labeling index BLI) que consistía en un recuento del número de células con el núcleo teñido dividido por el número de núcleos presente en el campo (ver en apartado 7.7.4). Se estudiaron las diferentes áreas y zonas de la placa de crecimiento.

7.7. VARIABLES ESTUDIADAS

En este estudio experimental, se estudiaron las variables que se describen a continuación.

7.7.1 VARIABLES CLINICAS:

- ✓ Peso: El peso de los animales se determinó antes de comenzar el estudio y semanalmente durante la duración del proyecto.(Fig. 7.21) Se realizaron tablas de mediciones del peso.

La evolución del peso se utilizó no solo para calcular las dosis de medicación necesaria, sino también como valoración indirecta del bienestar animal. (Ante una pérdida de peso debe buscarse exhaustivamente una causa). Además se utilizó el peso como medida secundaria de velocidad de crecimiento y se intentó relacionar con la angulación obtenida.



Fig. 7.21. ConejoXIII: Imagen del procedimiento de pesado de los animales

- ✓ Longitud de la tibia: esta variable se midió desde el punto más proximal de la meseta tibial interna a la superficie del tobillo hasta el punto más proximal de la meseta tibia externa al tobillo. La medición clínica se realizó con ayuda de un pie de rey. (Fig.7.13.A,B,apartado 7.4.2.5)

Se definió el Índice Longitud Pata (IP), como el cociente entre la Longitud desde el platillo tibial interna de la tibia proximal hasta la Superficie articular distal interna y la longitud platillo tibial externo hasta la superficie articular distal externa. Siendo IPD para la pata Derecha e IPI para la pata Izquierda:

$$\text{Indice Longitud Pata : IP} = \frac{\text{Longitud Platillo tibial int} - \text{S. articular distal int}}{\text{Longitud Platillo tibial ext} - \text{S. articular distal ext}}$$

7.7.2 VARIABLES RADIOLOGICAS

- ✓ Angulo línea articular-línea diáfisis (ALDA): es la medición radiológica del Angulo entre la perpendicular a la tangente a la superficie articular proximal de la tibia y el eje anatómico de la tibia^{55,72}. Fue utilizada para medir la angulación. Las variaciones en el ángulo ALDA fueron registradas semanalmente. Para la medición del ALDA, se utilizó un sistema digital integrado que permitía las

mediciones lineales y angulares. Las mediciones fueron realizadas siguiendo los principios esbozados por Paley y Testworth^{91,92}.

Para realizar la medición del ángulo ALDA, se siguieron los siguientes pasos: (Fig.7.22A-B)

- Trazar una línea a lo largo de la superficie articular.
- Trazar el eje de la diáfisis de la tibia.
- Trazar el eje de la diáfisis de la tibia.
- Medir el ángulo entre el eje de la diáfisis y la perpendicular a la línea articular.
- Medir el ángulo entre el eje de la diáfisis y la perpendicular a la línea articular.
- Método alternativo: Medir el ángulo entre la perpendicular de la diáfisis y la línea articular (Fig. 7.22 B).

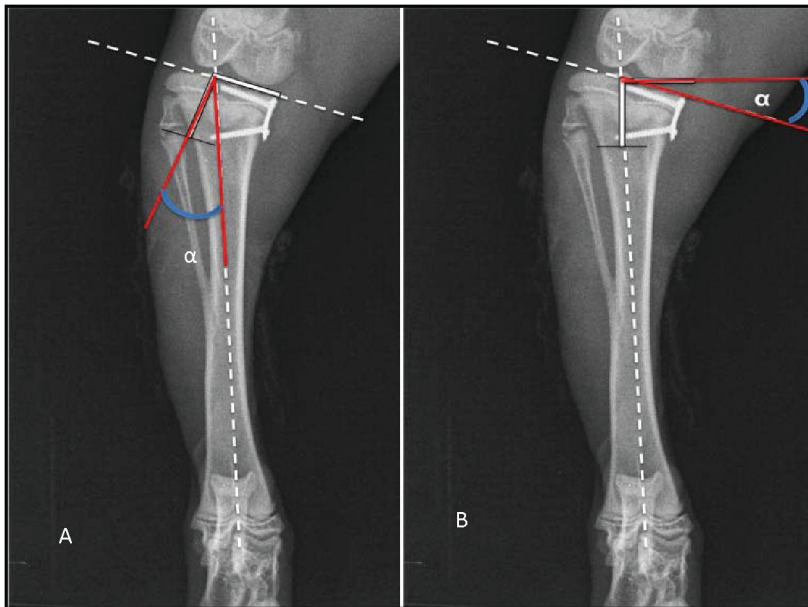


Fig.7.22.A-B. Radiología VI: Métodos de medición del ALDA sobre radiografías de pata de conejo antero-posterior. A.En el primer método se mide el ángulo entre el eje de la diáfisis y la perpendicular a la línea articular B .Es un método alternativo, en el que se mide el ángulo entre la perpendicular de la diáfisis y la línea articular

- ✓ Crecimiento por rebote: El llamado *efecto rebote*, que se define como " el sobre crecimiento del lado en que se ha realizado la hemiepifisiodesis o bien la pérdida de la angulación obtenida".

En este estudio de manera arbitraria se decidió definir el efecto rebote como una pérdida de angulación *mayor del 20%* en el momento del sacrificio comparado con la angulación máxima obtenida en el momento de retirada de la hemiepifisiodesis. Las oscilaciones observadas en la mediciones en tibias control oscilaban entre $0 \pm 1,5$ por tanto se decidió tomar un margen de variación lo suficientemente amplio para que no pudiera caer dentro de los límites de error de medición. El valor de un 20% fue considerado lo suficientemente amplio para evitar los errores de medición aún a expensas de excluir algunos posibles rebotes menos potentes.

Para calcular el efecto rebote, se utilizó la variable obtenida entre el ALDA medido en el momento de la extracción del material de hemiepifisiodesis y el ALDA final en el momento del sacrificio y expresado en grados^{22, 55}. (Fig.7.23)

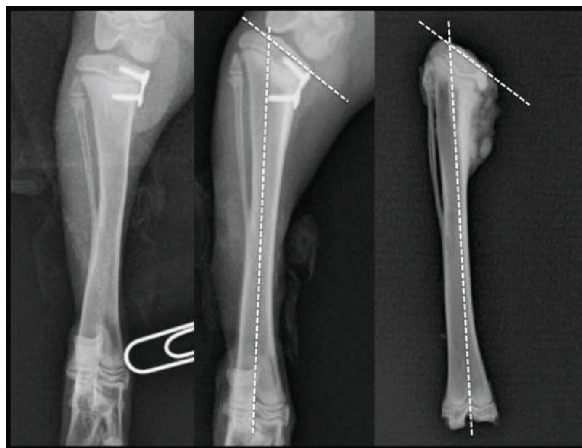


Fig.7.23. Radiología VII: Detalles de la medición del ALDA en las piezas anatómicas de los conejos: ángulo entre la diáfisis de la tibia y la línea articular.

7.7.3 VARIABLES HISTOLOGICAS:

- ✓ Grosor de la placa de crecimiento: La placa de crecimiento fue dividida en tres zonas idénticas: lateral, central y medial (Fig.7.19, apartado 7.6). El grosor de la placa fue medido en tres diferentes puntos para cada zona, y un promedio de los valores obtenidos fue utilizado. Para el cálculo de las distancias se utilizó un programa informático, Surgimap Ortho®(DICOM Medical Imaging Software)⁹³.
- ✓ Características morfológicas de la placa de crecimiento: Se valoró el tamaño y aspecto de las células de la fisis y se describió la morfología de cada zona, resaltando las peculiaridades más características.
- ✓ Índice de BrdU (BrdU labeling Index: BLI:nº núcleos teñidos / nº núcleos):La BrdU se utilizó para evaluar la actividad celular en la placa de crecimiento⁷³.En los grupos G1, G2, G3 se utilizó el marcaje con bromodeoxiuridina. Se realizó un recuento del número de células proliferativas con el núcleo teñido dividido por el número de núcleos presente en el campo. El índice se estudió para las diferentes zonas de la fisis: zona de reposo, zona de proliferación^{21,86, 87,94}.

7. 8. MÉTODO ESTADÍSTICO

Se recogió la información mediante un cuaderno de recogida de datos de papel y posteriormente, se transcribieron a formato informático. Los datos obtenidos fueron tabulados, revisados, verificados, y confirmados, con el fin de detectar y corregir las inconsistencias, errores y faltas.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables de razón e intervalo, describiendo la distribución de sus valores mediante gráficos y calculando, como medidas de centralización, dependiendo de que se pueda asumir la normalidad de la variable, las medias con sus desviaciones estándar (DE) e intervalos de confianza al 95% (IC95%) o

las medianas y los cuartiles 1er y 3er. Para las variables categóricas, se han calculado las proporciones.

Para el contraste de hipótesis nula, se utilizaron el test de Mann-Whitney y la Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher. Se rechazó la hipótesis nula con valores de p inferiores a 0,05. Para el estudio de relación lineal entre variables se calculó el coeficiente de correlación de Spearman.

Los cálculos se realizaron con el programa IBM® SPSS Statistics v 20.0.0.

Capítulo cuarto

RESULTADOS DEL ESTUDIO

8. RESULTADOS

En el presente trabajo de investigación se utilizaron 22 conejos hembras blanco de Nueva Zelanda de seis semanas de edad, clasificados de manera aleatoria siguiendo un protocolo previamente establecido al inicio del trabajo de experimentación, en cuatro grupos paralelos, según la fecha de eutanasia.

En todos los grupos, se realizó una hemiepifisiodesis con un modelo de síntesis semejante a la placa en 8 utilizada en humanos, en la zona de la fisis proximal medial de la tibia del conejo. Un número determinado de patas de los conejos fueron utilizadas como grupo control, y en dichas tibias no se realizó cirugía. En las todas las patas operadas la placa de hemiepifisiodesis se retiró a las tres semanas. La eutanasia se realizó según el protocolo previamente establecido, a los 3 días (G1), 1 semana (G2), 2 semanas (G3) o 3 semanas (G4) de la segunda cirugía (extracción del material de hemiepifisiodesis).

Con este proyecto, se quería estudiar el llamado *efecto rebote*, que se define como "el sobre crecimiento que ocurre posterior a la retirada del material de hemiepifisiodesis" El efecto rebote es un fenómeno bien conocido, aunque poco se sabe sobre sus características, causas e incidencia.

El objetivo principal de este estudio fue observar, en un modelo experimental, la cronología, y evaluar la incidencia e intensidad de crecimiento por rebote después de la hemiepifisiodesis, buscando posibles factores asociados al mismo. En este proyecto, se estudiaron variables tanto radiológicas como histológicas, cuyo resultado soportan el objetivo e hipótesis de este estudio experimental.

8.1. CONSIDERACIONES INICIALES

- ❖ La variación en el número de conejos en el grupo 4 (G4), se debe a que dado que a las tres semanas, existirían menor número de conejos para hacer la comparación, se decidió aumentar el tamaño de este último grupo, para hacer la muestra más significativa.
- ❖ De los 22 conejos incluidos en el estudio, dos conejos fueron excluidos:
 - ✓ El conejo 10, fue excluido del estudio por infección. Presentaba una dehiscencia de la herida quirúrgica, que tras tratamiento, mediante lavado con solución salina estéril, aplicación posterior de povidona yodada, y re-sutura de la herida, no mejoró. La pérdida ponderal era apreciable y dado que la infección no mejoraba, se decidió sacrificarlo.
 - ✓ El conejo 22, su peso a las 6 semanas, era < 1000gramos, sensiblemente inferior al resto del grupo. No se encontró una causa específica para el bajo peso, (posiblemente debido al estrés causado por el traslado del conejo desde el centro de crianza hasta el Estabulario). Inicialmente se decidió demorar la cirugía 1 semana, hasta que alcanzase el peso óptimo. Se realizó la primera cirugía a las 7 semanas de edad del conejo, y la eutanasia a las 13 semanas de edad. Posteriormente, para unificar los criterios y los datos de las cirugías, y evitar errores de medición, se decidió excluirlo del grupo de estudio.

8.2. RESULTADOS CLÍNICOS

8.2.1. PESO, HERIDA, BIENESTAR GENERAL (actitud conejo, pelaje...)

✓ PESO

La curva ponderal de los 22 conejos fue registrada semanalmente. La evolución del peso se utilizó, para analizar el bienestar animal (Fig.8.1). Una disminución de la ganancia ponderal se puede interpretar como un signo indirecto de pérdida del bienestar animal, siendo la causa más frecuente, una infección.



Fig.8.1. Pesado de animal: Imagen en la que se muestra la realización de las mediciones de peso en un conejo en bascula para animales. Esta medición se realizaba semanalmente.

En la tabla 8.1, se observan los pesos de los conejos, divididos en grupos de acuerdo con el momento de sacrificio G1 [3 días], G2 [1 semana], G3 [2 semanas] y G4 [3 semanas]. A los tres días solo se realizaron las mediciones ganancia ponderal en los conejos del G1.

Conejos	Peso 1er cirugía	Peso 1era semana	Peso 2nd semana	Peso 2nd cirugía	Ganancia ponderal 1erCx-2ndaCx	Peso Eutanasia 3 días	Peso Eutanasia 1 semana	Peso eutanasia 2 semanas	Peso Eutanasia 3semanas
Conejo 1	1000	1380	1620	1800	800	1840			
Conejo 2	1260	1500	1730	1830	570	1940			
Conejo 3	1220	1400	1540	1720	500	1800			
Conejo 4	1840	2000	2040	2240	400	2540			
Conejo 5	1620	1820	2240	2160	540	2220			
Conejo 6	1180	1440	1600	1880	700	-	1940		
Conejo 7	1280	1520	1780	1960	680	-	2080		
Conejo 8	1120	1400	1680	1860	740	-	2020		
Conejo 9	1320	1500	1720	1900	580	-	1780		
Conejo 10	1200	1440	1580	1700	500	-	1600*		
Conejo11	1200	1400	1600	1740	540	-	1840	2000	
Conejo 12	1160	1400	1540	1620	460	-	1600	1880	
Conejo 13	1240	1580	2000	2340	1100	-	2500	2740	
Conejo 14	1320	1560	1900	2000	680	-	2120	2300	
Conejo 15	1660	2000	2140	2240	580	-	2100	2180	
Conejo 16	1100	1180	1600	1700	600	-	1780	2040	2160
Conejo 17	1000	1380	1520	1460	460	-	1840	2000	2180
Conejo 18	1160	1600	1900	2040	880	-	2220	2440	2460
Conejo 19	1000	1060	1200	1280	280	-	1380	1540	1660
Conejo 20	1000	1140	1450	1540	540	-	1740	1860	1980
Conejo 21	1720	2100	2420	2560	840	-	2820	3140	3380
Conejo 22	680	1420	1640	1840	1160	-	1960	2180	1940**

Tabla 8.1: Ganancia Ponderal I: Se puede observar los valores de ponderales de los conejos desde la primera cirugía hasta el momento de la eutanasia, así como la ganancia ponderal entre la primera cirugía y la segunda cirugía. Siendo Cx: cirugía. A cada grupo se le adjudicó un color, siendo azul G1, marrón G2, Rosa G3, aguamarina G4. En negrita se ha marcado el valor máximo alcanzado en cada grupo. (*)Conejo 10, (**) conejo 22. Que fueron excluidos

Los conejos oscilaron de peso desde un inicial mínimo de 1000 (si se descartan los 680 gramos del conejo 22) hasta los 1840 gramos, hasta un valor final que oscilaba desde 1660 a 3380 gramos. En la tabla 8.2 se observan las variaciones medias ponderales de los conejos por grupo.

Grupo conejos	Peso medio inicial 1er cirugía	Peso medio en el momento previo al sacrificio.	Ganancia media De peso.
Grupo 1 G1 [3 días]	1388	2068	680
Grupo 2 G2 [1 semana]	1220	1884	664
Grupo 3 G3 [2 semanas]	1316	2220	904
Grupo 4 G4 [4 semana]	1106	2251	1145

Tabla 8.2: Ganancia ponderal II: Se puede observar el peso medio por grupo inicial y final así como la ganancia media ponderal.

✓ HERIDA

En todos los animales se desarrolló la cirugía utilizando técnica aséptica. Tres conejos presentaron dehiscencia de la herida quirúrgica, que fue tratada mediante lavado profuso con una solución de suero fisiológico estéril, y aplicación de povidona yodada, cubriendo la piel con un apósito estéril resistente al agua.

Todos excepto el conejo 10 respondieron al tratamiento. En este último dada la evolución tórpida del conejo, se decidió actuar según el protocolo establecido por el CSIC (Consejo superior de investigación científica)⁷⁵ para casos de alteración del bienestar, dolor o angustia, según el cual, si tras el uso de medidas correctoras no se consigue el control de la infección, se debe proceder a la realización de una eutanasia no programada. (Fig. 8.2)



Fig. 8.2. Eutanasia no programada: Imagen del conejo 10, en el momento del sacrificio del animal. Se puede observar la dehiscencia de la herida en la pata Derecha.

✓ BIENESTAR ANIMAL

Además de las medidas arriba mencionadas, el bienestar animal se valoró mediante el control de ingesta, aspecto del animal, conducta social⁹⁰.

Así el conejo 10, presentó además de la pérdida ponderal, un cambio en la consistencia, y coloración del pelaje, disminución de la ingesta y asoció un cambio en su actitud, mostrándose reticente, evitando el contacto con otros animales.

8.2.2. LONGITUD DE LA TIBIA.

Se realizaron las mediciones de las tibias en el momento del sacrificio, con ayuda de un pie de Rey; éstas se realizaron desde la meseta tibia externa hasta la superficie articular distal externa y desde la meseta tibial interna hasta la superficie articular distal interna. (Fig.7.13, y Fig.8.3). Anotándose los valores en cm.

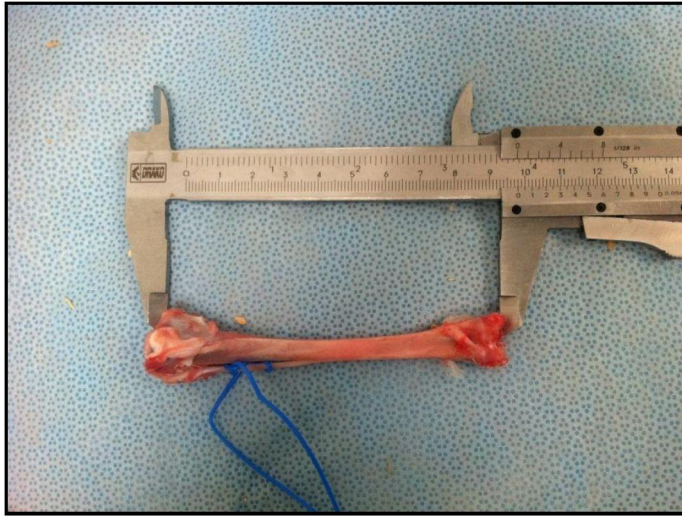


Fig.8.3. Longitud tibia: Imagen de la medición de la tibia marcada con vasseloop® con el pie de rey.

En la tibia operada, se observó disminución de longitud en la zona medial, respecto a la zona lateral. Mientras que en la tibia control no existían diferencias entre ambos lados. (Tabla 8.3)

Conejo	1era Cirugía Tibia D	1era Cirugía Tibia I	2nda Cirugía Tibia D/ I	Eutanasia grupo	Long Tibia D ext	Long Tibia D int	Long Tibia I ext	Long Tibia I int	Índice Pata D IPD	Índice Pata I IPI
Conejo 1	Placa 8		EMO/-	3 DIAS GRUPO1	8,9	8,2	8,9	8,9	0,92	-
Conejo 2	Placa 8		EMO/-	3 DIAS GRUPO 1	8,8	8,2	8,8	8,8	0,093	*
Conejo 3	Placa 8	Placa 8	EMO/EMO	3 DIAS GRUPO 1	8,6	8	8,6	8	0,93	0,93
Conejo 4	Placa 8		EMO/-	3 DIAS GRUPO 1	9,4	8,6	9,4	9,4	0,91	1
Conejo 5	Placa 8	Placa 8	EMO/EMO	3 DIAS GRUPO 1	8,8	8	8,9	8,4	0,90	0,94
Conejo 6	-	Placa 8	-/EMO	1 SEMANA GRUPO 2	8,9	8,8	8,9	8,1	0,98	0,91
Conejo 7	Placa 8		EMO/-	1 SEMANA GRUPO 2	8,9	8,1	8,6	8,5	0,91	0,98
Conejo 8	Placa 8		EMO/-	1 SEMANA GRUPO 2	8,5	8	8,5	8,5	0,94	1
Conejo 9	Placa 8	Placa 8	EMO/EMO	1 SEMANA GRUPO 2	8,5	7,9	8,5	7,9	0,92	0,92
Conejo 10	Placa 8	Placa 8	-/EMO	1 SEMANA GRUPO 2						
Conejo 11	Placa 8	Placa 8	EMO/EMO	2SEMANAS GRUPO 3	9,2	8,5	9	8,2	0,92	0,91
Conejo 12	Placa 8	Placa 8	EMO/EMO	2SEMANAS GRUPO 3	9,3	8,3	9,3	8,4	0,89	0,90
Conejo 13	Placa 8		EMO/-	2SEMANAS GRUPO 3	9,5	8,7	9,6	9,4	0,91	0,97
Conejo 14	Placa 8		EMO/-	2SEMANAS GRUPO 3	9,3	8,7	9,3	9,3	0,93	1
Conejo 15	Placa 8		-/EMO	2SEMANAS GRUPO 3	9,8	9	9,8	9,4	0,91	0,95
Conejo 16	Placa 8		EMO/-	3SEMANAS GRUPO 4	9,4	8,6	9,4	9,3	0,91	0,981
Conejo 17	Placa 8	Placa 8	EMO/EMO	3SEMANAS GRUPO 4	9,2	8,7	9,2	8,6	0,94	0,93
Conejo 18	Placa 8	Placa 8	EMO/EMO	3SEMANAS GRUPO 4	9,6	9,2	9,8	9	0,95	0,91
Conejo 19	Placa 8	Placa 8	EMO/EMO	3SEMANAS GRUPO 4	9,1	8,5	9,5	8,8	0,93	0,92
Conejo 20	Placa 8	Placa 8	EMO/EMO	3SEMANAS GRUPO 4	9,4	8,9	9,2	8,7	0,94	0,94
Conejo 21	Placa 8		EMO/-	3SEMANAS GRUPO 4	10,4	9,5	10,4	10,3	0,91	0,99
Conejo 22	Placa 8		EMO/-	3SEMANAS GRUPO 4	-	-	-	-	-	-

Tabla 8.3: Longitud Tibia: La siguiente tabla muestra la longitud de las tibias, según grupo, que se calcula como la distancia desde la meseta tibial interna hasta la superficie articular distal interna, y desde la meseta tibial externa hasta la superficie articular distal tibial externa. Se calcula el índice IP (Índice Longitud Pata: IPD, IPI). Señalando las cirugías realizadas en cada pata, siendo D: pata Derecha, e I: pata Izquierda.

Según la definición de Índice longitud tibia (ver apartado 7.7.1) se calcula el IP:

$$\text{Índice Longitud Tibia (IP)} = \frac{\text{Longitud Plátalo-tibial (m) - 5. articular distal int}}{\text{Longitud Plátalo-tibial (m) - 5. articular distal ext}}$$

En los casos de cirugía unilateral (1 pata control, 1 pata cirugía) el estudio de longitud demostró que no existía pérdida de longitud global de la tibia operada, Así aunque el lado interno esta acortado en comparación con la tibia contra lateral (tibia sana), no lo estaba el externo.

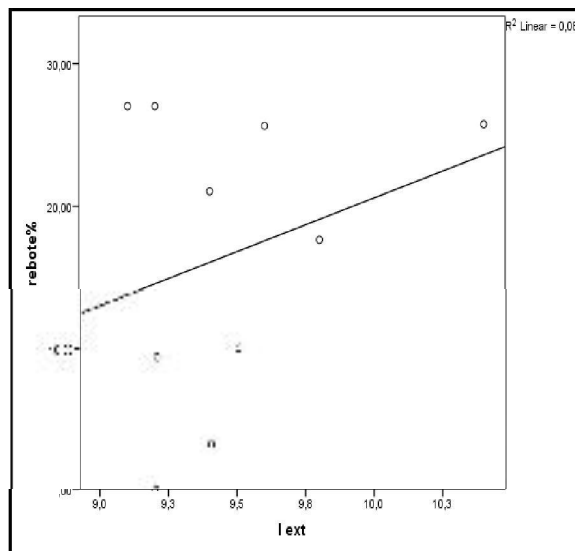


Fig. 8.4. Correlación Rebote-longitud: Imagen en la que se observa la correlación entre el efecto rebote y la longitud de la tibia.

El estudio de correlación entre el grado de angulación y la longitud, mostro una pobre relación entre ambas variables ($r= 0,28$) (Fig.8.4)

8.3. RESULTADOS RADIOLOGICOS

8.3.1. ALDA: ángulo línea articular- diáfisis.

Para valorar las alteraciones angulares se utilizó el ángulo ALDA, (ángulo formado por la línea articular y la diáfisis), (Fig.8.5). Para ello se tomaron las radiografías antero-posteriores semanales de las tibias de los conejos. Considerando como puntos de referencia en el estudio: la máxima angulación a las 3 semanas de la primera cirugía y la angulación en el momento de la eutanasia. En estos puntos se realizó una doble medición, antes y después de la extracción de material (cirugía a las 3 semanas) y pre y post a la eutanasia, en un intento de minimizar los posibles errores de medición en la técnica radiológica.



Fig. 8.5. ALDA: Método de medición del Angulo ALDA (ángulo entre el eje de la diáfisis y la perpendicular a la línea articular)

Todos los conejos sometidos a hemiepifisiodesis, presentaban alteración angular en varo. Dicha angulación fue evidente ya desde la 1 semana post hemiepifisiodesis y continuó aumentando durante el tiempo de duración de la hemiepifisiodesis.

Por otro lado, las tibias Control (no operadas) no sufrieron variación en el grado inicial de angulación, u oscilaciones nunca > de 3º (tabla 8.4). De esto se deduce que el varo es atribuible a la hemiepifisiodesis. (Tabla 8.5)

Conejo (C) / Pata (P) /Grupo (G)	PRE -Hemiepifisiodesis				POST- hemiepifisiodesis			
	Semana 0 1er Cx	Semana 1	Semana 2	Semana 3 2nda CX	Eutanasia 3 días	Eutanasia 1 semana	Eutanasia 2 semanas	Eutanasia 3 semanas
C1/ PI/G1	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0*			
C2 / PI/G1	1,0	2,0	2,0	0,0	0,0*			
C4 / PI /G1	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0*			
C6/ PD/G2	2,0	0,0	2,0	0,0	-	0,0		
C7/PI/G2	0,0	1,5	0,0	0,0		0,0		
C8/ PI/G2	1,0	2,0	2,5	0,0	-	0,0		
C13/PI/G3	3,0	2,0	2,0	2,0	-	2,0	2,0	
C14/PI/G3	1,0	0,0	1,0	0,0		0,0	0,0	
C15/PI/G3	0,0	1,0	0,0	1,0	-	1,0	1,0	
C16/PI/G4	0,0	1,0	1,0	0,0	-	1,0	1,5	1,0
C21/PI/G4	0,0	0,0	2,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0

Tabla 8.4. ALDA tibias Control. Se muestra la medición de la Angulación (ángulo ALDA) de las tibias control.(C): conejo,(numeral): número de conejo, (G):Grupo, (PI): Pata Izquierda ,(PD): pata derecha.(Cx): cirugía (*) A los tres días solo se determina el valor ALDA de los conejos del G1.

Conejos (C)/ Pata (P)/ Grupo(G)	PRE -hemiepifisiodesis				POST- Hemiepifisiodesis			
	Semana 0 1er Cx	Semana 1	Semana 2	Semana 3 2nda Cx	Eutanasia 3 días	Eutanasia 1semana	Eutanasia 2 semanas	Eutanasia 3 semanas
C1 / PD/ G1	1,0	9,0	21,0	34,0	35,0*			
C2/PD/ G1	1,0	14,0	28,5	35,0	35,0*			
C3/ PD/ G1	1,0	17,0	29,0	36,0	37,0*			
C3/ PI/ G1	2,0	17,0	27,0	36,0	36,0*			
C4/ PD/ G1	1,0	9,0	19,0	28,0	28,0*			
C5/ PD/ G1	3,0	11,0	26,0	34,0	35,0*			
C5/ PI/ G1	1,0	14,0	28,0	32,0	31,0*			
C6/ PI/ G2	1,0	14,5	28,0	35,0		36,0		
C7/PD /G2	3,0	9,0	28,5	38,5		37,5		
C8/ PD/G2	2,0	17,0	25,5	38,0		38,0		
C9/ PD/G2	2,0	18,0	21,0	32,0		33,0		
C9/ PI/G2	1,0	16,0	27,0	35,0		33,0		
C11/PD/ G3	1,0	12,5	23,5	33,0		32,0	34,0	
C11/PI/ G3	2,0	13,0	27,0	34,0		34,5	35,0	
C12/PD/ G3	1,0	13,0	31,0	41,0		38,5	41,0	
C12/PI/ G3	1,0	11,0	30,0	37,0		37,0	39,0	
C13/PD/ G3	1,0	16,0	31,0	42,0		42,0	42,0	
C14/PD/ G3	2,0	12,0	24,0	32,5		33,5	33,5	
C15/PD/ G3	0,0	15,0	25,0	31,0		32,0	32,5	
C16/ PD /G4	3,0	10,0	23,0	38,0		39,0	36,0	30,0
C17/PD/G4	1,0	10,0	19,0	37,0		34,0	37,0	27,0
C17/ PI/G4	0,0	6,0	22,0	32,0		32,0	33,0	29,0
C18/PD/G4	0,0	8,0	18,0	39,0		34,0	29,0	29,0
C18/PI/G4	0,0	6,0	20,0	34,0		28,0	33,0	28,0
C19/PD/G4	0,0	15,0	31,0	37,0		34,0	31,0	27,0
C19/PI/G4	0,0	18,0	27,0	30,0		31,0	29,0	27,0
C20/ PD/G4	0,0	15,0	32,0	31,0		37,0	30,0	30,0
C20/ PI/G4	0,0	15,0	28,0	30,0		34,0	34,0	30,0
C21/PD/G4	1,0	14,0	25,0	33,0		34,0	34,0	24,5

Tabla 8.5. ALDA tibias operadas: Se muestran los valores de la medición de la Angulación (ángulo ALDA) de las patas sometidas a hemiepifisiodesis. Como se puede observar la angulación es visible desde la primera semana post cirugía. Ver referencias en tabla 8.4

En éstas tablas se observaron variaciones en la angulación entre la alcanzada en el momento de la extracción del material de hemiepifisiodesis (3 semanas) y la angulación medida en el momento de la eutanasia (según grupo). En la Gráfica a continuación (Fig.8.6) se pueden observar como la variación de la angulación en los casos control, sigue una evolución lineal, mientras que en los casos operados, sigue una evolución en meseta, aumentando linealmente hasta a las 3 semanas desde la primera cirugía, y posteriormente, manteniéndose constante durante 2 semanas. A partir de la 2ª semana post-hemiepifisiodesis, se produce una disminución en la angulación.

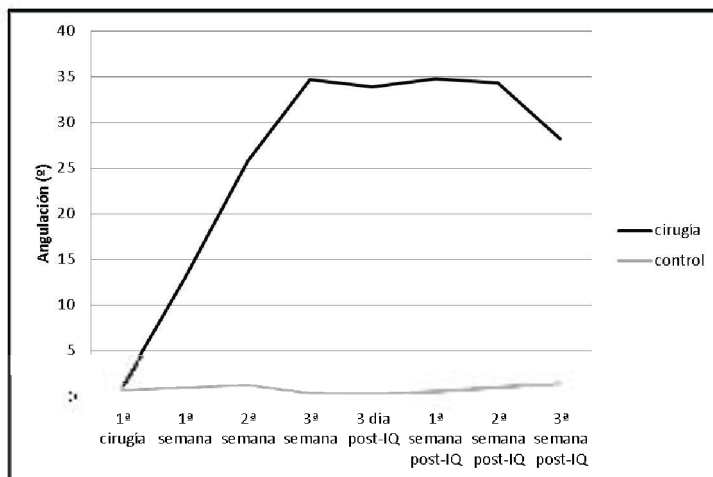


Fig. 8.6. Evolución de la mediana de angulación. En esta Gráfica se pueden observar la diferencia de angulación entre los casos operados y los casos controles. La angulación aumenta en el tiempo en los operados, para después mantenerse constante y posteriormente disminuirá las 3 semanas post retirada de la hemiepifisiodesis, mientras permanece más o menos estable en los controles.
(Post-IQ): post cirugía)

En la Fig. 8.7 se puede observar la evolución de la angulación a lo largo de las fases del estudio, (inmediatamente post cirugía, a las tres semanas, y la pieza anatómica).



Fig. 8.7. Conejo 16 [G4, 3semanas]. A. Control post-operatorio (Inmediatamente después de la hemiepifisiodesis) radiografía antero-posterior y lateral, B. A las 3 semanas, en el momento de retirada de material, y C. Radiografía antero-posterior de la pieza. Nótese la pérdida de angulación entre el momento de retirada de la placa (B) y el momento del sacrificio (C). La letra D señala pata derecha.

El grado de angulación a las tres semanas presentó un rango de variación de 28-42°, con una media de angulación de 34,51°, siendo la mediana de 34° y una desviación estándar de 3,36° (angulación de $34,51 \pm 3,36$) (Tabla 8.6). A pesar de la amplitud del rango, el rango inter-cuartil muestra que la mayoría de los valores estaban bastante agrupados. (1er-3er q 32-37)

Un análisis de los datos muestra que la evolución de la angulación no era lineal sino que presentaba variaciones entre semanas. La angulación obtenida a las 3 semanas era independiente de la angulación inicial en la primera semana. Es decir, aquellos que se angularon más rápido en la primera semana, no necesariamente acabaron siendo los que mayor angulación final alcanzaron. No encontramos relación entre la velocidad de angulación, y la angulación alcanzada a la primera semana y a la tercera semana.

	Semana 0. Primera cirugía	Patas operadas a las 3 semanas	Eutanasia Patas a a 3 días	Eutanasia Patas a la semana	Eutanasia Patas a las 2 semanas	Eutanasia Patas a las 3 semanas
Mediana	1,0	34,0	35,0	34,0	34,0	28,09
Rango (Máximo-Mínimo)	(3,0-1,0)	(42,0-28,0)	(37,0-28,0)	(42,0-34,0)	(42,0-29,0)	(30,0-24,5)
Media	1,0	34,51	33,72	34,59	34,10	28,09
Desviación Estándar	0,96	3,36	3,18	3,14	3,79	1,79

Tabla 8.6: Análisis estadístico en los puntos de referencia: Se muestran los valores de media, mediana, rango y desviación estándar, obtenidos en la 1er semana, a las 3 semanas, y los grupos de eutanasia.

Si analizamos por grupos observaremos: (ver tabla 8.5 y 8.6)

Grupo G1 (3 días)

En el G1, la angulación media pasó de $34,5 \pm 3,36$ a $33,72 \pm 3,18$. La máxima angulación a las 3 semanas fue de 36° , aumentando a 37° a los 3 días post-hemiepifisiodesis. La mínima angulación fue de 28° manteniéndose constante en el momento de la eutanasia. El estudio global de los 5 conejos, muestra que las variaciones en la angulación oscilaron entre -1° y $+1^\circ$. [p=0,382]

Grupo G2 (1 semanas)

En el G2, la angulación media pasó de $34,5 \pm 3,36$ a ser de $34,5 \pm 3,14$. La angulación en este grupo osciló entre $32,0^\circ$ - $38,5^\circ$ en el momento de la retirada del material, pasando a $33,0^\circ$ - $38,0^\circ$ en el momento de la eutanasia.

El rango de oscilación fue de -2° a $+1^\circ$. [p=0,784]

Grupo G3 (2 semanas)

En el G3 las angulaciones en el momento del sacrificio fueron similares a las de las 3 semanas pasando de una angulación de $34,5 \pm 3,36$ a una de $34,10 \pm 3,79$. El rango de angulación a las 3 semanas era de $31,0^\circ$ - 42° , y en la eutanasia $32,5^\circ$ - $42,0^\circ$. El rango de

oscilación fue de 0° a 2°. Ningún conejo en este grupo, presentó disminución en el grado de angulación. [p=0,597]

Grupo G4 (3 semanas)

En este grupo se observó una pérdida de angulación, respecto a la angulación media que presentaba en la semana 3, pasando de $34,51 \pm 3,36$ a $28,09 \pm 1,8$. Esta pérdida fue significativa [p<0,001]. El rango de angulación varió desde la 3er semana 30° a 39° y en el momento de la eutanasia el rango de angulación fue de 24,5° a 30°. El rango de oscilación fue de -10° a -1°.

Todas las patas del G4 menos 1, presentaron una disminución de su angulación respecto a la 3 semana.

En la gráfica a continuación se observa la evolución de los valores de media y mediana a lo largo del estudio (6 semanas). (Fig.8.8) En dicha gráfica, se observa la disminución de la angulación en la semana 6 (G4), mientras que presenta una angulación muy similar desde la semana 3+3(G1) a la semana 5 (G3).

El análisis de los distintos grupos muestra que tan sólo el grupo G4 presentó una variación con una pérdida significativa de angulación y que ninguno de los demás grupos presentó variaciones significativas en su angulación final, con respecto a la angulación máxima obtenida (retirada de hemiepifisiodesis). Estos datos pueden observarse en la Figura 8.8 y en la tabla 8.7.

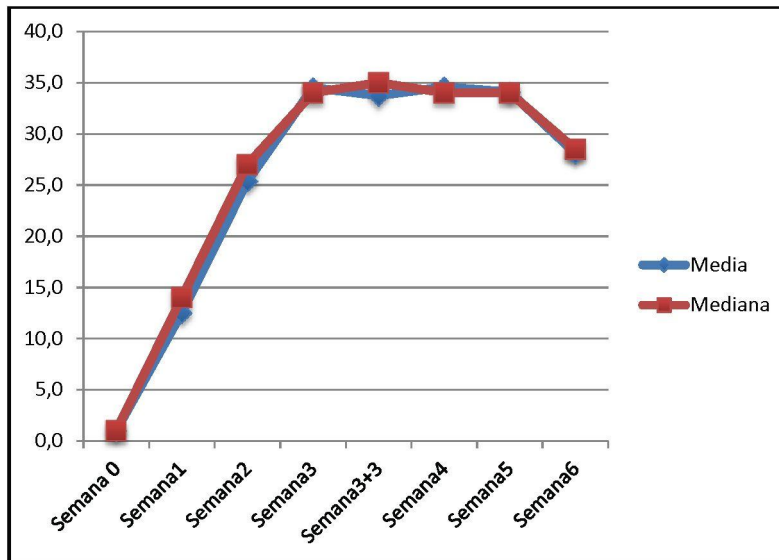


Fig. 8.8. Variación a lo largo del estudio: Grafica en el que se observan los valores de media y mediana a lo largo de las 6 semanas.

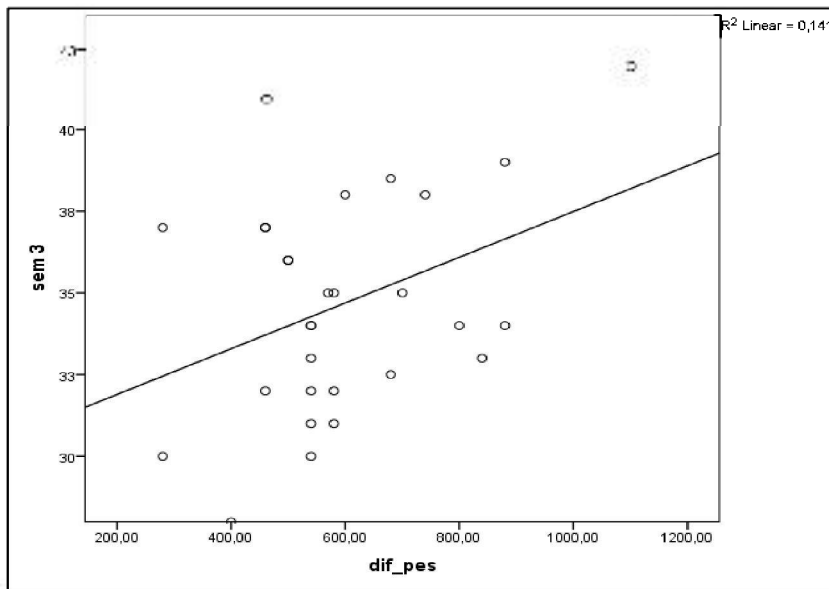
Semana	Media
Semana 0	1,0
Semana 1	12,5
Semana 2	25,37
Semana 3	34,51
Semana 3+3 (eutanasia 3 días) G1	33,72
Semana 4(eutanasia 1semana) G2	34,59
Semana 5(eutanasia 2 semanas) G3	34,1
Semana 6 (eutanasia 3 semanas) G4	28,09

Tabla 8.7. Mediana y Media: Tabla con la media alcanzada según la semana. Siendo semana 0, la primera cirugía, semana 3, la segunda cirugía, semana 3+3, la eutanasia del G1, la semana 4, fecha de eutanasia G2, semana 5, fecha eutanasia G3, y semana 6 corresponde con la eutanasia del G4.

En resumen, el análisis por grupos muestra que la máxima angulación media se obtuvo en el momento de retirada de las placas ($34,51 \pm 3,36$; rango 28-42°), que corresponde a las 3 semanas post cirugía inicial y que la angulación media no mostró cambios significativos durante las dos primeras semanas y es en la tercera semana post-

hemiepifisiodesis donde se observa por primera vez una pérdida significativa de la angulación ($28,09 \pm 1.8$ rango 24,5-30º) [$p < 0,001$].

La correlación entre el grado máximo de angulación obtenida y el incremento ponderal (reflejo indirecto de crecimiento) entre la primera y segunda cirugía. (Fig.8.7), mostró una relación entre variables muy baja ($r=0,32$).



Correlaciones			sem 3	dif_pes
Rho de Spearman	sem 3	Coefficiente de correlación	1,000	,247
		Sig. (bilateral)		,197
		N	29	29

Fig. 8.9 Correlación Peso -Angulación: Gráfica donde se correlaciona la diferencia de peso y la máxima angulación alcanzada a las 3 semanas.

8.3.2. CRECIMIENTO POR REBOTE

En el apartado 7.7.2 se definió el "Crecimiento por Rebote" como la pérdida de angulación mayor del 20% con respecto a la angulación máxima obtenida.

Para calcular el efecto rebote, se utilizó la variable obtenida entre el ALDA en el momento de la extracción del material de hemiepifisiodesis (ALDA 3 semanas) y el ALDA final en el momento del sacrificio (ALDA sacrificio) y expresado en grados⁹².

Formula del efecto rebote* o crecimiento por rebote es la siguiente:

$$\text{Efecto rebote} = \frac{\text{ALDA 3semanas}}{\text{ALDA sacrificio}} \times 100$$

Las 29 tibias operadas están repartidas en 7 tibias en G1, 5 tibias en G2, 7 tibias en G3, y 10 tibias en G4.

Se calculó el Efecto Rebote tanto en valores absolutos como con la diferencia de angulación entre el ALDA a las 3 semanas y el ALDA en la fecha de la eutanasia. (ver tabla 8.8)

Conejo / Pata	Semana 0	Semana 3	Semana 3+3 (G1)	Semana 4 (G2)	Semana 5 (G3)	Semana 6 (G4)	Diferencia angulación	Rebote*
Conejo 1 pata D	1,0	34,0	35,0	-	-	-	1	2,941
Conejo 2 pata D	1,0	35,0	35,0	-	-	-	0	0
Conejo 3 pata D	1,0	36,0	37,0	-	-	-	1	2,778
Conejo 3 pata I	2,0	36,0	36,0	-	-	-	0	0
Conejo 4 pata D	1,0	28,0	28,0	-	-	-	0	0
Conejo 5 pata D	3,0	34,0	35,0	-	-	-	1	2,941
Conejo 5 pata I	1,0	32,0	31,0	-	-	-	-1	3,125
Conejo 6 pata I	1,0	35,0	-	36,0	-	-	1	2,857
Conejo 7 pata D	3,0	38,5	-	37,5	-	-	-1	2,597
Conejo 8 pata D	2,0	38,0	-	38,0	-	-	0	0
Conejo 9 pata D	2,0	32,0	-	33,0	-	-	1	3,125
Conejo 9 pata I	1,0	35,0	-	33,0	-	-	-2	5,714
Conejo 11 pata D	1,0	33,0	-	-	34,0	-	+1	3,03
Conejo 11 pata I	2,0	34,0	-	-	35,0	-	+1	2,941
Conejo 12 pata D	1,0	41,0	-	-	41,0	-	0	0
Conejo 12 pata I	1,0	37,0	-	-	39,0	-	+2	5,401
Conejo 13 pata D	1,0	42,0	-	-	42,0	-	0	0
Conejo 14 pata D	2,0	32,5	-	-	33,5	-	0	3,077
Conejo 15 pata D	0,0	31,0	-	-	32,5	-	+1.5	4,839
Conejo 16 pata D	3,0	38,0	-	-	-	30,0	-8	21,05
Conejo 17 pata D	1,0	37,0	-	-	-	27,0	-10	27,03
Conejo 17 pata I	0,0	32,0	-	-	-	29,0	-3	9,375
Conejo 18 pata D	0,0	39,0	-	-	-	29,0	-10	25,64
Conejo 18 pata I	0,0	34,0	-	-	-	28,0	-6	17,65
Conejo 19 pata D	0,0	37,0	-	-	-	27,0	-10	27,03
Conejo 19 pata I	0,0	30,0	-	-	-	27,0	-3	10
Conejo 20 pata D	0,0	31,0	-	-	-	30,0	-1	3,226
Conejo 20 pata I	0,0	30,0	-	-	-	30,0	0	0
Conejo 21 pata D	1,0	33,5	-	-	-	24,5	-9	25,76

Tabla 8.8: En esta tabla se muestran los Ángulos ALDA en las tibias operadas, a la semana 0 (primera cirugía) a la semana 3 (segunda cirugía) y en la semana de la eutanasia, según grupo. Siendo D: Derecha, I: Izquierda * cálculo del rebote según fórmula. La pérdida de angulación mayor del 20% está marcada en negrita.

Si analizamos por grupos se observó:

Grupo G1 (3 días)

En este grupo, un conejo presentó una pérdida de angulación de 1º, que corresponde al 3,12%. $p=0,383$ (tabla 8.9)

Grupo G2 (1 semana)

En este grupo, dos conejos presentaron pérdida de angulación, ésta osciló entre -2° y -1° , que corresponde con 5,17%-2,8%. $p=0,784$ (tabla 8.9)

Grupo G3 (2 semanas)

En este grupo, no se observan en ningún caso pérdida de angulación. $p=0,597$ (tabla 8.9)

Grupo G4 (3 semanas)

En este grupo 9 de los 10 tibias estudiadas presentaron pérdidas de angulación que oscilaron entre el 3,2% y el 27,03%. Pese a que la pérdida de angulación en 4 de los 6 conejos es bilateral, estos, no presentaron la misma pérdida de angulación en las dos tibias, siendo significativamente mayor en la tibia Derecha.

En este grupo 5 de las 10 tibias que lo forman presentaron pérdida de la angulación de entre 21,05%-27,03% (8-10°). Otra tibia presentó una pérdida de angulación de 17,65%, (6°). Finalmente, en las otras 4 tibias restantes, la pérdida de angulación fue menor del 10%, estas tibias presentaron cambios menores que fluctuaban hasta pérdidas de 3°.

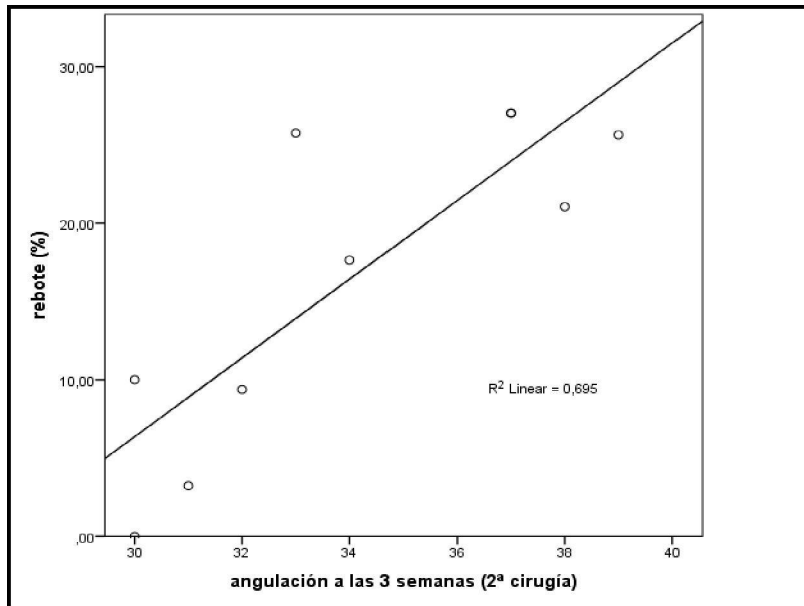
La angulación global de las tibias de este grupo presentaba una disminución significativa con respecto a su nivel de máxima angulación. $p=0,001$ (tabla 8.9).

	Porcentaje de pérdida de angulación	P valor	95% intervalo de confianza	
			Min.	Máx.
3 días rebote G1	-0,69	0,383	-2,45	1,07
1 semana rebote G2	0,43	0,784	-2,75	3,60
2 semana rebote G3	1,02	0,597	-2,96	5,00
3 semana rebote G4	16,79	0,001	9,34	24,23

Tabla 8.9. Rebote: Obsérvese el porcentaje de pérdida de angulación medio por grupo y la P final

Cuando comparamos la máxima angulación obtenida a las 3 semanas, en aquellas tibias que presentaron rebote (mayor del 20% de pérdida de angulación) y en aquellas que no presentaron rebote, se observó que las tibias que presentaron rebote eran aquellas que presentaban mayor angulación a las 3 semanas [mediana de angulación tibias rebote =37 (1er-3er q37-38 versus mediana de angulación tibias no rebote= 31° (1er-3er q 30-32); p=0.016]

El coeficiente de correlación entre la variable angulación a las 3 semanas y el efecto rebote es de $r = 0,8$ que demuestra la existencia de una relación positiva. La relación matemática sigue una recta, cuando uno aumenta, el otro también aumenta de forma lineal, por tanto a mayor angulación, mayor probabilidad de rebote. (Fig. 8.10)



Correlaciones

		rebote%	sem 3
rebote%	Correlación de Pearson	1	,834**
	Sig. (bilateral)		,003
	N	10	10

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Correlaciones

		rebote%	sem 3
Rho de Spearman	Coefficiente de correlación	1,000	,728
	Sig. (bilateral)		,017
	N	10	10

* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Fig.8.10 .Correlación Angulación - Rebote: Gráfica que correlaciona la angulación máxima alcanzada a las 3 semanas (2nda Cirugía) y el efecto rebote (%).

8.4. RESULTADOS HISTOLOGICOS

8.4.1. GROSOR DE LA PLACA

Para estudiar el grosor de la placa de crecimiento, se dividió ésta en su máximo diámetro transversal, en tres zonas iguales: lateral, central y medial. En cada una de estas zonas se midió el grosor de la fisis, trazando una línea perpendicular a la fisis en tres diferentes puntos cada uno de ellos equidistantes entre sí, se utilizó un promedio de valores para cada zona. (Fig. 8.11)

Para realizar los cálculos se utilizó un programa informático calibrado, Surgimap Ortho® (DICOM Medical Imaging Software)^{93,95}.

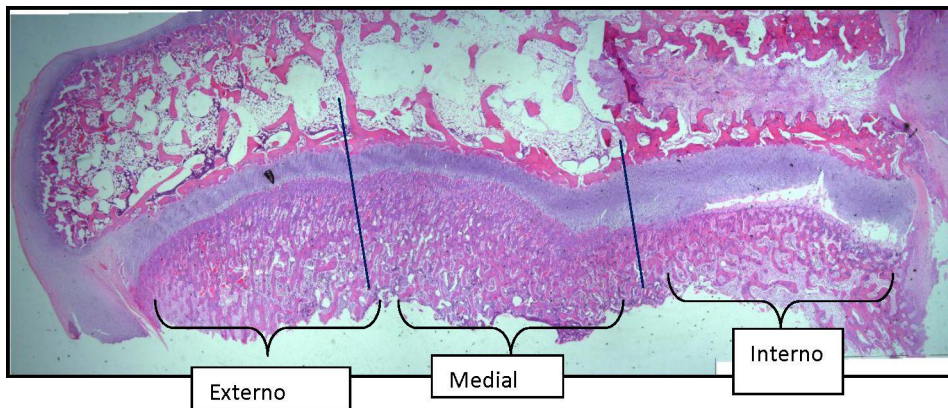


Fig. 8.11. Técnica medición Grosor. Imagen que muestra la manera de realizar mediciones de la altura de la placa de crecimiento. Se divide en tres partes (Interna, medial y externa) y cada una se divide a su vez en 3.

El análisis de los controles mostró que en las tibias control el grosor de la fisis se mantenía constante a lo largo del período estudiado, (desde los 3 días a las 3 semanas) así como la relación entre el grosor de la fisis en la parte externa e interna (lo que nos llevó a considerar todas las tibias control como un solo grupo). Mientras que en las tibias intervenidas y con retirada del material de hemiepifisiodesis, se advertía que ya desde el momento inicia la retirada (3 días), hasta las 2 semanas, existía una diferencia en grosor entre la zona interna y la externa en la placa de crecimiento, estando el

grosor más aumentado en la zona interna. A partir de entonces (2ª semana) esta variación de grosor, tiende a desaparecer, hasta llegar a valores de cercanos a la normalidad (semejante a los controles) a las 3 semanas.

Tal y como se observa en la figura, (Fig. 8.12) a los 3 días el grosor de la zona interna estaba aumentado, para comenzar a disminuir hacia las 3 semanas, en contraste con el grosor en la zona externa, que se mantenía prácticamente constante en todo el estudio. Los valores a la 3 semana, tanto en la zona interna, media y/o externa fueron semejantes a los valores hallados en los grupos control. (Tibia no operada).

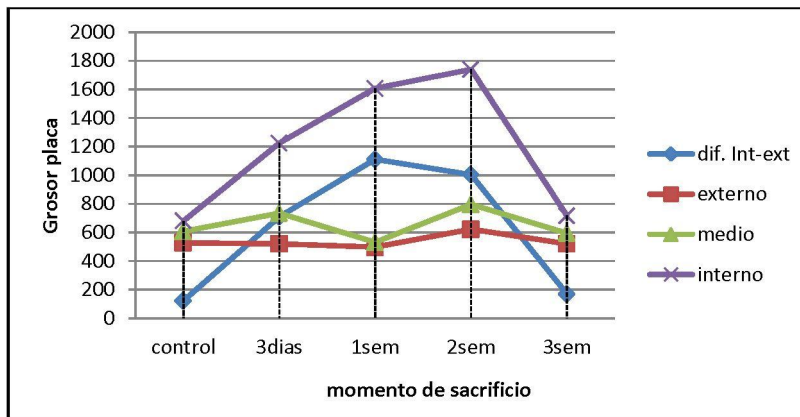


Fig. 8.12: Grosor placa crecimiento. Gráfica en la que se observa la variación del grosor entre la zona interna, medial y externa de la placa de crecimiento, así como la diferencia total, en relación al control. Nótese que mientras en las tibias control los valores de grosor entre las tres diferentes zonas están muy cercanos, en los conejos operados el valor de grosor de la zona interna aumenta progresivamente durante las dos primeras semanas para acercarse de nuevo a valores normales a las 3 semanas.

En la tabla 8.10, se puede observar que existen diferencias entre la zona interna y la externa de la placa de crecimiento para cada momento de sacrificio (G1, G2, G3, G4) y esto contrasta con lo observado en la tibia control de cada grupo de edad. Entre los 3 días y las 2 semanas, la diferencia entre el grosor de la placa de crecimiento en la zona externa y la zona interna con respecto al control fue significativa. Sin embargo a las 3 semanas, esta diferencia de grosor era mínima, siendo ya muy semejantes a los valores observados en la placa de crecimiento control.

Zona placa \ Grupo	Externo	Medio	Interno	Dif. grosor	"p"
Control	527,34	606,58	681,00	121,96	
G1 [3días]	520,50	734,83	1224,15	709,15	0,001
G2 [1sem]	496,66	530,33	1606,81	1110,15	0,011
G3 [2 sem]	621,66	795,33	1739,33	1003,66	0,051
G4 [3 sem]	519,96	594,66	716,5	170,15	0,117

Tabla 8.10: Diferencia grosos entre las zonas de la placa y los grupos de estudio. En la tabla se observa la media de los grosos en las diferentes zonas de la placa: externa, medio, interno, la diferencia de grosor (dif. grosor) en los distintos grupos G1, G2, G3, G4 y grupo control.

El grosor de la zona interna osciló desde una media de $1224,15 \pm 165,34\mu$ a los 3 días hasta $716,5 \pm 75,89\mu$ a las 3 semanas. Mientras que el grosor de la zona externa apenas sufrió variaciones, los valores pasaron desde una media de grosor $520 \pm 77,98 \mu$ a los 3 días hasta una media de grosor de $519 \pm 53,11\mu$ a las 3 semanas.

Si analizamos por grupos:

Grupo control (tibia no operada)

El grosor medio de la zona interna de la fisis en las tibias no operadas, fue de $681,0 \pm 56,84\mu$, el de la zona media de $606,58 \pm 75,29\mu$, el de la externa de $527,34 \pm 36\mu$ y la diferencia de grosos entre zona interna y externa fue de $121 \pm 56,09\mu$. (Tabla 8.10)

G1 (3 días)

El grosor medio de la zona interna de la placa de crecimiento a los 3 días, fue de $1224,15 \pm 165,34\mu$, el grosor de zona media fue de $734,8333 \pm 172,20\mu$. Y el grosor en la zona externa fue de $520,50 \pm 77,98\mu$. Siendo la diferencia de grosor entre las 2 zonas de los extremos de la placa de crecimiento $709,15 \pm 187,57\mu$. [$p = 0,001$] (Tabla 8.10)

G2 (1 semana)

El grosor medio de la zona interna de la placa de crecimiento en el G2, fue de $1606,81 \pm 465,92\mu$, el grosor de la zona media fue de $530,33 \pm 87,66\mu$, siendo el de la

zona externa de $496,66 \pm 67,41 \mu$. Y la diferencia de grosor entre las zonas interna y externa de la fisis $1110,15 \pm 400,4 \mu$. [$p=0,011$] (Tabla 8. 10)

G3 (2semanas)

El grosor medio de la zona interna en el G3, fue de $1739,33 \pm 741,6 \mu$, el de la zona media $795,33 \pm 230,08 \mu$, y el de la zona externa fue de $621,66 \pm 113,83 \mu$. Siendo la diferencia de grosor $1003,66 \pm 707,63 \mu$. [$p=0,051$] (Tabla 8.10)

G4 (3 semanas)

El grosor medio de la zona interna del G4 fue de $716,5 \pm 75,89 \mu$, el grosor medio de la zona media $594,66 \pm 62,19 \mu$. El grosor externo de $519,96 \pm 53,11 \mu$, siendo la diferencia de grosor de $170,15 \pm 105,46 \mu$. [$p=0,117$] (Tabla 8.10)

8.4.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA PLACA DE CRECIMIENTO.

A continuación, se describe brevemente las características principales de los condrocitos de las distintas capas de la placa del crecimiento (Fig. 8.12).

- La zona de reserva o germinativa: Los condrocitos tienen un contorno esférico, pueden estar en solitario o formando agrupaciones de pares, tienen el mismo tamaño que las que se encuentran en la zona proliferativa. La celularidad de la zona es baja comparada con otras zonas de la fisis. Estas células, están separadas unas de otras, por matriz extracelular, pero ésta es más abundante que en cualquier otra de las zonas de la placa de crecimiento.

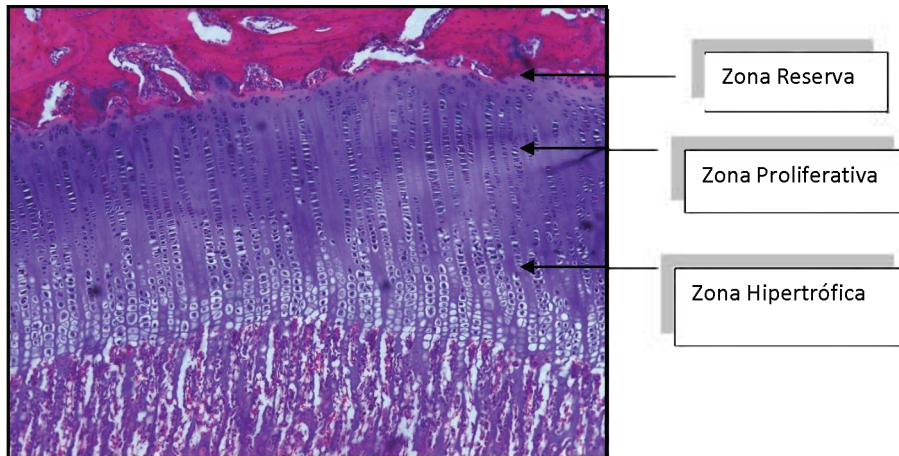


Fig.8.13. Placa crecimiento Conejo: En la figura se observan las diferentes capas de la placa de crecimiento en un corte histológico de conejo

- La zona proliferativa o en pila de monedas también llamada columnar: los condrocitos son aplanados y están orientados en columnas.

- **La zona hipertrófica:** los condrocitos tornan esféricos, aumentado hasta 5 veces su tamaño respecto al de la capa proliferativa. Los cambios de morfología de las células son bastante bruscos, y en la frontera entre la capa proliferativa y la hipertrófica, se pueden diferenciar perfectamente cada uno de los dos tipos celulares¹.



Fig. 8.14. Placa Crecimiento Humano: Imagen de la placa de crecimiento normal en el tibia proximal de un humano.

La fisis humana histológicamente es semejante a la del conejo. (Fig. 8.14, Fig.8.15 A-B)

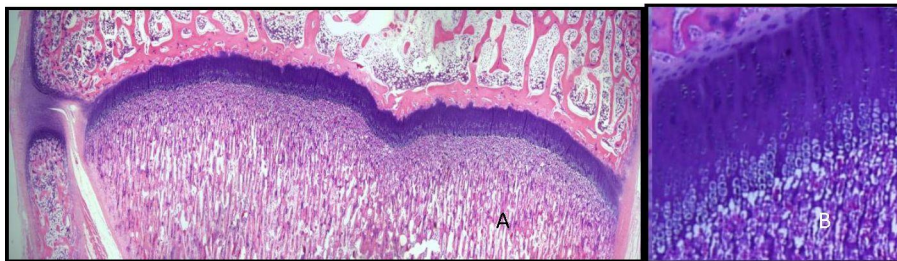


Fig.8.15. Placa crecimiento conejo II: A-B A: Detalle de la placa de crecimiento normal en el tibia proximal en un conejo. B: Muestra de manera ampliada, los condrocitos esféricos de la zona germinal, la estructura columnar de la zona proliferativa y los condrocitos de gran tamaño en la zona hipertrófica.

En la placa de crecimiento de la pata control, se observa la organización normal de la placa fisaria, zona germinal, con condrocitos esféricos ordenados sin formar agrupaciones, zona proliferativa donde los condrocitos pierden su forma esférica y se

tornan aplanados, y están ordenados en columnas a modo de pila de monedas, y la zona hipertrófica, con condrocitos de gran tamaño y de morfología esférica, los vasos están presentes en la zona epifisaria y metafisaria. (Fig. 8.15 A B)

La técnica histológica utilizada fue la siguiente, las tibias eran fijadas en formaldehído al 4%, y decalcificada en ácido fórmico al 40%. Se realizaban cortes completos de 1-2 mm de grosor en la parte más ancha del platillo tibial. (Fig.8.16) Posteriormente se obtuvieron cortes histológicos de 4-5 micras teñidos con hematoxilina eosina (Fig.8.17A-B)

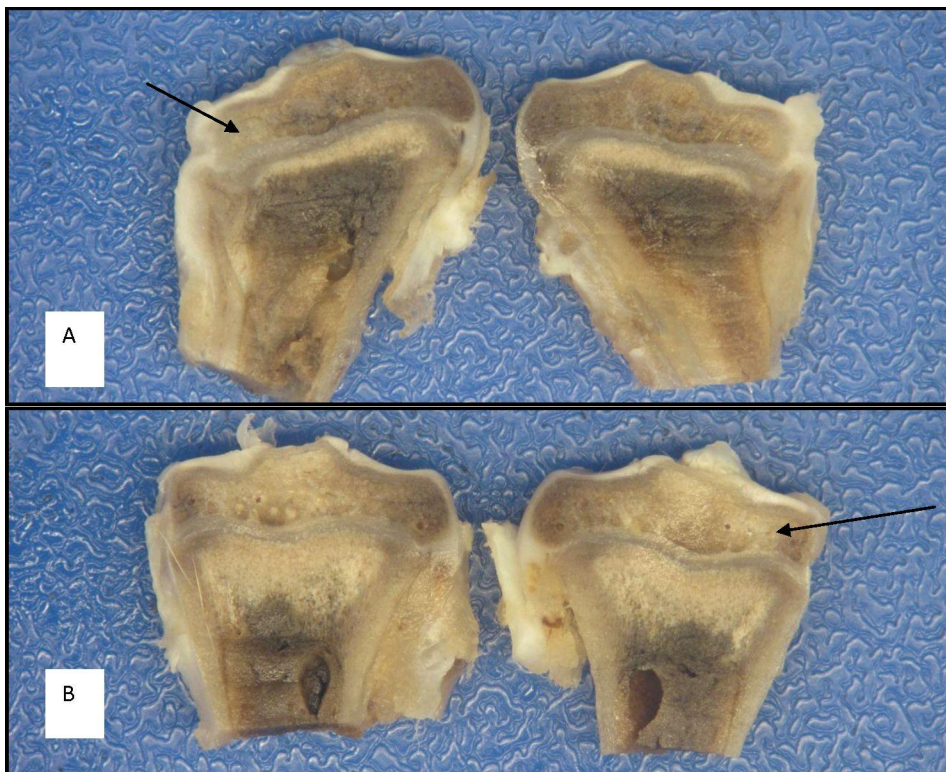


Fig. 8.16 A: Tibias operadas B: Tibia control. Imagen del corte de la pieza anatómica de la tibia proximal. Se puede observar la morfología de la fisis (flechas).

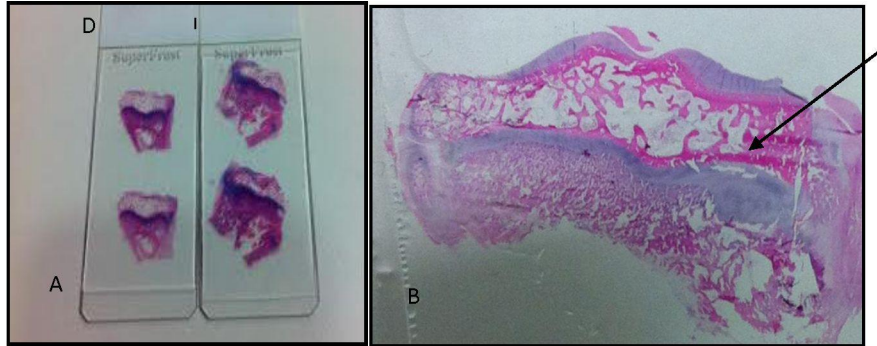


Fig. 8.17 (A-B). Muestras Histológicas: A. Imagen de la preparación histológica del conejo, pata Derecha y pata Izquierda. B. Detalle de la preparación, se observa la placa de crecimiento, obsérvese el engrosamiento en la zona interna de la placa de crecimiento en relación con la zona externa (Flecha)

Si analizamos las tibias según el momento del sacrificio, los resultados morfológicos muestran:

❖ HISTOLOGIA G1. EUTANASIA a los 3 DÍAS.

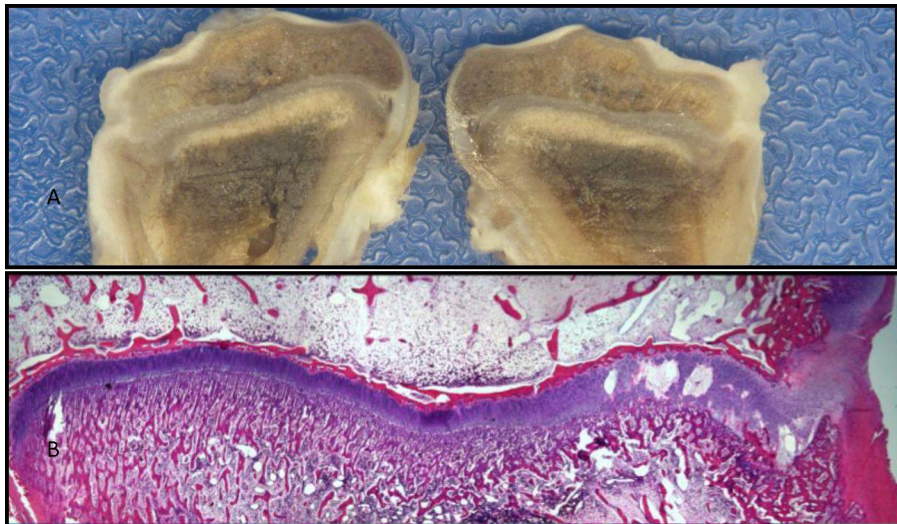


Fig. 8.18 A B. G1: Conejo nº 1. Pata Derecha. A: Pieza anatómica: En la imagen se observa el corte de la pieza anatómica a los 3 días. B: Panorámica Histología: Aquí se puede ver la imagen completa de la placa fisaria a los 3 días teñida con hematoxilina-eosina.

Este grupo destacó por:

- 1) El engrosamiento afecta tanto a la zona interna como a la zona medial (aunque esta está parcialmente aumentada) de la placa en relación a la zona externa, que es observable ya macroscópicamente en la pieza anatómica, tal y como se advierte en la imagen de la totalidad de la placa de crecimiento. (Fig. 8.18 A-B, Fig.8.19)
- 2) La existencia de unos espacios vacíos que ocupan el espesor de la placa en su zona interna.
- 3) La pérdida de la organización columnar de los condrocitos proliferativos.

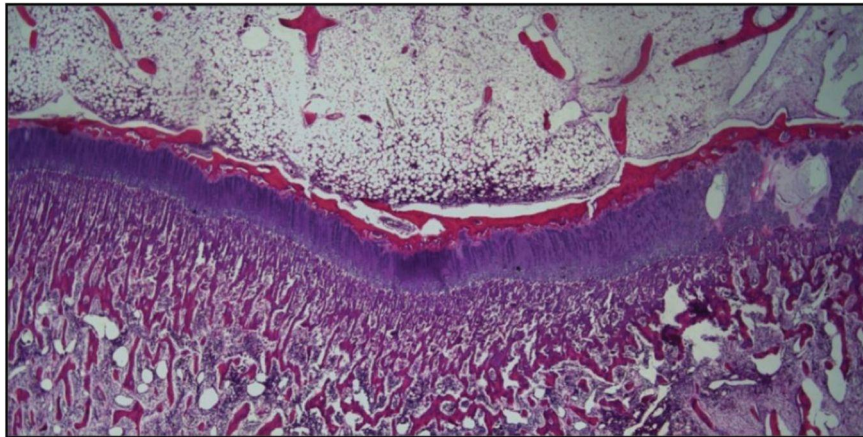


Fig. 8.19. G1: Conejo nº1 pata D. 2x aumentos. Tinción Hematoxilina-eosina (HE). Imagen donde se observa que la zona interna presenta un engrosamiento considerable respecto a la zona externa y visualizándose las lagunas o espacios intercelulares en el espesor de la placa crecimiento en la zona interna. la zona medial está parcialmente aumentada.

Morfológicamente se observó:

- Ausencia de cambios reseñables en la zona germinal o de reserva.
- Se observan focos de hemorragia con restos de fibrina, y los condrocitos proliferativos -hipertróficos alrededor de la laguna muestran desorganización y pérdida de la disposición columnar. (Fig. 8.20)
- Existencia de lagunas o espacios intercelulares, acelulares. Estas lagunas son confluentes entre sí, y presentan tamaños variables. Están rodeadas de

material fibrinoide. En la mayoría de las ocasiones se encuentran vacíos de contenido en el 1/3 interno de la placa de crecimiento, en otras, los espacios presentan material proteico en su interior. (Fig. 8.21)

- Los condrocitos tanto de la capa proliferativa como hipertrófica, han perdido su disposición columnar, organizándose en agrupaciones de par, alrededor de la laguna. Las lagunas llegan a afectar a todo grosor de la placa de crecimiento, (ocupando tanto la zona proliferativa como hipertrófica) sin llegar nunca a afectar a la zona germinal o reserva. (Fig. 8.21)

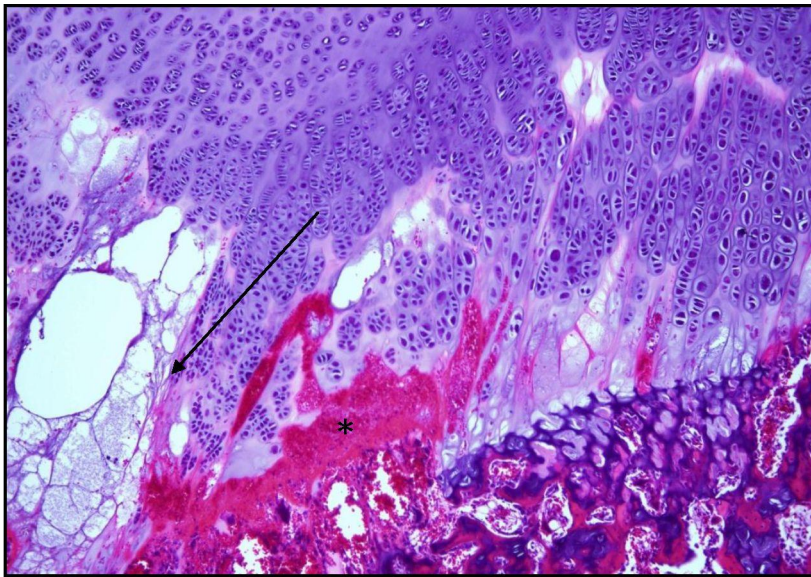


Fig. 8.20. G1: Imagen del Conejo nº2 pata derecha (D), zona interna, a 10x aumentos. Tinción HE; En esta imagen en el margen inferior izquierdo, se observan las lagunas intercelulares, con material proteínico en su interior, revestidas de fibrina (flecha) y focos hemorrágicos en la zona hipertrófica. (Asterisco). Es visible también la desorganización de los condrocitos proliferativos e hipertróficos, presentando una pérdida de su disposición columnar.

Las lagunas o espacios intercelulares ocupan casi la totalidad la placa de crecimiento. Son claramente distinguibles de un artefacto, ya que presentan por un lado, morfología de distintos tamaños, están separadas entre sí, no muestran separación abrupta de las células, tal y como haría un artefacto, y además muestran tal y como se observa en la imagen un revestimiento de fibrina, característica que no presentan los artefactos. (Fig. 8.22)

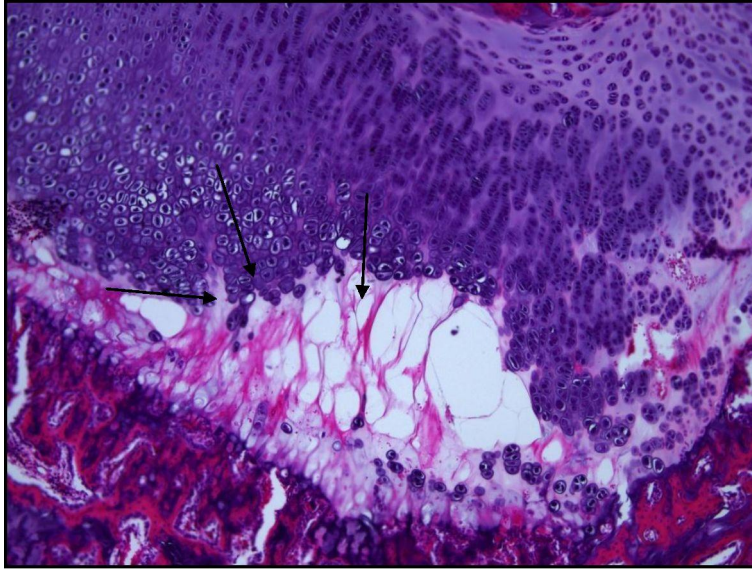


Fig. 8.21. G1: Conejo nº1 (D, zona interna. 10x aumentos). Tinción HE. En esta imagen, a mayor aumento, tiene como característica principal, la existencia de fibrina. (Flechas). La laguna está rodeada de condrocitos hipertróficos embebidos en material fibrinoide

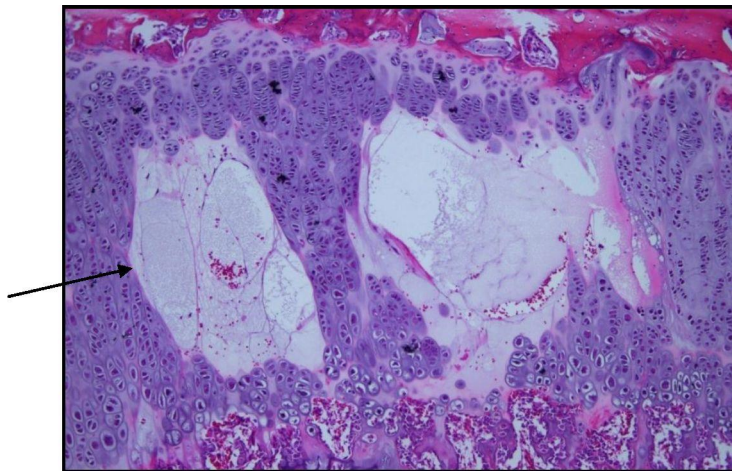


Fig. 8.22. G1: Conejo nº 2(D, zona interna x10) Tinción HE. Se observa las lagunas de gran tamaño incluidas en el espesor de la placa de crecimiento Así como la desorganización de los condrocitos tanto de la zona proliferativa como de la zona hipertrófica. La flecha señala el revestimiento de fibrina.

En la figura a continuación se observa la placa de crecimiento del conejo control, obsérvese que el grosor y la morfología de la zona externa es semejante a la de la zona interna de la placa del crecimiento. (Fig. 8.23 A-B)

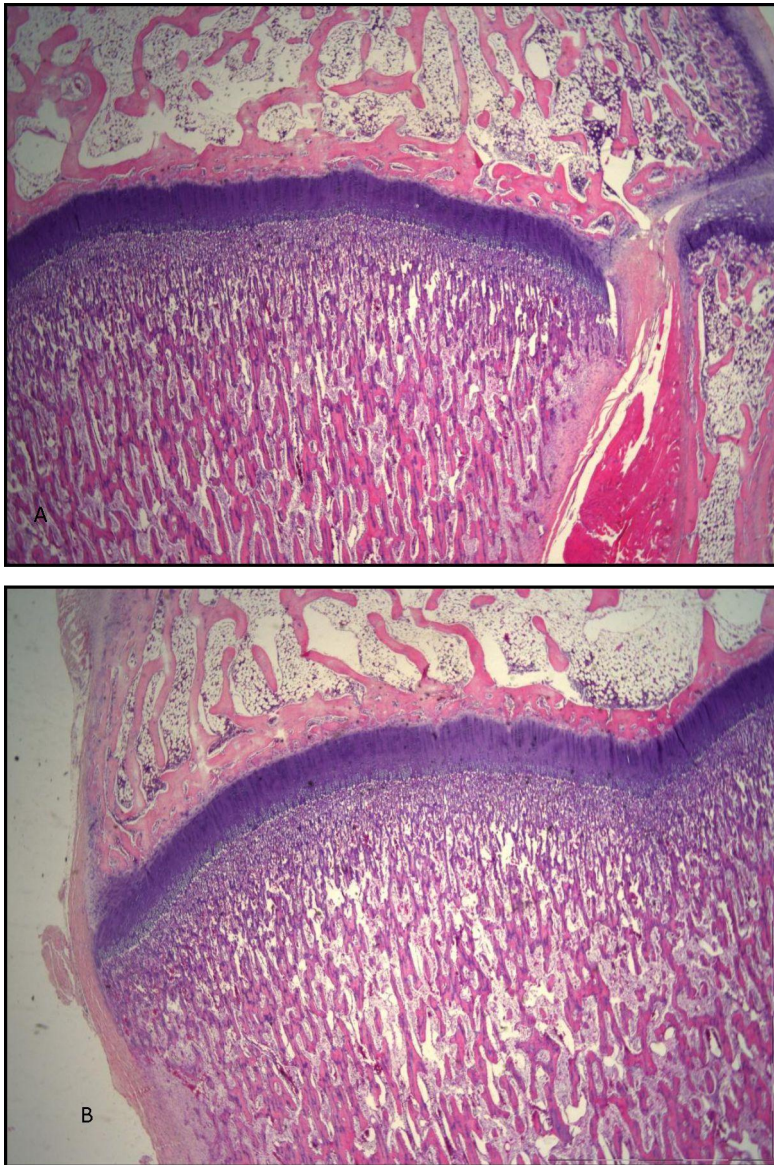


Fig. 8.23. (A-B) G1 control. Imagen de la placa de crecimiento correspondiente a la pata control (izquierda) conejo nº 2, del G1. A: zona externa, B: zona interna. Tinción Hematoxilina-eosina (HE)

❖ HISTOLOGÍA G2. EUTANASIA a la 1 SEMANA

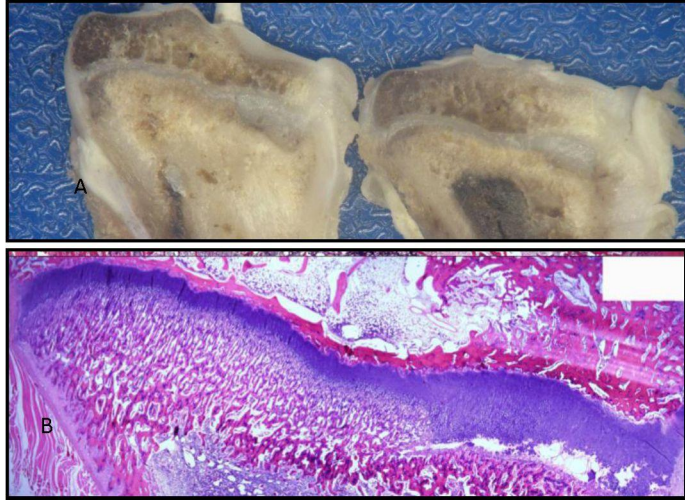


Fig. 8.24 (A-B). G2: Conejo nº 8. Pata Derecha. A: Pieza anatómica: Imagen de la pieza anatómica a la izquierda B: Panorámica histología: imagen panorámica de la placa de crecimiento en el G2 (1semana) muestra teñida con hematoxilina-eosina.

Este grupo desatacó:

- 1) Las lagunas o espacios ya no ocupan el grosor de la placa de crecimiento, sino que han quedado recludas al tercio inferior (Zona hipertrófica).
- 2) Descenso en el número y tamaño de las lagunas o espacios.
- 3) Los condrocitos en el tercio superior de la fisis recuperan su disposición columnar.
- 4) El grosor de la fisis continúa aumentado. Esto es observable macroscópicamente en la pieza anatómica. (Fig.8.24)

Morfológicamente se observó:

- El grosor en la zona interna de la placa de crecimiento, continua aumentado respecto a la zona externa, y se observan (Fig.8.25 A-B) que el espacio ocupado

por las lagunas ha disminuido, y presentan su localización de manera predominante en el tercio inferior.

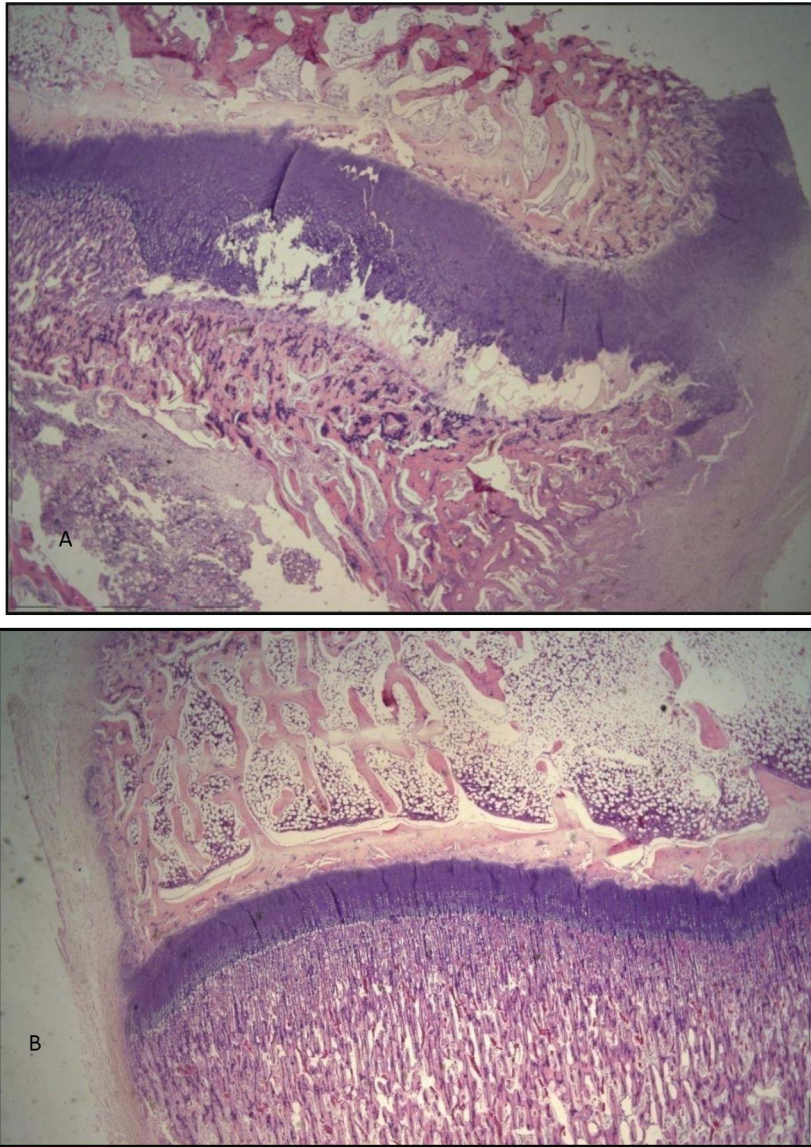


Fig.8.25 (A-B). G2: Conejo n°7. Pata Derecha x2 aumentos. Tinción HE. En esta imagen se puede observar primero, la diferencia de grosor de la placa en la zona interna respecto a la externa, y la existencia de lagunas o espacios intercelulares en la zona interna. Localizándose estos en el tercio inferior de la placa.

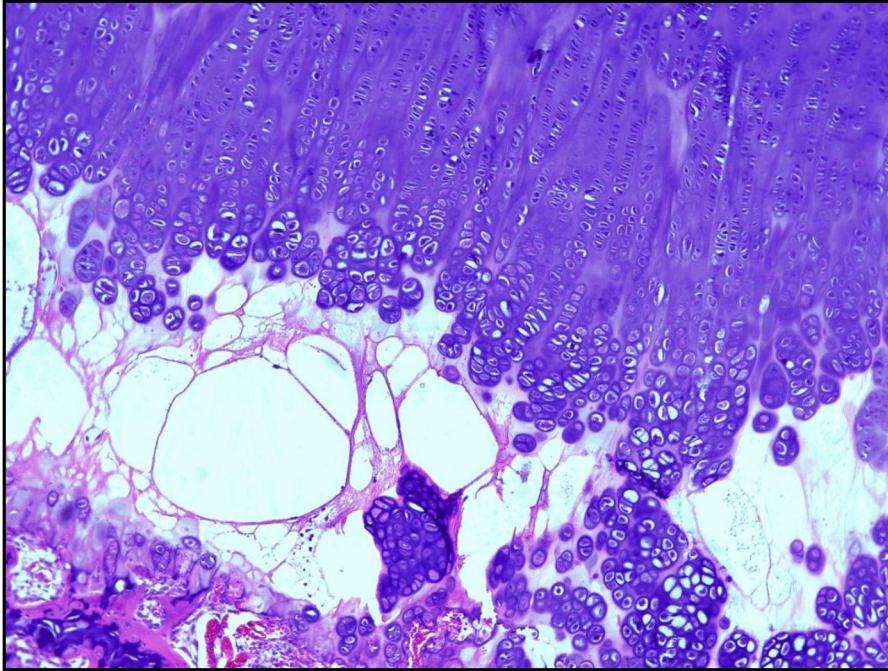


Fig. 8.26. G2: Conejo nº2. (Derecha, zona interna) x10 aumentos. Tinción HE. Se observa en esta imagen como el tercio superior de la placa ha recuperado la disposición columnar. Mientras que el tercio inferior está ocupado con las lagunas.

- La placa de crecimiento, en este grupo G2, va recuperando poco a poco su morfología, la altura de la placa sigue aumentando, respecto a la zona externa, pero los condrocitos proliferativos, del tercio superior de la fisis, recobran su disposición columnar, aun así los condrocitos hipertrofos continúan formando grupos desordenados. (Fig. 8.26)
- Las lagunas en esta fase, presentan células en su interior, de aspecto fibroblástico inmaduro de configuración fusiforme o estrellada y de distribución deorganizada no fascicular (Fig. 8.27). Se observan también como los vasos de la zona de calcificación penetran en el tercio inferior de la placa de crecimiento.

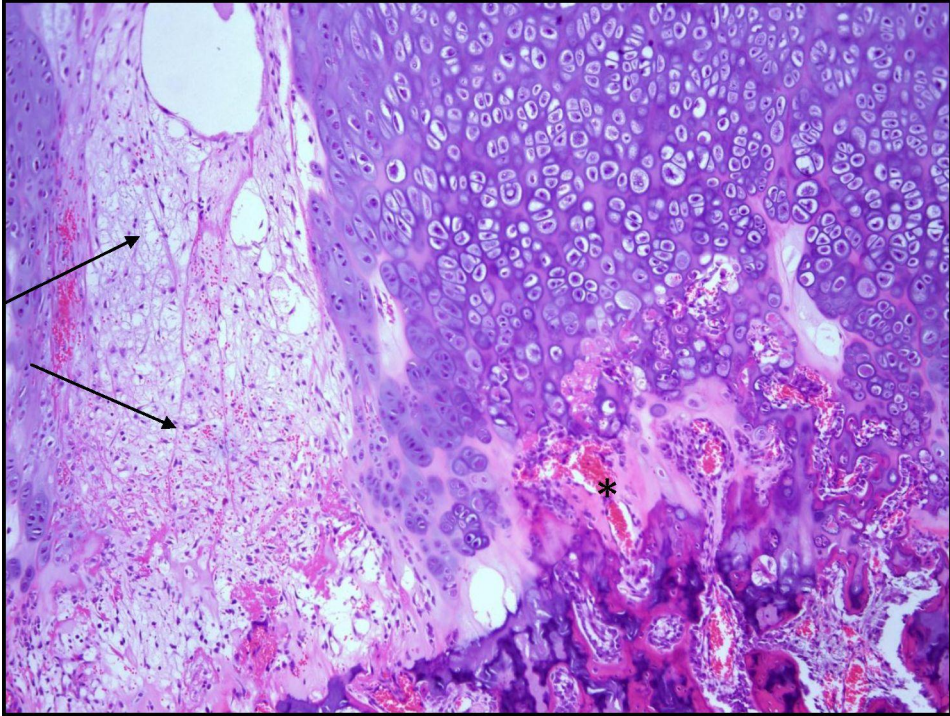


Fig. 8.27. G2: Conejo nº7 (Derecha, interna x20). Tinción HE. Se observan células de aspecto fusiforme o estrellado y de distribución desorganizada, no fascicular, en el interior de las lagunas. (Flechas) (*) Los vasos de la zona de calcificación penetran en el tercio inferior de la placa de crecimiento

Las tibias control en este grupo al igual que en el G1 presentaban una morfología bien conservada con clara separación entre zonas y todas las células conservaban las características de su zona.

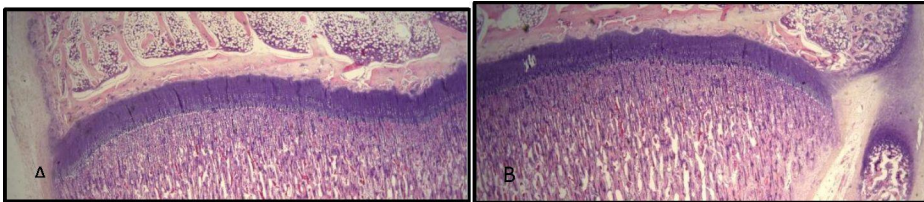


Fig. 8.28. Placa de crecimiento G2 control. Conejo 15 x2 aumentos.. La morfología de las distintas capas esta conservada

❖ HISTOLOGÍA G3. EUTANASIA a las 2 SEMANAS

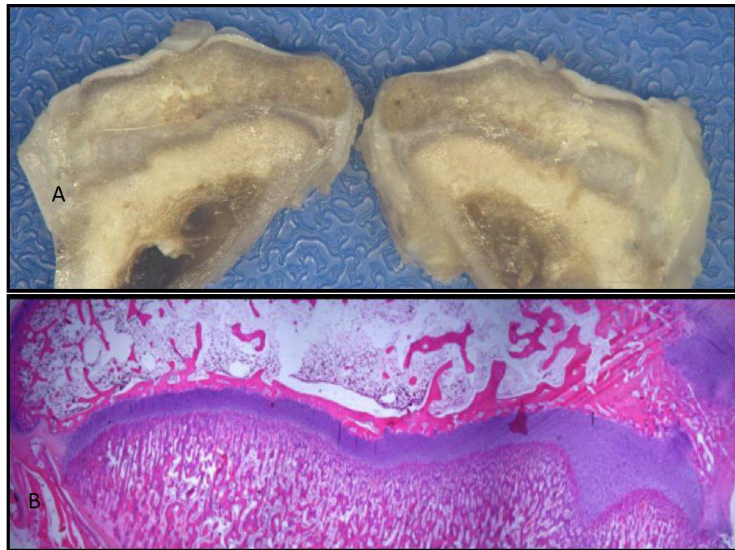


Fig. 8.29 (A-B) G3: Conejo n° 11. Pata D. A. imagen del corte anatómico de la tibia proximal en el G3, B: Imagen panorámica de la placa de crecimiento. Obsérvese, como en el corte de la pieza anatómica, es notable el ensanchamiento de la placa en la zona interna.

Este grupo destacó:

- 1) El grosor de la placa ya no es tan evidente en la zona medial, y queda restringido a la zona más interna (Fig.8.29A-B) que sigue siendo observable macroscópicamente en la pieza anatómica.
- 2) La desaparición de las lagunas o espacios intercelulares.
- 3) La recuperación de la organización columnar de los condrocitos. (Fig.8.30)

Morfológicamente se observó:

- En este grupo, la placa de crecimiento va recuperando su forma, aunque la placa aun presenta cierta irregularidad. La fisis presenta un engrosamiento menor. No observándose lagunas. En los Grupos G1, y G2, las lagunas o espacios intercelulares eran espacios acelulares con fibrina y restos de sangre, pero a partir de la segunda semana, estos espacios se fueron rellenando, desapareciendo completamente en el G3.

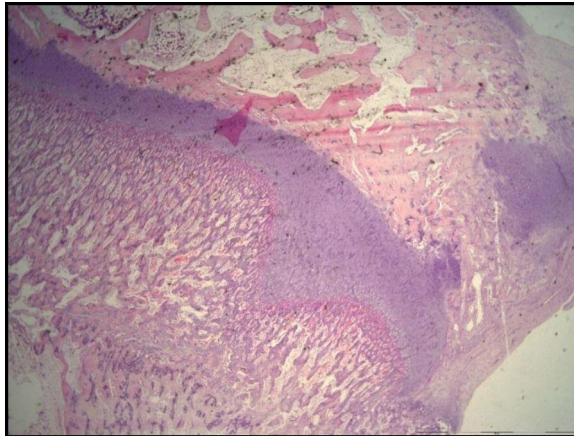


Fig. 8.30. G3: Conejo 11 Derecha. X2 aumentos. Tinción HE Imagen del corte histológico a las 2 semanas, donde se observa el menor engrosamiento de la zona interna de la placa respecto la zona central. Siendo evidente la no existencia de lagunas.

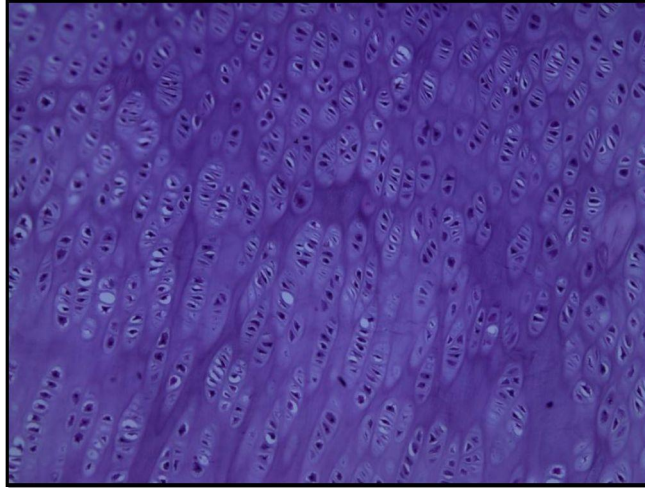


Fig.8.31. G3: Imagen de conejo nº 11 (pata Derecha, zona interna de la placa) a 20x aumentos. Tinción: Hematoxilina-Eosina, esta imagen muestra el comienzo de la organización columnar de los condrocitos proliferativos.

- Una de las características histológicas de este grupo G3, es que los condrocitos proliferativos e hipertróficos, han recuperado su disposición columnar, tal y como se observa en la Figura 8.31, en la que empieza a recordar la disposición en pila de monedas típica de los condrocitos proliferativos.
- Se observa la re-estructuración de la placa fisaria, la disposición columnar de los condrocitos, y no se observan lagunas o espacios, se distinguen perfectamente las capas de la placa fisaria, diferenciándose claramente, las tres zonas. (Fig. 8.32)
- Una vez más la placa en la tibias control están ordenadas y con una clara diferenciación entre zonas. (Fig. 8.33 A-B)

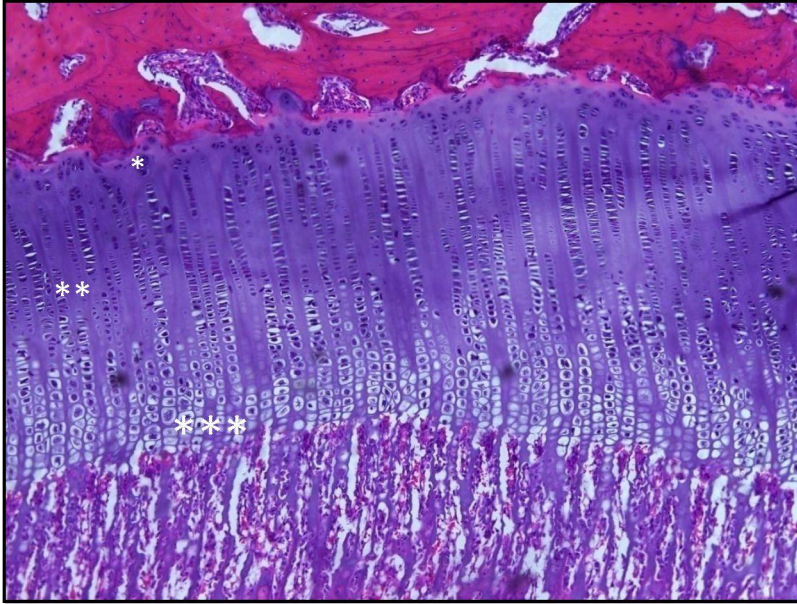


Fig. 8.32 G3: Imagen del conejo nº 12 pata izquierda.x10.Tinción HE. En el Grupo G3, destaca la reorganización de la placa fisaria, recuperando su forma normal. Observe las capas en las que se divide la fisis. (Asterisco): la zona reserva (*), la zona proliferativa(**) y la zona hipertrófica (***)

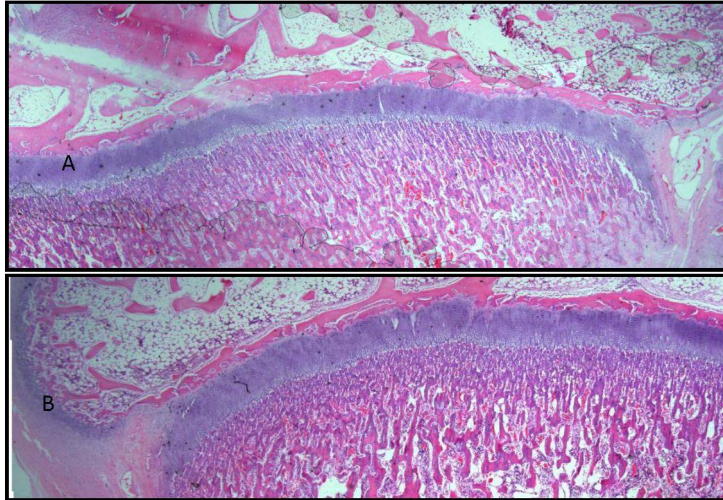


Fig. 8.33 (A-B) G3. Placa de crecimiento pata control nº 13 pata izquierda. X2. Tinción HE. A: externa, B: interna

❖ HISTOLOGIA G4. EUTANASIA A LAS 3 SEMANAS.

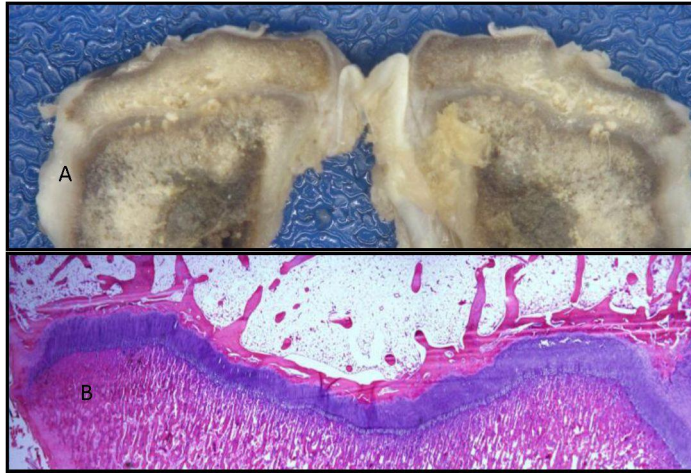


Fig. 8. 34(A-B)G4: Conejo n° 18. A: imagen del corte histológico, B: imagen panorámica de la placa de crecimiento. Tinción HE.

Este grupo destacó:

- 1) El grosor y la morfología de la placa de crecimiento en la zona interna, es semejante a la zona externa (Fig.8.34 A-B), como se puede observar en la pieza anatómica y en la panorámica de la placa de crecimiento.
- 2) La fisis a las 3 semanas post-hemiepifisiodesis vuelve a presentar un aspecto normal.

Morfológicamente se observó:

- En este grupo G4, no se observan cambios en la placa de crecimiento, ni en grosor ni cambios en la morfología celular, respecto a la placa de crecimiento normal. (Fig. 8.35)



Fig. 8.35. G4: Conejo nº 16 pata D. x2 Tinción HE. Imagen panorámica de la placa de crecimiento a las 3 semanas post-hemiepifisiodesis, se puede observar que la parte interna (izquierda de la imagen) y la parte externa (derecha de la imagen) son bastante semejantes, tanto en grosor como en la morfología de las células.

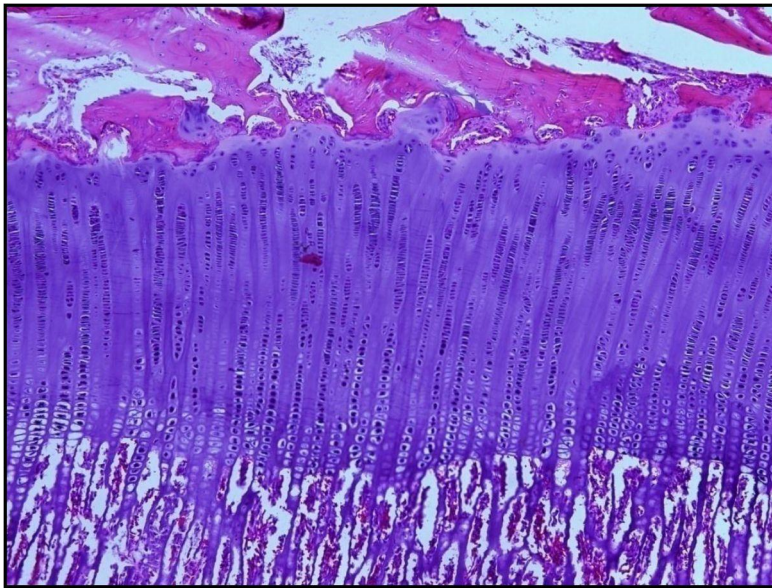


Fig.8.36. G4: Imagen del conejo nº 16, pata D zona interna x10. Tinción HE. Se puede observar los condrocitos organizados en columnas.

- La estructura fisaria a las 3 semanas post-hemiepifisiodesis presenta un aspecto normal, la morfología es semejante a una fisis sin haber sufrido intervención. (Fig.8.36)
- Se observan los condrocitos en la zona de reserva de contorno esférico, en solitario o en formando agrupaciones en pares, posteriormente los condrocitos en la zona proliferativa, de aspecto aplanados, están alineados en columnas, con el eje mayor de la célula perpendicular al eje mayor del hueso, esta

disposición recibe el nombre de "pila de monedas", y los condrocitos esféricos de mayor tamaño de la zona hipertrófica.

- La frontera entre la capa proliferativa e hipertrófica es brusca, se puede apreciar perfectamente, cada uno de los dos tipos celular, hecho que no ocurría en los grupos anteriores. Sobre todo en G1, G2 y en menor medida en el G3. (Fig. 8.36)
- No se aprecian diferencias en las tibias control en este grupo con respecto a las tibias control de los otros grupos.

8.4.3. 5'-Bromo 2'-deoxiuridina (BrdU)

La 5'-Bromo 2'-deoxiuridina, BrdU, se utilizó para evaluar la actividad celular de la placa de crecimiento. La BrdU se inyectó intra-peritoneal 1 hora antes del sacrificio. Para eliminar los efectos de la variación diurna del ADN, todos los conejos fueron sacrificados a la misma hora del día⁸⁶.

En los grupos G1, G2, G3 se utilizó el marcaje con BrdU. Se realizó un recuento del número de células con el núcleo teñido dividido por el número de núcleos presente en el campo. El índice se estudió para las diferentes zonas de la fisis: zona de reposo, zona de proliferación, y zona hipertrófica.

Siendo:

$$\text{BrdU labeling index} = \frac{\text{n}^{\circ}\text{núcleos teñidos}}{\text{n}^{\circ}\text{células}}$$

En el análisis de los patrones de distribución de las células marcadas con BrdU en la distintas zonas revela que la captación de BrdU se limitó a aquellas células que tienen el ADN en fase S (están en proliferación). Observándose la mayor captación en la zona proliferativa. No se observó captación en la zona hipertrófica.

El análisis de la captación de BrdU, se realizó de manera descriptiva, según grupos.

Se dividió la placa de crecimiento en zona interna y zona externa, dividiéndose cada una en zona basal o de reserva, zona proliferativa, zona hipertrófica. En algunas secciones el índice de captación de BrdU fue cero. La actividad celular de las diferentes partes de la fisis fue comparada con la fisis control en la tibia control.

❖ Grupo G1.

Este grupo destacó por:

- 1) La captación de BrdU en la zona de reserva y en la zona proliferativa de la parte interna placa crecimiento.
- 2) La disminución de la captación de BrdU en la parte no sometida a hemiepifisiodesis (parte externa de la placa crecimiento) con respecto a la parte interna.
- 3) La no captación de BrdU en la tibia control.

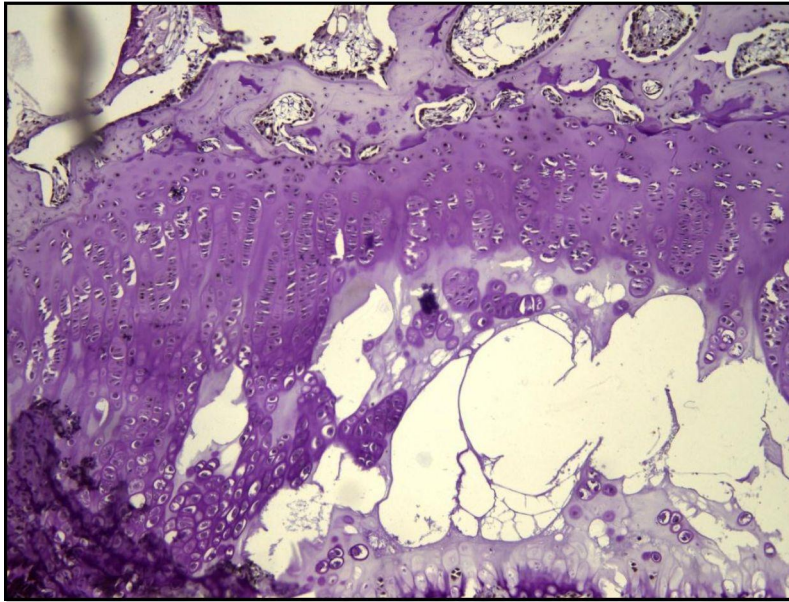


Fig.8.37. G1-BrdU.Conejo n°2 (Derecha, interna x 10 aumentos).Imagen de la placa de crecimiento en su parte interna a los 3 días post-hemiepifisiodesis después de utilizar la técnica de inmuno- histoquímica BrdU.

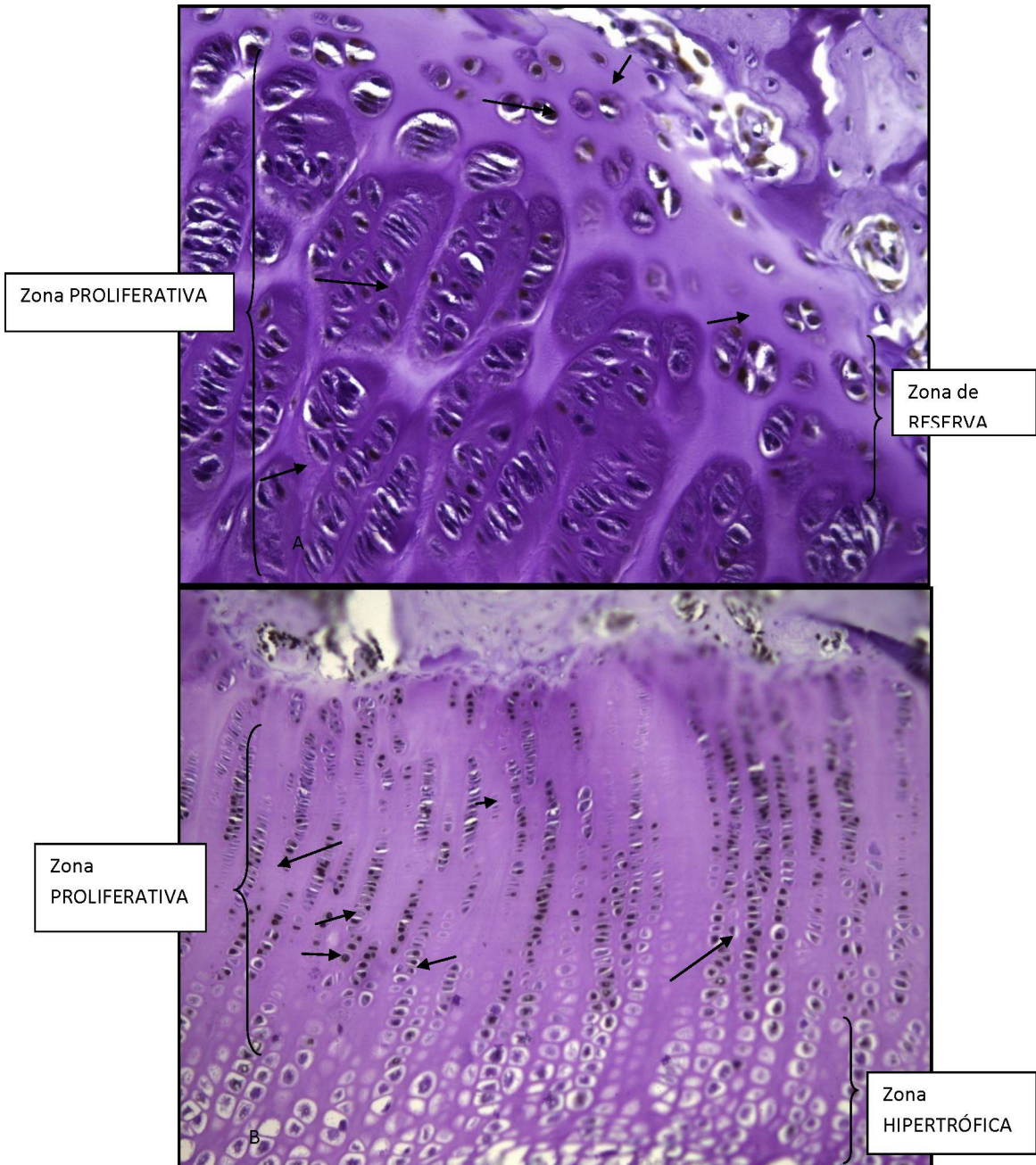


Fig. 8.38 (A-B).G1-BrdU: Conejo nº2, pata D, interna x20. Tinción de la zona interna de la placa de crecimiento, obsérvese la captación de BrdU en los núcleos de la zona de reserva o germinas y la proliferativa. (Flechas), y como en la zona hipertrófica no se observa captación

En la imagen (Fig.8.37), se observa la placa de crecimiento, tras utilizar la técnica de inmuno-histoquímica BrdU. Se puede observar la captación de la BrdU, por la tinción de los núcleos, tanto en la zona de reserva como en la zona proliferativa. Obsérvese también las lagunas o espacios intercelulares y la desorganización de las columnas, explicadas anteriormente.

Se observan los núcleos marcados positivamente, se muestran teñidos a modo de granulo marrón oscuro. La captación está presente en la zona de reserva y proliferativa y no se observa captación en la zona de hipertrófica. (Fig.8.38.A-B, Fig.8.39)

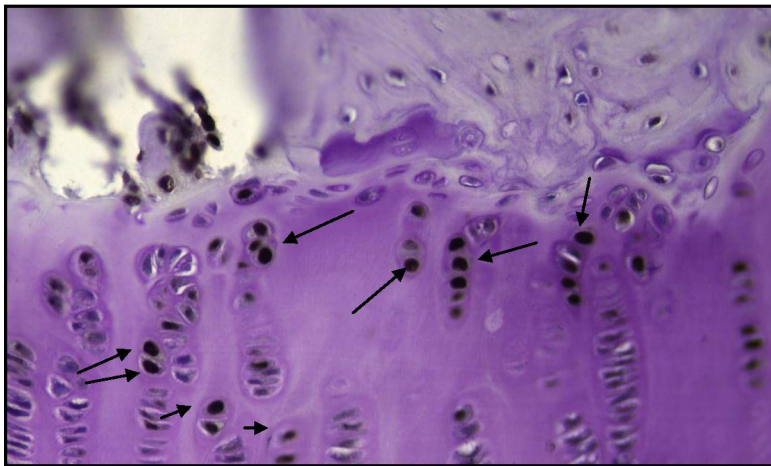


Fig. 8.39. G1-BrdU: Conejo nº2, pata D, interna x40 .Imagen en la que se muestra a mayor aumento los núcleos marcados positivamente, siendo éstos teñidos de marrón oscuro (Flechas)

En la parte externa de la placa de crecimiento de la tibia sometida a hemiepifisiodesis, se observa escasa captación de BrdU. (Fig. 8.40) y en la tibia control (tibia no operada) no se observa captación de BrdU en ninguna de sus capas. (Fig. 8.41)

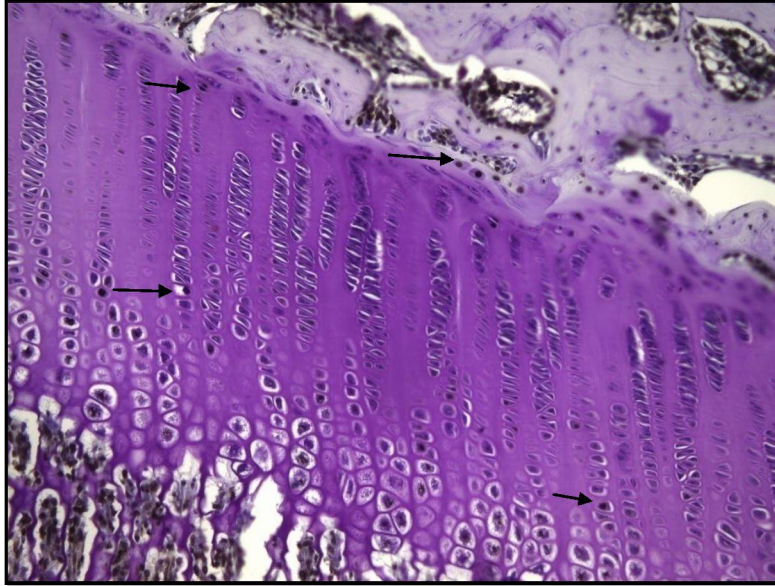


Fig. 8.40. G1-BrdU: Conejo nº3, pata D externa x10. Imagen en la que se observa la parte externa de la placa de crecimiento en un conejo del G1. Se observa menor captación de BrdU en los condrocitos de la zona de reserva (Flechas).

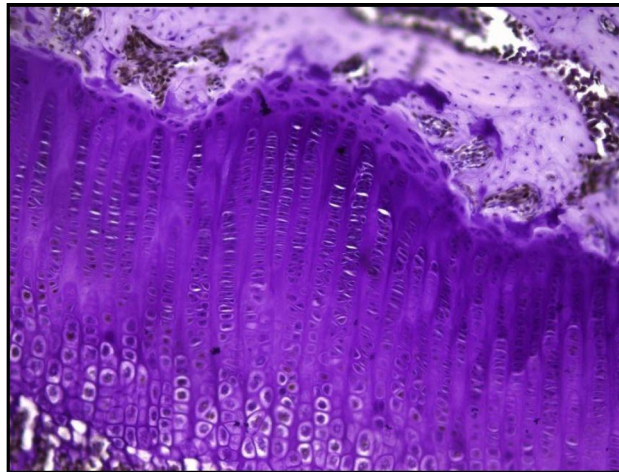


Fig. 8.41. G1-BrdU control: Conejo nº 1, pata izquierda, interna, x 10. En la imagen se muestra la parte interna de la placa de crecimiento de una tibia control, no se observan condrocitos marcados con BrdU

❖ Grupo G2.

Este grupo destacó por:

- 1) La captación de BrdU se reserva a la zona proliferativa de la parte interna placa crecimiento.
- 2) El interior de las lagunas o espacios intercelulares se marcan con BrdU, células en proliferación.

En este grupo, continúan marcados los condrocitos de la zona proliferativa de la zona interna de la placa de crecimiento, en mucha menor medida los de la zona de reserva siendo observados de manera ocasional. En la zona externa no se observa captación de BrdU, tal y como se muestra en la figura a continuación, (Fig.8.42). En esta zona externa, se observa la disposición columnar de los condrocitos proliferativos, observándose una menor captación de BrdU. También ocurre en las tibias control, la captación de BrdU, es mínima, estando limitada a la zona proliferativa.

Lo más característico de este grupo G2, tal y como habíamos visto en el apartado anterior, era que las lagunas o espacios intercelulares, comenzaban a ocuparse de células de aspecto fusiforme, que presentaban una distribución desorganizada. (Fig. 8.27)

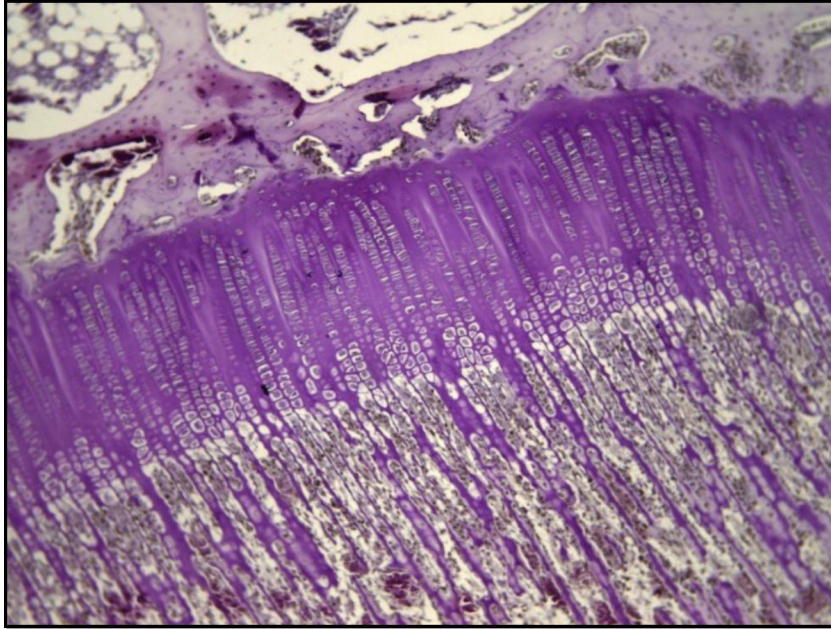


Fig. 8.42. G2-BrdU: Conejo nº 7.pata D. externa, x10.Imagen de la parte externa de la placa de crecimiento, nótese la disposición columnar de los condrocitos, y la diferenciación tan marcada que existe entre las tres capas, reserva en la parte superior de la placa, proliferativa en la parte media, e hipertrófica en la parte inferior de la misma. En esta zona externa, no observamos ninguna captación de BrdU, no objetivamos núcleos marcados.

Tras la técnica de inmuno-histoquímica con BrdU, se observó que estas células estrelladas se marcaban con BrdU, esto indica síntesis de ADN y por tanto nos encontramos con que estas células son células proliferativas. (Fig.8.43)

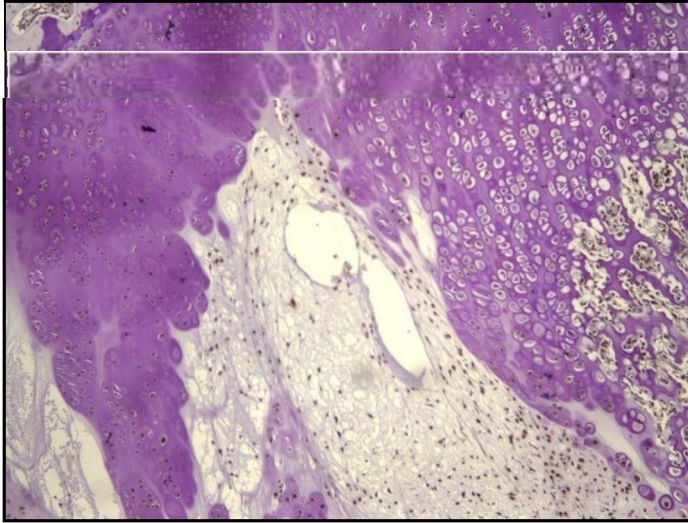


Fig. 8.43. G2-BrdU: Conejo nº 7. Pata D .interno. X20. Imagen en la que se muestran como las lagunas o espacios intercelulares son invadidos por células estrelladas que están teñidas con BrdU (indica síntesis de ADN), sospechándose que son células proliferativas.

Esta imagen anterior (Fig.8.43) contrasta con la imagen comparativa de las lagunas sin células marcadas en su interior, que se observa a los 3 días. (Fig.8.44)

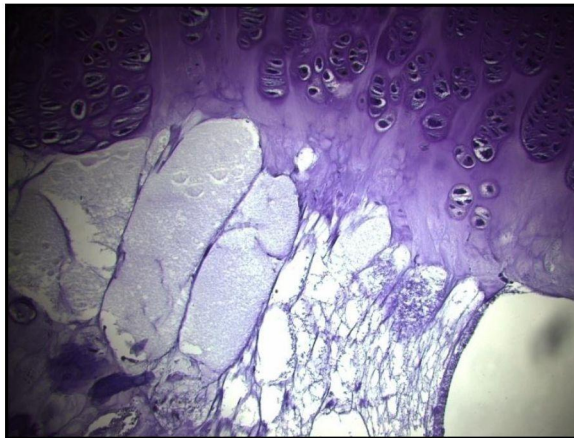


Fig. 8.44. G2-BrdU: Conejo nº 1. Pata D, interno.x40. Imagen de la laguna sin células marcadas en su interior. [Grupo G1], en la que no se observa núcleos marcados

❖ Grupo G3.

Este grupo destacó por:

- 1) La captación de BrdU se reserva a la zona proliferativa de la parte interna y externa placa crecimiento.

En este grupo G3, la placa de crecimiento está recuperando su morfología normal, han desaparecido las lagunas y los condrocitos retoman su disposición columnar. En la tinción de inmuno-histoquímica, no se observan los núcleos teñidos de las células en la zona de reserva. Y los núcleos de los condrocitos proliferativos, aparecen escasamente teñidos en la zona externa, siendo más visibles en la zona interna de la placa de crecimiento. (Fig.8.45)

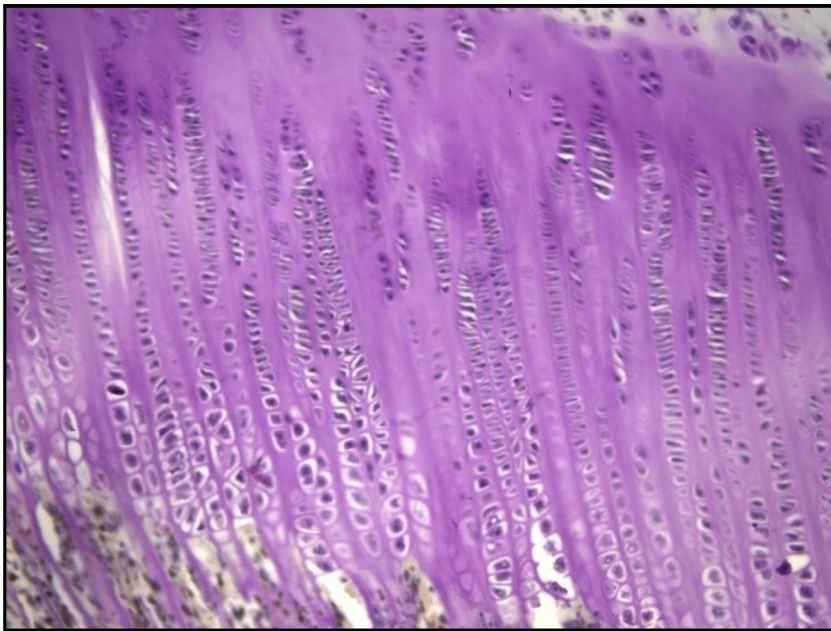


Fig. 8.45. G3-BrdU: Conejo nº11. Pata D. externa x10. Imagen de la placa de crecimiento en la zona externa, se observa la disposición columnar de los condrocitos, y algún núcleo marcado.

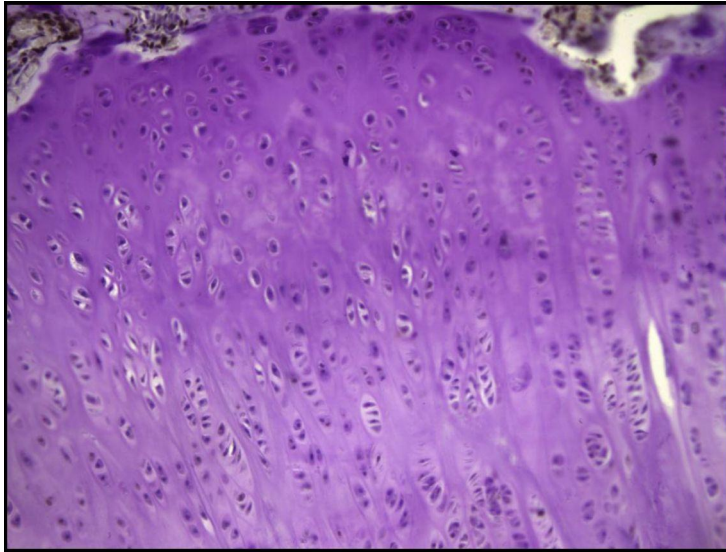


Fig. 8.46. G3-BrdU: Conejo nº 11, pata D, interna.x10 En la imagen se puede observar la parte interna de la placa de crecimiento, los núcleos de las células proliferativa están marcados con BrdU, se aprecia mayor número de núcleos marcados que en la zona externa de la misma placa de crecimiento (Fig. 8.45).Se puede observar además que los condrocitos proliferativos, aunque poco a poco van reorganizándose en columnas, todavía no tienen la configuración de la placa normal.

Capítulo quinto

DISCUSION Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

9. LA FISIS Y LA HEMIEPIFISIODESIS

9.1. FISIS SOMETIDA A COMPRESIÓN

Existe evidencia tanto clínica como experimental que tras la realización de un cierre fisario, ya sea éste parcial (hemiepifisiodesis) o completo (epifisiodesis temporal), la fisis se recupera y reemprende el crecimiento^{46, 49, 51}. Sin embargo, a pesar de que los cambios que ocurren durante el grapado fisario están bien descritos en la literatura^{37, 55, 69}, se desconoce cómo tiene lugar la recuperación de la actividad fisaria.

Durante el grapado fisario y otras formas de compresión de la fisis, se produce un arresto fisario^{49, 50, 68}, pero no están claros los mecanismos como se producen. Trueta³⁷ en 1961, sugirió que durante las fases tempranas de la compresión, tenía lugar un engrosamiento de la zona hipertrófica de la placa fisaria debido a la alteración de la circulación metafisaria secundaria a la compresión. Pero, conforme la compresión se mantenía, éste engrosamiento desaparecía, y la placa de crecimiento empezaba a estrecharse^{26, 27, 51, 61}. Cambios similares, ha sido descritos en estudios de la placa de crecimiento sometida a distracción^{23, 39, 96}.

Esta pérdida de grosor, ha sido confirmada por varios autores^{22, 49, 63, 97}. Erlich²², en un experimento, en el que sometió a compresión mediante grapado, las fisis distales de los fémures de ratas, inicialmente observó un aumento del grosor de la fisis, desorganización columnar en el lado de la fisis donde estuvo la grapa, y posteriormente, observó como la fisis, retornaba al grosor normal. Entre estas fases, destaca que previa a la recuperación del grosor, las columnas se reorganizan. Mediante el marcaje de los núcleos celulares con Tiamina, se observa que tras el grapado, tiene lugar un crecimiento rápido, aumentado la incorporación de [³H] tiamina, para ir disminuyendo la actividad celular a las dos semanas. En su estudio destaca también que aunque disminuyó la división celular, aumentó la producción de matriz²². Sin embargo el engrosamiento previo descrito por Trueta³⁷ y Ehrlich²² no ha sido confirmado por otros autores⁶⁸.

El trabajo de Farum²¹, explica como los condrocitos responden a la aplicación de una presión o fuerza en una placa de crecimiento sometida a un grapado uniaxial (hemiepifisiodesis). El trabajo demostró que tanto en la zona proliferativa como en la

hipertrófica disminuyó la tasa de crecimiento como respuesta al grapado. El cambio más significativo de los condrocitos sometidos a un aumento de presión fue la reducción de la síntesis de ADN, pero no el cese de su actividad. Este descenso de la actividad, se tradujo en un descenso de la captación de BrdU. Pero, este estudio se limita sólo al estudio de la respuesta bajo grapado²².

Pequeñas fuerzas de compresión no afectan a la fisis^{51,97}, debido a que la fisis es una estructura resistente a la compresión, y recupera su disposición una vez que la fuerza cesa⁹⁸. Bonnel *et al*⁶⁹, observó que si aumentamos la fuerza de compresión, las células columnares se hipertrofian, e incluso se pueden llegar a aparecer puentes fisarios y fracturas. Alberty *et al*³⁶, por su parte, opina que la fuerza de compresión afecta a la morfología de los condrocitos²⁶, la placa de crecimiento sometida a compresión presenta desorganización de las columnas de la zona proliferativa, con una reducción significativa de la altura de la zona hipertrófica y proliferativa. Arriola *et al*⁹⁹, también observó una reducción de la altura de la zona proliferativa, asociado a una desorganización de las columnas de condrocitos proliferativos, pero además con una degeneración de los condrocitos hipertróficos. Mientras que Stokes *et al*³³, nota que la disminución del crecimiento longitudinal tras la aplicación de fuerzas de compresión, va asociada a una disminución de los condrocitos de la zona hipertrófica y pero que también la producción de células en la capa proliferativa se vio afectada.

Gottlieb *et al*⁶³ estudió la placa de crecimiento a las 5 semanas de la retirada del material de hemiepifisiodesis, en un modelo animal diferente al nuestro (cerdo), tras someter a la zona medial de la tibia proximal a una hemiepifisiodesis con placa en 8 o grapas durante 9 semanas. En su estudio observa un engrosamiento de la fisis y una marcada desorganización de las células columnares de la placa de crecimiento con ambos métodos de hemiepifisiodesis.

La pregunta que surge es como sucede el cambio de una fisis estrechada y con pérdida de su estructura columnar a una fisis que ha recuperado la estructura normal. Y esta pregunta constituye la base del presente estudio, describir los cambios que tienen lugar en la fisis durante esta fase. Esto es importante porque su comprensión además de ayudarnos a mejorar nuestro conocimiento de la fisiología de la fisis, puede permitirnos entender mejor fenómenos como el crecimiento por rebote, o los mecanismos de reparación de la fisis.

Nuestro estudio inicialmente mostró que a las 3 semanas, la placa presenta un aspecto muy próximo a la normalidad. Nos interesa así pues, estudiar el intervalo de tiempo que va desde la retirada de la hemiepifisiodesis hasta las 3 semanas post-retirada y no somos conscientes de la existencia en la literatura de descripciones histológicas sobre este episodio.

De una manera arbitraria, se decidieron estudiar 3 momentos en el tiempo: 3 días, 1 semana, 2 semanas. El motivo, por el cual no realizamos el estudio inmediatamente post-hemiepifisiodesis, fue por temor a sacrificar animales innecesariamente, ya que si elegíamos un punto demasiado cercano a la retirada de la epifisiodesis, no fuéramos capaces de identificar cambios.

A los 3 días post retirada, se observa una marcada desorganización columnar de los condrocitos de la zona proliferativa, la existencia de espacios o lagunas intercelulares, acelulares que ocupan gran parte del grosor de la placa de crecimiento, tanto en la zona proliferativa, como hipertrófica, sin afectar a la zona germinal. Los cambios se concentran en el lado interno de la fisis, donde destaca un marcado engrosamiento de la zona que correspondía a la hemiepifisiodesis previa, en relación con la zona externa y con la tibia control.

Nuestro grupos G1, G2, presentaron principalmente una hiperplasia de la zona proliferativa e hipertrófica, y una marcada desorganización columnar de los condrocitos proliferativos.

El trabajo de Gottlieb⁶³ como ya hemos mencionado, estudió la fisis del cerdo tras hemiepifisiodesis, pero sólo a las 5 semanas post-hemiepifisiodesis, los cambios que describió posiblemente se correspondan, en nuestro modelo animal (el conejo), a las dos semanas; donde lo único que se observa es engrosamiento. Su estudio desgraciadamente se basa en una simple observación en el tiempo, además describió solo los cambios en la zona central de la fisis, en vez de describir la fisis completa.

Lo más destacable de nuestro estudio es el hallazgo de lagunas o espacios intercelulares, acelulares que durante los 3 primeros días ocupan casi todo el espesor de la fisis, sin llegar a afectar a la zona germinal. Estos hallazgos son muy similares a los descritos por Kenwright¹⁰⁰, unas imágenes que el autor, describió como fisiolisis.(Fig. 9.1) Kenwright¹⁰⁰ describió que tras aplicar una fuerza de distracción a través de la fisis, en un modelo animal, se producía una fractura a través de la zona hipertrófica sin

involucrar la zona germinal. Sledge *et al*¹⁰¹ describen la misma fractura a través de la zona hipertrófica, pero además confirman que no interfirió con el crecimiento de la placa.

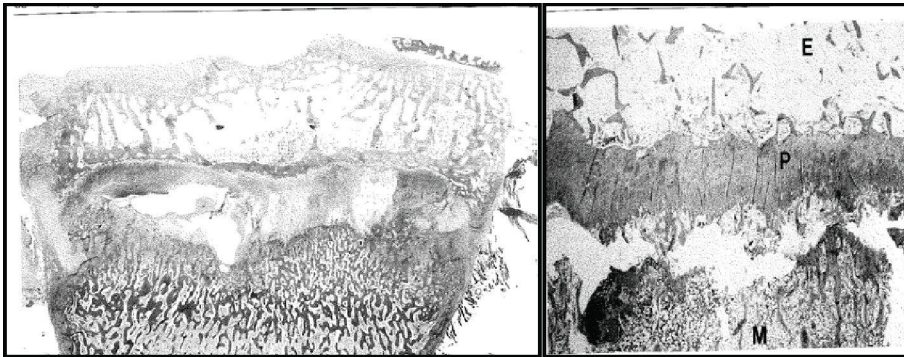


Fig. 9.1. Fisiolisis: Imagen extraída del artículo de Kenwright¹⁰⁰ en el que se observan las lagunas en la placa de crecimiento, tras haber sometido a ésta a una fuerza de distracción

El hueso y de forma más concreta, la placa de crecimiento es un material con propiedades viscoelásticas, lo que significa que tiene una cierta capacidad de deformación plástica. Las propiedades viscoelásticas de la placa de crecimiento permiten que la aplicación de fuerzas progresivas crecientes de compresión/distracción, no provoquendisrupciones en la fisis, aunque sí estas fuerzas se detienen bruscamente, puede conllevar una fractura fisaria. Durante la hemiepifisiodesis, las fuerzas de compresión son aplicadas a través de la fisis, y gradualmente aumentan por el efecto de crecimiento del hueso contra el implante.

Cuando se retira el material de hemiepifisiodesis, se detiene de manera súbita la fuerza de compresión a la que estaba sometida. Nuestra hipótesis es que debido a la viscoelásticidad de la placa, puede hacer que se genere repentinamente fuerzas contrarias de distracción, que puede conllevar al fallo de la fisis. Esto podría explicar que nuestros hallazgos sean similares a los hallados en la fisiolisis descrita en algunos estudios experimentales^{37, 100}, cuando se somete a la placa de crecimiento a fuerzas de distracción.

Basándonos en estos hallazgos, y en los principios de la física, "teoría de la resistencia del tirante"⁴¹, que dice que: *cuando se somete a un material a una fuerza de compresión, y esta fuerza cede súbitamente, existe una fuerza contraria que emerge,*

que será tanto mayor, cuanto mayor hubiese sido la compresión aplicada. Así pues, podemos suponer que tras haber sometido a la fisis, a una fuerza de compresión constante durante 3 semanas, y haberla retirado repentinamente, la fisis actuará respondiendo con un fuerza contraria de dispersión (Principio de Acción-Reacción)¹⁰³ siendo la resultante de estas fuerzas antagónicas, la fractura de la fisis, que encontramos a los 3 días y que permanece visible durante las dos primeras semanas, para después a las 3 semanas, mostrar un aspecto casi normal, con la estructura fisaria recuperada.

Alberty *et al*³⁶, en su estudio sobre el efecto de la distracción en la placa de crecimiento, concluyó que la distracción aplicada sobre la fisis produce una hiperplasia transitoria junto con un incremento de la altura de la zona hipertrófica, hecho confirmado por Noble⁹⁶, Arriola⁹⁹ y Sledge¹⁰¹. Noble y Sledge, describieron un incremento de la proliferación celular y de la síntesis de matriz celular como resultado de las fuerzas de distracción, revelando sus estudios un aumento del altura de la placa de crecimiento, más marcado en la zona hipertrófica y proliferativa^{96, 101}. De Bastiani³⁹ también confirmó tales hallazgos indicando que la placa de crecimiento era capaz posteriormente de recobrar la morfología y estructura, conservando su función, en el momento en el que cesaban la fuerza de distracción. Lo cual iría en la misma línea que nuestras observaciones, porque la fisis en nuestro estudio también es capaz de recuperarse, a pesar de las lesiones iniciales observadas.

La distracción a pequeña intensidad, provoca una deformidad de la fisis, pequeños incrementos de la distracción pueden conllevar a una fisiolisis, e incluso en casos extremos a arresto fisarios. Cuando la distracción se mantiene a pequeña intensidad, el principal cambio histológico, es el engrosamiento de la fisis, causado por la isquemia de los capilares metafisarios, y la proliferación de las células en la capa germinal¹⁰².

La placa de crecimiento, durante la primera semana, intenta regenerar esta lisis, tal y como muestra la histología del G2, cuando las lagunas que en un principio eran espacios acelulares y vacíos de contenido, aparecen invadidas por células fusiformes o estrelladas.

En nuestro estudio, observamos que tras la tinción con BrdU (tinción que marca las células en la fase S, y es indicativo proliferación celular), en los especímenes a 3 días (G1) las células presentan un alto índice de captación, esta captación es visible, no sólo

en la zona proliferativa, sino también en la zona de reserva, en contraste con los hallazgos de Apte *et al*⁴⁰, quien describe que la captación está restringida únicamente a la zona proliferativa en la fisis en el animal normal. En cualquier caso, lo que no hayamos fue captación de BrdU a nivel de la zona hipertrófica.

Así mismo Seinsheimer *et al*⁷ expone que las fisis que tienen un crecimiento más rápido tiene mayor índice de marcación que las fisis con un crecimiento más lento, y que estas diferencias no sólo están determinadas por la localización anatómica de los cartílagos de crecimiento, sino también por las diferentes edades del animal. Esta afirmación, en nuestro estudio, podría tener relación con el aumento del índice de captación de BrdU observado en los grupos G1 G2, ya que la fisis estaría en fase de regenerarse por la lesión, producida probablemente como resultado de la distracción reactiva a la supresión de la fuerza de compresión.

La captación de BrdU a lo largo del estudio, disminuyó en intensidad, siendo en los grupos G2, G3 únicamente perceptible en la zona proliferativa. La actividad celular del cartílago fisario en su parte interna, estaba disminuida a las 2 semanas tras la hemiepifisiodesis, pero no detenida. Este hallazgo, coincide con el de Aykut⁵⁵ que describió una disminución de la actividad proliferativa en el cartílago fisario después de la hemiepifisiodesis. Aunque tiene lugar un enlentecimiento de la actividad celular, las células de la placa de crecimiento mantienen su potencial proliferativo.

Una alteración similar en la captación de BrdU desde los 3 días hasta las 3 semanas, hallada en nuestro estudio, esta descrita en el estudio experimental de Janezic¹⁰⁴, en el que observó una caída progresiva del nivel de proliferación durante la fase inicial de la curación de una fractura diafisaria la tibia de ratas. En su estudio, Janezic *et al*¹⁰⁴ describió que el pico de captación de BrdU era muy evidente a los 3 días de la fractura, para posteriormente ir disminuyendo de manera gradual hasta el día 29.

Otro de los hallazgos originales de este estudio es la descripción de las lagunas o espacios intercelulares, que como habíamos dicho, a la semana, comenzaban a ser invadidas por células estrelladas, (Fig. 8.27, 8.43), además tras la tinción con BrdU, las células estrelladas, presentaban captación evidente, indicando que son células que están en fase S, y por lo tanto están en fase proliferativa (aumento de síntesis de ADN). (Fig.9.2)

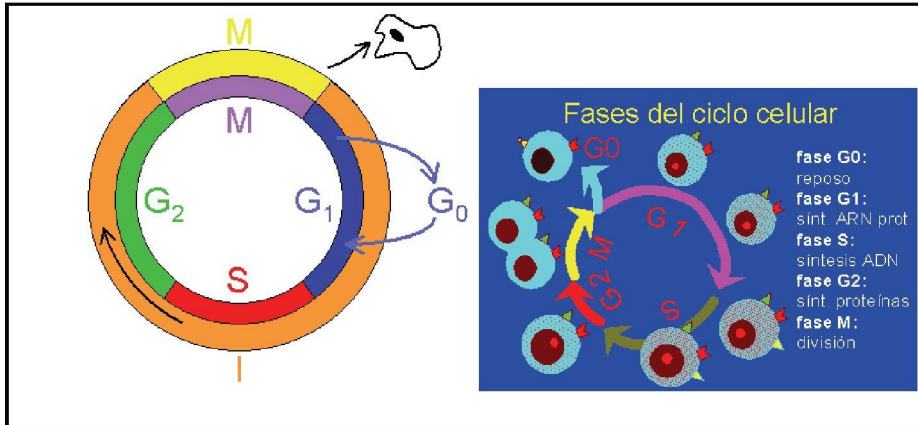


Fig.9.2. Ciclo celular y sus Fases: El **ciclo celular** es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al **crecimiento** de la **célula** y la **división** en dos células hijas. Las etapas, son G₁-S-G₂ y M. El estado G₀ quiere decir "GAP 1" (síntesis ARN proteínas). El estado S representa la "síntesis", en el que ocurre la replicación del **ADN**. El estado G₂ representa "GAP 2" (síntesis de proteínas). El estado M representa «la fase M», mitosis, la división celular

Otra pregunta que surge, es si la reparación de la fisis, surge de la misma fisis, o el proceso de remodelado de la fisis, está influenciado o asociado a un aumento del flujo sanguíneo a nivel de la fisiolisis. Ya que una hiper-vascularización temporal local, estaría estrechamente asociada a un aumento de la proliferación de los condrocitos fisario.

Sabemos que la tasa de crecimiento longitudinal de la placa fisaria está en función del número de células existentes en la zona proliferativa, la tasa media de mitosis de estas células y la cantidad de matriz que las envuelve en la zona hipertrófica⁷. El grosor de la zona proliferativa, nos da una aproximación del número de células de esta zona. Siendo una excelente correlación el grosor de la zona proliferativa y la tasa de crecimiento. El mayor grosor lo encontramos en el grupo G1, G2 ocupando la zona interna de la fisis, y parte de la media, y sólo se observa puntualmente en los conejos del grupo G3, por lo tanto podemos deducir que a mayor grosor, habrá una mayor tasa de crecimiento reflejada por un aumento de la proliferación celular, y consiguientemente de la captación de BrdU. La mayor tasa de crecimiento la encontraremos en los grupos G1, y G2.

A las dos semanas, ya no se observa la presencia de lagunas, la placa va recuperando su estructura original, los condrocitos de la zona proliferativa, poco a poco recobran su organización columnar, pero la placa de crecimiento continua ensanchada, este

aumento del grosor de la placa está restringido únicamente a la zona interna, y principalmente a la zona donde suponemos que previamente estuvieron las lagunas. La diferencia de grosores encontrados en este grupo G3, nos hace suponer que el grosor dependerá del tamaño de la laguna o espacio que previamente ocupaba la zona.

A las 3 semanas, la placa de crecimiento en nuestro estudio presenta una regeneración casi completa, el aspecto y la estructura es el de una fisis normal. Hallazgo que concuerda con estudios previos²² que describían que la placa de crecimiento a las 3 semanas post-hemiepifisiodesis estaba completamente reestablecida.

Peterson¹⁰² por su parte, afirma que tras la fisiolisis por distracción, los animales recuperan la estructura normal de la placa de crecimiento. Esta preservación de la capacidad de crecimiento, parece depender de la integridad de la capa germinal, la cual normalmente no se ve afectada por la distracción.

10. LA IMPORTANCIA DEL EFECTO REBOTE

10.1. EL CONCEPTO DE REBOTE. IMPLICACION CLINICA

El efecto rebote consiste en un sobre-crecimiento del lado en que se ha realizado la hemiepifisiodesis, en comparación con el opuesto y que aparece después de la retirada del material. Siendo la consecuencia clínica más importante la pérdida de la corrección alcanzada.

El efecto rebote es enigmático, difícil de predecir, de cronología incierta, y producido por un mecanismo desconocido, y que eventualmente puede conllevar una pérdida de corrección, y la necesidad de realizar un nuevo procedimiento quirúrgico. Por esta razón, algunos autores han sugerido^{45, 51} de manera rutinaria realizar una sobre-corrección para prevenir una deformidad residual permanente. Aunque esto puede parecer una buena solución, el problema radica en que si el efecto rebote, no tiene lugar, la presencia de este varo residual, puede tener serias implicaciones, ya que pequeñas deformidades en varo, son peor toleradas que una incorrecta alineación en valgo. No hay que olvidar que si transformamos una deformidad de valgo a varo, cada grado de varo tiene un efecto mecánico equivalente a 4 de valgo.

Nuestro estudio aporta nueva información sobre el comportamiento de la fisis basado en el análisis de los cambios histológicos y radiológicos tras la hemiepifisiodesis.

El experimento inicialmente se ideó para estudiar un sistema que pudiese prevenir el efecto rebote. Durante el estudio piloto nos percatamos de la ausencia de literatura sobre los fenómenos que sucedían en el momento de retirada de la hemiepifisiodesis. Por lo que se decidió estudiar este periodo. Como sabíamos por nuestro estudio piloto inicial, que la fisis era prácticamente normal a las 3 semanas, se decidió estudiar de los puntos antes mencionados, para estudiar si el rebote aparecía desde un principio o bien era un fenómeno progresivo y además intentamos evaluar si su intensidad era gradual o variaba en los diferentes momentos.

10.2. EL EFECTO REBOTE EN NUESTRO ESTUDIO

Nuestro estudio del efecto rebote, está basado en mediciones radiológicas, analizando el ángulo ALDA desde la primera cirugía hasta el momento de la eutanasia. De él se desprende que sólo en el grupo G4, se apreció un sobre-crecimiento por rebote significativo.

Algunos autores definen el sobre-crecimiento cuando la pérdida de angulación es mayor de 3º-5º ^{45, 79}. Nosotros decidimos fijar una medida arbitraria del 20%. Porque en nuestro grupo control, observamos que las tibias control presentaban oscilaciones en la angulación que iban de los 0 hasta los 3º, como la angulación obtenida a las 3 semanas oscilaba alrededor de los 34º, consideramos que este valor del 20%, sería lo suficientemente amplio, como para garantizar que los resultados positivos obtenidos fuesen realmente rebotes y excluir así los errores de medición. Esta medida puede infravalorar resultados, ya que hay valores de rebote, que se situaron entre el 10% (3º) y el 20%, pero creemos que es mejor pecar por infravalorar que sobreestimar.

Siguiendo este enunciado, podríamos hablar de 3 posibles formas de rebote. El Rebote "seguro": que son aquellas tibias que presentaron una pérdida de angulación mayor de 20% [8-10º] cosa que sucedió en 5 de las 10 tibias del G4. Existiría un grupo de Rebote "probable": que serían aquellas tibias que presentaron una pérdida de angulación entre 10%-20%. [4-7º], que estaba formado por 1 tibia del grupo G4 y podría discutirse, si debe excluirse o bien discutirla dentro del grupo de rebote, ya que las posibilidades de que represente un rebote real son altas. Y finalmente un rebote dudoso que son aquellas tibias que presentaron una pérdida de angulación menor al 10% y que sea difícil dilucidar si realmente representan una forma de rebote o simplemente son errores de medición relacionados con cambios posicionales durante la radiología. Todas las tibias que presentaron pérdida de angulación en los grupos G1 y G2 pertenecían a este grupo y las pérdidas nunca fueron > 5%. De igual manera en los casos que se observó un aumento de angulación, los valores nunca fueron mayores de 2º y al igual que en el rebote simplemente se consideraron errores de medición. El hecho de que el estudio histológico no delatara la presencia de puentes óseos corrobora esta hipótesis.

El efecto rebote, solo fue observado en las tibias de algunos de los conejos en el grupo G4, en contra de lo que sugieren algunos estudios experimentales que hablan de que el estímulo sobre-crecimiento ocurre inmediatamente después de la post-hemiepifisiodesis^{46, 49}. Muchas de estas afirmaciones están basadas en estudios observacionales, y como tales presentan errores y son difíciles de reproducir por otro observador. En nuestro estudio, objetivamente, usando mediciones radiológicas, no fuimos capaces de observar el efecto rebote en todos los animales a pesar que todos fueron sometidos al mismo tratamiento.

A pesar que el efecto rebote ha sido extensamente discutido en la literatura y que con frecuencia es citado, se conoce poco sobre él. Muchos autores^{48,98} han mencionado que es una reacción normal a la epifisiodesis, pero en contra iría el hecho, de que el efecto rebote es de aparición errática. Según Mckusic¹⁰⁵ este fenómeno podría estar controlado parcialmente por factores genéticos, lo que explicaría la variabilidad entre individuos. Nosotros compartimos esta afirmación ya que aunque nuestro grupo de estudio, es un modelo experimental, en todos los casos la etiología de la deformidad fue la misma, y la edad en el momento de la cirugía fue la misma, y aún así el rebote fue inconstante y de intensidad variable (en nuestro grupo de animales sacrificados a las 3 semanas, más de la mitad de las tibias presentaron una pérdida de corrección del 20%). Nuestros hallazgos en cambio contrastan con el enunciado de Burghardt *et al*⁶⁰, que propone que los factores que podrían favorecer el efecto rebote estarían relacionados con la edad, la localización anatómica de la fisis, y la etiología, pues en nuestra serie la localización, edad y etiología fueron siempre las mismas, sin embargo el rebote varió.

Nuestros hallazgos soportan parcialmente el punto de vista de Pistevos¹⁰⁶, quien en un estudio en niños describió que tras la retirada de la hemiepifisiodesis, se detuvo el crecimiento del área afecta durante dos meses, y se aceleró a continuación para finalmente crecer de manera simétrica a la zona opuesta, sus observaciones están basadas en la estimación de la corrección de la deformidad, midiendo la distancia intermaleolar. El hecho de que ninguno de los conejos sacrificados antes de la 3ª semana presentase rebote, implica que el estímulo de sobre-crecimiento tardó un tiempo en aparecer, sin embargo contrariamente a los hallazgos de Pistevos¹⁰⁶, no

podimos documentar una fase de detención del crecimiento (no se observaron aumentos de la angulación).

Otro hallazgo sorprendente es que el rebote fue unilateral, e incluso asimétrico en la mayoría de los conejos sometidos a cirugía en ambas tibias. De hecho, de los 5 conejos operados de manera bilateral, y sacrificados a las 3 semanas, solo 3 presentaron rebote, y en todos ellos en 1 sola pata. Mientras que la contra lateral, presentó una pérdida de angulación que osciló entre 3-6° (9,3-17%). Todo ello a pesar de que ambas tibias fueron sometidas al mismo procedimiento, y por el mismo investigador, y se supone que deberían crecer a la misma velocidad y de manera simétrica. Una posible explicación para estas diferencias podrían ser pequeños cambios en la orientación longitudinal de la placa de hemiepifisiodesis.

Modelos mecánicos de física⁴¹ sugieren que pequeños cambios en la orientación de la placa, conllevan a una diferencia en la distribución de la fuerza de compresión aplicada por la misma sobre la placa de crecimiento. La manera más eficiente que tienen los elementos estructurales de resistir las sollicitaciones, se produce cuando tales sollicitaciones tienen una orientación coincidente con el eje longitudinal de los elementos. En el caso de cambios de orientación, se generan otras sollicitaciones mediante esfuerzos axiales (paralelos a las acciones) que pueden resultar en fuerzas de tracción o compresión dependiendo de las acciones externas.

Por otro lado, si la placa en 8, se coloca con una ligera inclinación respecto el eje longitudinal de la placa de crecimiento, se afectará un diámetro mayor de fisis y como han sugerido algunos estudios experimentales⁶⁵ cuanto mayor es el área afectada de la fisis menor es el grado de angulación y esta angulación estará tanto más limitada cuanto mayor sea la longitud del arco sobre la que se aplica la compresión. Por consiguiente, a menor compresión, menor angulación y menor rebote. Si bien es cierto, que con el crecimiento, la placa tiene tendencia a reorientarse siguiendo el eje longitudinal del hueso.

Analizando los datos del rebote no solo llama la atención la unilateralidad, sino también el hecho, de que, de las 5 tibias que rebotaron todas fueron derechas. Aunque, este hallazgo no fuera estadísticamente significativo, no deja de ser inesperado, y creemos que debe considerarse la posibilidad de la influencia de la

dificultad en realizar la misma cirugía en piernas situadas de manera diferente (derecha vs izquierda).

Finalmente debemos mencionar que aunque el rebote unilateral sea un fenómeno peculiar, este ha sido publicado previamente por otros investigadores en la práctica clínica¹⁰⁷.

Aykut⁵⁵ realizó un estudio en conejos y analizó el rebote, en su metódica utilizó conejos de 6 semanas, practicó una hemiepifisiodesis por grapas en la tibia proximal interna, retirando la grapa a las 3 semanas, en éste estudio, la angulación media alcanzada a las 3 semanas fue de 21,8°, sufriendo las tibias una pérdida, con una media de angulación de 14,6°, tres semanas más tarde. Estos datos contrastan con nuestros resultados con una angulación de 34,5° a las tres semanas y que disminuyó a 28,98°. Las diferencias entre ambos estudios pueden ser debidas a que en su estudio Aykut⁵⁵ utilizó un mix de machos y hembras, pero aún más probablemente a que las grapas producen menos angulación que las placas en 8 como ha sido demostrado experimentalmente por algunos autores^{60, 65}. Desafortunadamente, su artículo, no proporciona información acerca del porcentaje de tibias que presentan rebote, ni tampoco de lo que sucede durante las tres semanas entre mediciones.

Nuestros hallazgos sugieren que la angulación estaba relacionada con el rebote, y que a mayor angulación, mayor la posibilidad de rebote. Probablemente este hallazgo lo que refleja es que las tibias que más se angularon fueron aquellas que crecieron más y por consiguiente fueron las que estuvieron sometidas a las mayores fuerzas de compresión. Por lo tanto tendría lógica pensar que a mayor compresión mayor fuerza reactiva de distracción y por consiguiente más grandes serán las lagunas y la respuesta proliferativa de los condrocitos, de ahí que podamos encontrar un mayor rebote.

11. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En este trabajo de investigación existen una serie de limitaciones:

El modelo animal de experimentación utilizado: el conejo. Este es un animal cuadrúpedo y por lo tanto las tibias están sometidas a unas sollicitaciones mecánicas distintas, además las características anatómicas y fisiológicas son diferentes de las del humano, por ejemplo aunque las articulaciones son de estructura similar a la humana, su tamaño y peso son mucho menores.

Además aunque la fisis presenta una estructura bastante similar a la humana, su ritmo de crecimiento es diferente. En los conejos (NZW), se comienza a apreciar el cierre de la placa fisaria de la tibia proximal hacia la 22 semana en las radiografías y a las 25 semanas en los estudios histológicos¹⁰⁸, lo que implica que el crecimiento del conejo es más prolongado que el del humano siendo su tasa de crecimiento mayor que la del humano. Sin embargo la mayor parte del crecimiento sucede durante las primeras 14 semanas en el conejo hebra y en las primeras 16 en el macho⁸⁵.

Estamos de acuerdo con las observaciones de Lee¹⁰⁹ y de De Pablos y Canadell¹¹⁰, de las limitaciones que el estudio en animales tiene principalmente por su diferente velocidad de crecimiento, sin embargo no existe la posibilidad de estudiar estos fenómenos más que en modelo animal. Además el conejo ha sido utilizado ampliamente como modelo experimental y conocemos muchas de sus variaciones fisiológicas y como se comparan estas con la del humano.

La segunda limitación es que los animales continuaban siendo esqueléticamente inmaduros al final de este trabajo. Además la edad del conejo en la que se realizó el estudio, trasladada a la edad humana representaría los 5-6 años de edad. Siendo en este rango de edad, poco frecuente la realización de hemiepifisiodesis en los niños.

Otra limitación es el hecho de que este sistema sólo ha sido testado para una cierta edad y durante un determinado periodo de tiempo, lo que hace que, por ejemplo hayamos considerado que algunas tibias no presentaron rebote pero no sabemos a ciencia cierta qué hubiese ocurrido si el estudio se hubiese prolongado en el tiempo. Sin embargo, el hecho, que algunos conejos presentasen rebote solo en una pata, y

que la fisis a las 3 semanas, recuperase su estructura columnar y grosor, hacen sospechar que esta ocurrencia es poco probable. Por otro lado los hallazgos descritos pueden ser solo aplicados al conejo de 6 semanas, pudiendo ser los que estos hallazgos sean más o menos intensos con los cambios de edad.

Finalmente debido a que carecíamos de una retina ocular como la utilizada para el contaje de núcleos marcados por BrdU por algunos de los autores^{25, 36, 60}, la realización del contaje celular, además de ser francamente arduo, es poco representativo, ya que está sometido a un elevado número de errores y su reproducibilidad inter-observador e intra-observador es pobre. Por todo ello se decidió prescindir de dicha información y centrarnos en la descripción morfológica de los hallazgos encontrados según el grupo de estudio.

Capítulo sexto

CONCLUSIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.

12. CONCLUSIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

12.1. CONCLUSIONES

1. La recuperación de la fisis tras una hemiepifisiodesis es un fenómeno complejo que a nuestro conocer no había sido descrito previamente.
2. El período de normalización de la placa de crecimiento se extiende a lo largo del tiempo, e implica una primera fase de lesión, y una segunda fase de reparación, tras la cual, el cartílago de crecimiento vuelve a adquirir su aspecto normal.
3. La posible causa de la lesión observada inmediatamente tras la retirada de la placa probablemente tenga que ver con las alteraciones mecánicas que ocurren alrededor de la placa de crecimiento.
4. El fenómeno de crecimiento por rebote es un evento de presentación inconstante y de intensidad variable, y no es, al menos totalmente, dependiente de la etiología y la edad, como hasta ahora se había propuesto.
5. Cuando aparece el rebote no lo hace de una manera inmediata, sino que tarda un cierto tiempo en aparecer.
6. Parece existir una cierta correlación entre el grado de angulación obtenido con la hemiepifisiodesis y las posibilidades de rebote.

12.2. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Cuando iniciamos este proyecto, no éramos conscientes de la gran cantidad de lagunas existentes en el conocimiento de la fisiología de la placa de crecimiento. Creíamos que la fisiopatología estaba bien descrita y que existía poco lugar para nuevos conocimientos.

Al llegar a este punto de nuestro proyecto nos damos cuenta de que muchos de los cambios que ocurren en la placa de crecimiento son desconocidos y son obviados por que la placa recupera su normalidad, sin embargo su conocimiento es esencial si queremos avanzar en el tratamiento de los trastornos del crecimiento y de las patologías que rodean a la placa de crecimiento. Creemos que nuestro estudio aporta una información novedosa que puede ayudar a entender mejor la fisiología de la placa pero dista mucho de haber dejado resueltas la fisiopatología del cartilago de crecimiento, por eso aquí nos atrevemos a sugerir unas líneas por donde la investigación sobre la fisis debe expandirse en el futuro.

Este estudio por limitaciones económicas y de tiempo se ha limitado a un solo modelo animal y con una edad determinada y se ha limitado al estudio de un período determinado de tiempo. La manera de reforzar la validez a los hallazgos de la presente tesis doctoral es extender el estudio a otros modelos animales y dentro del mismo modelo a diferentes edades y comprobar si los cambios observados se reproducen de manera sistemática o bien varían entre especies o entre animales de diferente edad. Además creemos que debe extenderse el periodo de estudio de la fisis, no solo en su fase de recuperación sino también en el tiempo que está sometido a hemiepifisiodesis puede ayudar a aumentar la información y mejorar el conocimiento actual.

Otras líneas de futura investigación pueden incluir la respuesta hormonal y de los mediadores en la fisis¹¹¹, que nos ayude a comprender no solo desde el punto de vista morfológico sino también bioquímico^{112, 113} que es lo que está sucediendo a nivel de la placa de crecimiento.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brighton CT. The Growth Plate. Symposium on Metabolic Bone Disease. Orthop Clin of North America.1984;15(4):571-596
2. Shapiro F, Forriol F. El cartílago de crecimiento: biología y biomecánica del desarrollo. Rev Ortop Traumatol 2005;49:55-67
3. Peterson H. A. Epiphyseal Growth Plate fractures. Anatomy and Growth. Springer 2007; 2: 7-1
4. Robertson WW. Newest knowledge of the growth plate. Clin Orthop 1990; 253:270-8.
5. Quacci D, Dell'Orbo C, Pazzaglia UE. Morphological aspects of rat metaphyseal cartilage pericellular matrix. J Anat 1990; 171:193-205.
6. Stokes IA, Mente PL, Iatridis JC, Farnum CE, Aronsson DD. Enlargement of growth plate chondrocytes modulated by sustained mechanical loading. J Bone Joint Surg Am 2002; 84A:1842-8.
7. Seinsheimer F, Sledge CB. Parameters of longitudinal growth rate in rabbit epiphyseal growth plates. J Bone Joint Surg Am 1981; 63(A):627-30.
8. Ballock RT, O'Keefe RJ. The biology of the growth plate. J Bone Joint Surg Am 2003;85(A):715-26
9. Aizama T. Apoptosis and proliferation of growth plate chondrocyte in rabbits. J Bone Joint Surg(Br) 1997;79(B):483-6
10. Roach HI. Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocyte involves asymmetric cells divisions and apoptosisJ Cell Biol.1992;11(9):49-501
11. Brighton CT. Structure and function of the growth plate. ClinOrthop and Related Research. 1978;136:22-32
12. Byers B. Cell Columns in articular cartilage physes questioned: a review. Osteo Arthritis and Cartilage;2006;14: 3-12
13. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. Nature; 2003; 423:332-336

14. Boyan B. Steroid Hormone Action in Musculoskeletal cells involves membrane receptor and nuclear receptor mechanisms. *Connective Tissue Research*, 2003; 44 (1): 130-135
15. Weise M. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *PNAS*.2001;98(12):6871-6876
16. Kan K w. Hormone receptors in the epiphyseal cartilage. *Journal of Endocrinology*. 1984;103(2):125-31
17. Henderson JH: Mechanical induction in limb morphogenesis: the role of growth-generated strains and pressures. *Bone* 2002; 31(6): 645-53
18. Zoricic S. Expression of bone morphogenetic proteins and cartilage-derived morphogenetic proteins during osteophyte formation in humans. *J. Anat.*2003;202:269-277
19. Sato M. Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein BMP-2 and BMP-4. *J Bone Miner Res*. 1990;14:1084-95
20. Buckwalter JA. Growth of cornstalks and long bones. *Iowa Orthop J*. 1989; 9: 25–31
21. Farum CE, Quantitative three dimensional analyses of chondrocytic kinetic responses to short-term stapling of the rat proximal tibial growth plate. *Cells tissues organs*,2000;167:247-258
22. Erlich MG, Mankin HJ. Biochemical and physiological events during closure of Stapled distal femoral epiphyseal plate in rats. *J. Bone Joing Surg Am* 1972;54: 309-322
23. Herwig J, Schmidt H. Biochemical events during stapling of the proximal tibial epiphyseal plate in pigs. *Clinical Ortho and Related Research*. 1987; 218: 283-289
24. Gratzner H. Monoclonal antibody to 5-Bromo and 5- Iodo deoxyuridina: management for detection of DNA replication. *Science* 1982. 218;29: 474-475
25. Heuter C. *Grundriss der chirurgie*.198. volumen II: Hälfte. Specieller Theil
26. Volkmann R. Die Krankheiten der Bewegungsorgane in: Pitha, Billorth, eds. *Handbuch der Allgemeinen und speciellen Chirurgie*,Bd 2.Abt A,S 694. Stuttgart. Ferdinand Enke,1869
27. Christensen NO. Growth arrest by stapling. *ActaOrthopScand* 1973.3-78

28. Wilsman NJ, Farnum CE, Green EM, Lieferman EM, Clayton MK. Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different rates. *J Orthop Res* 1996;14(4):562–72
29. Stokes IAF, Gwadera J, Dimock A, Farnum CE, Aronsson DD. Modulation of vertebral and tibial growth by compression loading: diurnal versus full-time loading. *J Orthop Res* 2005;23(3):188–95
30. Kember NF. Cell Kinetics and the control of bone growth. *Acta Pediatr Suppl* 1993;391:61-5
31. Villemure I, Stokes I. Growth Plate Mechanics and Mechanobiology. A Survey of Present Understanding. *J Biomech.* 2009; 42(12): 1793–1803
32. Noonan K, Farnun C. Growing pains: are they due to increase to growth during recumbency as documented in a Lamb model. *J Pediatr Orthop* 2004;24:726–731
33. Stokes IAF. Mechanical effects on sketal growth. *J Musculoskel Neuron Interact* 2002; 2(3):277-280
34. Peruchon E. Evaluation and control of growth activity of epiphyseal plate. *Med Biol Eng Comput.*1980;18:396-40
35. Lerner AL. Are regional variations in bone growth related to mechanical stress and strain parameters? *J Biomech.* 1998;31:327-35
36. Alberty A. Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes. A study in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1993; 64(4): 449-455.
37. Trueta J. The vascular contribution to osteogenesis. The effect of pressure upon the epiphyseal cartilage of the rabbit. *JBJS.*1961.43;4:800-14
38. Ring PA. Experimental bone lengthening by epiphyseal distraction. *Br J Surg.* 1958 Sep;46(196):169-73
39. De Bastiani G. Limb lengthening by distraction of the epiphyseal plate: a comparison of two techniques in the rabbit. *J Bone Joint Surg.(br)* 1986; 68B: 545-9
40. Apte S. Physeal Distraction and cell proliferation in the growth plate. *J Bone Joint Surge (Br)* 1994;76-B: 837-43
41. Collins, M.P. y Mitchell, D., 1991, *Prestressed Concrete Structures*, Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, NJ, pp. 766

42. Alvin M, Arkin. The effects of Pressure on Epiphyseal Growth. J Bone Joint surg.1956;38-A:1056-1076
43. Kohler, R. Nicolas Andry de Bois-Regard (lyon 1658-Paris 1742): the inventor of the word "orthopedics" and the father of parasitology. J Child Orthop. 2010;4 (4): 349-355
44. Kirkup JR: Nicolas Andry and 250 years of orthopaedy. J Bone Joint Surg. Br 1991;73(3):361-1
45. Eastwood DM. Sanghrajka AP. Guided Growth. Recent advance in a deep-rooted concept. J Bone and Joint Surg (Br) 2011;93-B:12-18
46. Haas SL. Retardation of bone growth by a wire loop. J Bone Joint Surg Am 1945;27:25-36
47. Bush PG. New insights into function of the growth plate: clinical observations, chondrocyte enlargement and a possible role for membrane transporters. J Bone Joint Surg (Br) 2008;90-B:1541-7
48. Phemister DB. Operative arrestment of longitudinal growth of bones in treatment of deformities. J Bone Joint Surg. Am 1933;15:1-15
49. Gelbke H. The influence of pressure and tension on growing bone in experiments with animals. J Bone Joint Surg Am.1951;33A(4):974-54
50. HeuterC. Anatomischo Studienan den extremitätengelenken Neugeborener und Erwachsener. Virchows Arch. 1862;25-572-99
51. Blount WP. Control of bone growth by epiphyseal stapling. J Bone Joint Surg.1949; 31-A.(3): 464-477
52. Zuege R.Epiphyseal stapling for angular deformity at the knee. J Bone joint Surg.1979;61-A:3-320-329
53. Bowen JR. Partial Epiphysiodesis at the knee to correct angular deformity. ClinicaOrthoprelat research. 1985;198:184-190
54. Metazeau JP. Percutaneous epiphysiodesis using transphyseal screws (PETS). JPO. 1998;18:3.363-369
55. Aykut U. The effect of temporary hemiepiphyseal stapling on the growth plate. a radiologic and inmunohistochemical study in rabbits. J pediatri Orthop 2005. 25:3:336-342

56. Frost HM. A chondral modeling theory. *Calcif tissue Int* 1979;28:181-200
57. Khory J. Results of screw Epiphysiodesis for the treatment of limb length discrepancy and angular deformity. *J Pediatr Orthop* 2007;27:623Y628
58. De Brawer V. Temporary Hemiepiphysiodesis for idiopathic genu valgo in adolescents. Percutaneous TransphysealScrews (PETS) versus Stapling. *J Pediatr Orthop* 2008;28:549Y554
59. Stevens P, Physeal Stapling for idiopathic Genu Valgum. *J Pediatr Orthop* 1999;19:5:645-652
60. Burghardt R. Temporary hemiepihyseal arrest using a screw and plate device to treat knee and ankle deformities in children: a preliminary report. *J Child Orthop*.2008;2:187-197
61. Raluy-Collado,D. Screw length in the guided growth method. *Arch Orthop Trauma surg*.2012;132:1711-1715
62. Ballal M.S, Bruce C.E Nayagam S. Correcting genu varum and genu valgum in Children by guided growth. Temporary hemiepiphysiodesis using tension band plates. *J. Bone Joint Surg(Br)* 2010;92-B:273-6
63. Gottliebsen M. Similar growth plate morphology in stapling and tension band plating hemiepiphysiodesis: A porcine Experimental histomorphometric study. *J Orthop Res* 31:574–579, 2013
64. Mast N. Validation of a genu valgum model in a rabbit hind limb. , *J Pediatr Orthop* 2008;28:375Y380
65. Sanpera I. Guided Growth: the importance of a single tether. An experimental study. *J pediatric Orthop*. 2012;32:8: 815-820
66. Stevens PM. Guided growth: 1993 to the present. *Strat Traum Limb Recon*. 2006;1:29-35
67. Grover JP. Mechanical Behavior of the lamb growth plate in response to asymmetrical loading. *J pediatric Orthop*.2007;27:5.485-492
68. Siffert R. the effect of staples and longitudinal wires on epiphyseal growth. *J Bone Joint Surg*1956;38-A:1007-1088
69. Bonnel, F, Peruchon E. Effects of compression on growth plates in the rabbit. *Acta Orthopaedica*. 1983;54(5):730-3

70. Mielke CH, Stevens PM. Hemiepiphysiodesis stapling for knee deformities in children younger than 10 years. A preliminary report. *J Pediatric Orthop.* 1996;16:423-429
71. Castañeda P, Urquhart B. Hemiepiphysiodesis for the correction of angular deformity about the knee. *J Pediatric Orthop* 2008; 28:188-191
72. Goyeneche. R. Correction of bone angular deformities: experimental analysis of staples versus 8-plate. *J pediatrorthop.* 2009; 29(7):736-740
73. Kanellopoulos AD, Mavrogenis AF, Dovris D, Vlasis K, Burghart R, Soucacos PN, et al. Temporary 323 hemiepiphysiodesis with Blount staples and eight-plates in pigs *Orthopedics* 2011, Apr;34(4). 324-327
74. Recuerdo P, Moyano R. Bienestar animal: experimentación, producción, compañía y zoológicos. 1er Edición. Cordoba, Spain. Don Folio.SL. 2003
75. Anexo III. Supervisión de animales. Control del bienestar animal durante el procedimiento. Consejo superior de investigación científica CSIC. Centro nacionaldebiotecnología.[www.cnb.csic.es/~animalario/CEEA/CEEA%20HEP1.doc]
76. Barone, R. Atlas d'anatomie du lapin. Paris.Massonetcie 1973.
77. Warrell E, Taylor JF. The effect of Trauma on tibial growth. *J Bone Joint Surg (Br)* 1976;58-B:375
78. Saran N, Rathjen K.E- Guided growth for the correction of pediatric lower limb angular deformity. *J Am OrthopSurg* 2010;18:528-536
79. Mercurio A D. Motta T. Effects of extensive circumferential periosteal stripping on the microstructure and mechanical properties of the murine femoral cortex. *J Orthop res* 2012;30:561-568
80. Stevens PM, Klatt JB. Guided growth for pathological physes: radiographic improvement during realignment. *J Pediatric Orthop.* 2008;28:632-9
81. Lynch Mc. Taylor JF. Periosteal division and longitudinal growth in the tibia of the rat. *J Bone Joint (Br)* 1987;69-B: 812-6
82. Abelseth M.K. The application of specif pathogen -free animals to research and production. *Cat Vet Jour.* 1962;3:2.48-56
83. Kilborn S H. Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemporary topics.* 2002;41(5): 21-26

84. Heikel HVA. On ossification and growth of certain bones of the rabbit; with a comparison of the skeletal age in the rabbit and in man. *Acta Orthop Scand* 1999; 39:172-184
85. Masoud I. A longitudinal Study of the Growth of the New Zeland White rabbit: cumulative and biweekly incremental growth rates for Body length, body weight, femoral length, and tibial length. *Journal of Orthop research* 1986;4:221-231
86. Apte SS, Puddle B. Bromodeoxyridine (BrdU) immunohistochemistry in undecalcified plastic-embedded tissue: Elimination of the DNA denaturation step. *Histochemistry* .1990;93:631-635
87. Bailon-Plaza, A. BMP-5 alters chondrocytic activity in the mouse proximal tibial growth plate bone.1999; 24: 211-216
88. WarrelE, Taylor JF. The role of periosteal tension in the growth of long bones. *J Anat.*1979;128:1:179-184
89. Sansone J. The effect of periosteal Resection on tibial growth velocity measured by microtransducer technology in lambs. *J PediatrOrthop.* 2009;29:1:61-67
90. Morton DB y Griffiths. P *Veterinary Record* 1985;116: 431-436
91. Paley D, Testworthn K. Mechanical axis desviation of the lower limbs: preoperative planing of multi apical frontal plane angular and boeing deformities of the femur and tibia. *ClinOrthop* 1992; 280: 65-71
92. Buitriago L. Evaluación radiológica en epifisiodesis de la tibia proximal del conejo: comparación de 6 técnicas y dispositivos de fisiodesis de morfologías variables. *Rev Col OrTra.* 2008;22(2): 130-4
93. Corona J. Reliability of radiographic measures for infantile idiopathic scoliosis. *J Bone joint Surg Am.* 2012;20:94(12)
94. Kember NF. Cell Division in endochondral ossification: a study of cell proliferation in rat bones by the method of tritiated thymidine autoradiography. *J Bone Joint Surg Br* November 1960 42-B: 824-839
95. Akbar. Use of Surgimap Spine in sagittal plane analysis, osteotomy, planning and correction calculation. *Neuro surg Clin N Am.*2014; 24: 163–172
96. Noble J. Breaking force of the rabbit growth plate and its application to epiphyseal distraction. *Acta orthop Scand.*1982;53:13-16

97. Strobino L. The effect of increasing tension on the growth of epiphyseal bone. *Surg. Gynecol obst.*1952; 95:694-700
98. Blount,W. A mature look at epiphyseal stapling. *ClinOrthop and relat research.* 1971;77:158-163
99. Arriola F. Forriol F. Histomorphometric study of growth plate subjected to different mechanical conditions (Compression, Tension, and neutralization): an experimental study in Lambs. *Mechanical growth plate behavior. Journal of Pediatr Orthop (B):* 2001;10:334-338
100. Kenwright J. Response of the growth plate to distraction close to skeletal maturity. Is fracture necessary? *Clinc ortho and relat research.*1999;250:61-72
101. Sledge CB. Noble J. Experimental limb lengthening by epiphyseal distraction. *ClinOrthop* 1978;136:11
102. Peterson HA. Physeal Injury other than fracture. *Mayo Foundation for medical education and research.* 2012.271-280
103. Burbano de Ercilla, Santiago (2003). *Física general.* Editorial Tebar.
104. Janezic G. Proliferation analysis of the growth plate after diaphyseal midshaft fracture by 5`-bromo-2`-deoxy-uridine. *Virchows Arch.*2010;457:77-85
105. McKusick V. The growth and development of human genetics as a clinical discipline. *Am J Hum Genet.*1975;27: 261-273
106. Pistevos G. The correction of genu valgum by epiphyseal stapling. *JbJS.*1977;59-B:72-76
107. Fraser RK. Medial physeal stapling for primary and secondary genu valgum in late childhood and adolescence. *J Bone Joint Surg.* 1995;77:733-5
108. Kaweblum M. Histological and radiographic determination of the age of physeal closure of the distal femur, proximal tibia, and proximal fibula of New Zeland White Rabbit. *Journal of orthopaedic research.*1994;12:747-749
109. Lee SH. Response of the physis to leg lengthening. *J Pediatric Orthop Part B.*2001;10:339-43
110. De Pablos,J, Canadell J. Experimental physeal distraction in immature sheep. *ClinOrthop and related research* 1989; 250:73.

111. Nagai H. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on bone formation in growing rats. *Bone*.1995;16(3):367-73
112. Weiss AP. S-100 Protein in human cartilage lesions. *The journal of bone and joint surgery*. 1986. 68-A(4):521-26
113. Stefanson K. S100 protein in human chondrocytes. *Nature* 1982.295(7):63-4

"Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber".

(Albert Einstein)

Esta tesis, se terminó de escribir en Palma, mayo de 2014.

