



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

**Papel del Ranelato de Estroncio en
pseudoartrosis experimental**

Tamara Rodríguez López

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL DIRIGIDO POR:

Dra. María Isabel Pérez Núñez.

Dr. José Antonio Riancho Moral.

2015



La Doctora María Isabel Pérez Núñez, Profesora Asociada de Cirugía Ortopédica y Traumatología del departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad de Cantabria CERTIFICA:

Que el presente trabajo de tesis doctoral que lleva por título “Papel del Ranelato de Estroncio en Pseudoartrosis Experimental”, de la Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Oviedo, Tamara Rodríguez López, ha sido realizado bajo su dirección, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo la presente en Santander, a 19 de Marzo de 2015.

Prof. Dra. María Isabel Pérez Núñez



El Doctor José Antonio Riancho Moral, Catedrático del departamento de Medicina y Psiquiatría de la Universidad de Cantabria, CERTIFICA:

Que el presente trabajo de tesis doctoral que lleva por título “Papel del Ranelato de Estroncio en Pseudoartrosis Experimental”, de la Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Oviedo, Tamara Rodríguez López, ha sido realizado bajo nuestra dirección y que, considerando que el trabajo reúne calidad científica y originalidad suficientes, autorizo su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmo la presente en Santander, a 19 de Marzo de 2015.

Prof. Dr. José Antonio Riancho Moral.

Este trabajo ha sido financiado por el IFIMAV
(Fundación Marqués de Valdecilla) mediante el proyecto 10 / 14

Son vanas y están plagadas de errores las ciencias que no han nacido del experimento, madre de toda incertidumbre.

Leonardo Da Vinci

A mi familia y amigos.

A Alberto.

Agradecimientos

Esta tesis doctoral es fruto de un proyecto de investigación llevado a cabo por muchas personas. A todos ellos muchas gracias.

Gracias a la Fundación Marqués de Valdecilla (IFIMAV), laboratorios ROVI y NYCOMED por la financiación, sin ellos el proyecto y la presente tesis no se hubieran llevado a cabo.

Gracias a Marta Mayorga por la ayuda prestada con el análisis histológico y las muestras.

Gracias a Manuel, Diego y al resto del personal del LADICIM, cuya asistencia en el estudio biomecánico fue de vital importancia.

Gracias a Miguel por ayudarnos de forma incansable durante todos los días que duró el proyecto y gracias por dedicar tanto tiempo y esfuerzo a cuidar de los animales.

Gracias a Ana, Ascen, Carlos, Manuel, Malala y Marian por el compromiso con el proyecto, de principio a fin.

Gracias a J.A. Riancho por la ayuda y recomendaciones que han hecho posible que realizase esta tesis.

Gracias Maribel, tanto en el plano personal como en el profesional, gracias por ser nuestro modelo a seguir.

Gracias a mi familia y amigos, que me han animado de forma incansable durante todo el tiempo que ha durado este proyecto.

Gracias a Alberto, por tener la paciencia que yo no tengo y animarme a terminar esta tesis incluso cuando las fuerzas empezaban a flaquear.

Listado de abreviaturas.

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos.

ALP: Fosfatasa alcalina.

ALPL: Gen que codifica la enzima fosfatasa alcalina no específica de tejido.

AMP_c: Adenosín monofosfato cíclico.

Bcl-2: Familia de proteínas, su nombre deriva del protooncogen Bcl-2.

BGLAP: Gen que codifica a la proteína osteocalcina.

BM-MNCs: Células mononucleares de la médula ósea.

BMP2: Proteína ósea morfogenética 2.

BMP4: Proteína ósea morfogenética 4.

BMP5: Proteína ósea morfogenética 5.

BMP6: Proteína ósea morfogenética 6.

BMP7: Proteína ósea morfogenética 7.

BMP9: Proteína ósea morfogenética 9.

CaSR: Receptor sensible al calcio.

C-Fos: Proteína codificada por For.

COL1A1: Cadena alfa de colágeno tipo 1.

COL10A1: Cadena alfa de colágeno tipo 10.

COL2A1: Cadena alfa de colágeno tipo 2.

COX-2: Ciclooxygenasa 2.

CT: Tomografía computarizada.

DKK1: Proteína perteneciente a la familia dickkopf.

DMO: Densidad mineral ósea.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EI: Epífisis inferior.

Emax: Energía absorbida hasta carga máxima.

EF4P: Ensayo de flexión en cuatro puntos.

ES: Epífisis superior.

FD: Fémur derecho.

FDA: Food and drug administration (Agencia americana de la alimentación y fármacos).

FD-EI: Epífisis inferior de fémur derecho.

FD-ES: Epífisis superior de fémur derecho.

FGF- α : Factor de crecimiento fibroblástico α .

FI: Fémur izquierdo.

FI-EI: Epífisis inferior de fémur izquierdo.

FI-ES: Epífisis superior de fémur izquierdo.

Fmax: Fuerza máxima.

GDF-5: Factor de crecimiento diferenciado 5.

IGFBP6: Proteína fijadora del factor de crecimiento insulínico 6.

IGF-1: Factor de crecimiento insulin-like tipo 1.

III FIRST: Primer estudio internacional sobre el tratamiento con estroncio.

IL-1: Interleuquina 1.

IL-6: Interleuquina 6.

IL-11: Interleuquina 11.

IL-18: Interleuquina 18.

LADICIM: Laboratorio de ciencias de los materiales de la Universidad de Cantabria.

Lef1: Factor estimulante linfoide 1.

LRP5: Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 5.

LRP6: Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 6.

M-CSF: Factor estimulante de la colonia de macrófagos.

NFI: Neurofibromina 1.

NFATc1: Factor nuclear de células T activadas citoplasmático 1.

OC: Osteocalcina.

OPG: Osteoprotegerina.

PCR: Proteína C reactiva.

PDU: Power Doppler Ultrasonography.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

PINP: Propéptido N- terminal del procolágeno I.

PIIINP: Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III.

PREVOS: Estudio para la prevención de la osteoporosis.

PTH: Hormona paratiroidea.

RANK: Receptor activador del factor nuclear kappa B.

RANK-L: Ligando de RANK.

RhBMP2: Proteína ósea morfogenética recombinante humana 2.

RhBMP7: Proteína ósea morfogenética recombinante humana 7.

RIA: Reaming Irrigation Aspiration (Sistema de fresado-aspirado).

Runx2: Factor de transcripción relacionado con Runt 2.

SEEA: Servicio de Estabulación y Experimentación Animal.

SF-36: Test de calidad de vida "Short Form 36".

Smad6: Proteína 6 de la familia SMAD, que son factores de transcripción.

SMFA-D: Test de evaluación de la función musculoesquelética.

SOTI: Intervención terapéutica en la osteoporosis en el raquis (Spinal osteoporosis therapeutic intervention).

SOST: Gen que codifica la proteína esclerostina.

SOX9: Gen que codifica el factor de transcripción sox9.

Sr: Estroncio.

STRATOS: Estudio sobre la administración de ranelato de estroncio para la osteoporosis.

Tcf7: Factor de transcripción 7.

Tec^{99m}: Tecnecio 99^m.

TGF-β1: Factor de crecimiento transformante β1.

TGF-β2: Factor de crecimiento transformante β2.

TGF-β3: Factor de crecimiento transformante β3.

TNFα: Factor de necrosis tumoral α.

TRAF6: Factor asociado con e receptor TNF6.

TROPOS: Estudio para el tratamiento de la osteoporosis periférica.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

VSG: Velocidad de sedimentación globular.

Wnt: Superfamilia de proteína Wnt, muy relacionada con la embriogénesis.

WNT5A: Proteína que codifica a Wnt5a, perteneciente a la superfamilia Wnt.

Índice

Índice

1. Introducción.....	25
2. Justificación y objetivos.....	91
3. Material y métodos.....	95
4. Resultados.....	119
5. Discusión.....	167
6. Conclusiones.....	205
7. Anexo 1: Autorización del Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria.....	209
8. Anexo 2: Gráficas del peso de los animales incluidos en el estudio.....	213
9. Anexo 3: Resultados de los ensayos de microindentación realizados.....	229
10. Bibliografía.....	237

Introducción.

1. Introducción.

1.1. Epidemiología.

Con el incremento de la esperanza de vida en países, como Estados Unidos, la población por encima de los 65 años ha ido aumentando progresivamente. Entre 1992 y 2005 se produjo un aumento del 14% y se estima que en los próximos 14 años aumentará un 44% más (1). Con esta tendencia, se calcula que en 2050 la población mayor de 65 años alcanzará los 69 millones de habitantes (2).

Debido al envejecimiento de la población, en un futuro próximo nos tendremos que enfrentar al tratamiento de pacientes más problemáticos desde el punto de vista sanitario. Son pacientes con mayor facilidad para las caídas, con capacidad de regeneración ósea limitada y con más comorbilidades asociadas. Todo esto conlleva que las complicaciones derivadas de las fracturas como son las infecciones, los retrasos en la consolidación o incluso la falta de consolidación se den con mayor frecuencia (3).

En un estudio publicado por van Staa en 2001 se recoge una serie de 222 pacientes, seleccionados en la zona sanitaria de Gales (UK), con fracturas por fragilidad. En él se pone de manifiesto una pérdida de supervivencia de un 10-20% en aquellos pacientes que presentaron fractura de cadera y vertebral asociadas (4). Dadas la tendencia demográfica actual, parece inevitable pensar que en los próximos años nuestros pacientes tendrán peor pronóstico.

De los 6 millones de fracturas que se producen anualmente en Estados Unidos (5) 1.5 millones son por fragilidad ósea, lo que supone un gasto de 8,7 billones de dólares (3). Por tanto, no sólo nos enfrentamos a un problema de salud sino también económico.

A pesar de los grandes avances en el tratamiento de las fracturas de huesos largos en las últimas décadas, el mecanismo biológico de consolidación y remodelado de las mismas no es un campo conocido por completo (5). Numerosos procesos deben llevarse a cabo para la consolidación de la fractura, haciendo que cualquier fallo desencadene un retraso de esa consolidación o incluso el fracaso de la misma.

De todas las fracturas que se producen anualmente, se estima que entre un 6 y un 10% evolucionarán a retraso o a la no consolidación de la fractura y su tratamiento es uno de los mayores retos a los que un cirujano debe enfrentarse

(6). Actualmente en Estados Unidos, se registran unos 600.000 retardos de consolidación al año (7), de los cuáles 100.000 evolucionan a pseudoartrosis (8, 9). Estas cifras nos dan una idea del problema al que nos enfrentamos.

La prevalencia de la pseudoartrosis es muy variable. Depende en gran medida del hueso que sufre la fractura y del tratamiento indicado para la misma. Tomando como ejemplo una fractura diafisaria de fémur tratada con un enclavado anterógrado, la tasa de pseudoartrosis supone entre un 2 y un 8% (10); sin embargo en la tibia, con el mismo método de osteosíntesis, aumenta hasta 16-80% según las series actuales (11).

Aunque la incidencia de pseudoartrosis en pacientes osteoporóticos no está claramente determinada, se han estudiado las tasas de fallo de los implantes utilizados en pacientes osteoporóticos. Es evidente que no todos los fracasos de síntesis de los pacientes osteoporóticos van a ser por un retardo en la consolidación, pero nos da una idea aproximada del porcentaje de casos afectados (12). Un estudio realizado en 2007 por Parker revela una tasa de pseudoartrosis en fracturas femorales del 19% que se incrementa hasta casi un 25% en el caso de que el paciente supere los 70 años de edad. Si bien no se estudió la variable de la osteoporosis como causa de este aumento, si es cierto que los pacientes mayores de 70 años presentan un riesgo aumentado de pseudoartrosis (13).

Al encontrarnos con una población envejecida, con múltiples comorbilidades asociadas, es de esperar que tengan diferentes tratamientos farmacológicos, que puedan alterar la consolidación de las fracturas. Además dado que casi un 30% de la población mayor de 65 años está diagnosticada y recibe tratamiento para la osteoporosis (14), es interesante saber hasta qué punto estos fármacos alteran la consolidación de las fracturas, tanto positiva como negativamente.

El tratamiento de las pseudoartrosis es muy complejo y conlleva un elevado impacto económico. Los costes directos estimados actualmente oscilan en torno a los 25.000 US dólares por paciente (15). Si además sumamos los costes indirectos como las pérdidas de productividad del enfermo, estos costes se disparan. Por tanto cualquier estrategia que intente mejorar esta perspectiva económica puede ser de gran utilidad (9, 16).

Por todo lo anteriormente expuesto, surge la necesidad de estudiar si existen fármacos que ayuden a la consolidación. En principio, parece que los fármacos utilizados para el tratamiento de la osteoporosis podrían ser los ideales, ya que actúan como moduladores de los mecanismos de reparación ósea. El presente estudio valora la utilidad del tratamiento con uno de estos fármacos en la pseudoartrosis: el ranelato de estroncio.

1.2. La fractura.

Podemos definir la fractura como aquella pérdida de continuidad del hueso que hace que se produzca una movilidad anómala y la pérdida de sus funciones básicas de soporte y protección (17, 18). Además de la discontinuidad del tejido óseo, se produce la lesión de las partes blandas circundantes que liberarán una serie de factores que marcarán el inicio del proceso de consolidación (19).

Desde el punto de vista biomecánico, la capacidad del hueso para resistir una determinada carga sin romperse dependerá del tamaño del hueso, de la distribución o microarquitectura que presente y de su composición. Además cada hueso tiene unas características específicas (tamaño, forma, composición) que le confieren la capacidad de resistir una fuerza determinada por su magnitud y su dirección. En ocasiones el hecho de aplicar una fuerza de menor magnitud pero con una dirección que el hueso no está diseñado para soportar puede producir la fractura (18, 20).

El tejido óseo es el único tejido de nuestro organismo que tiene la capacidad de regenerarse sin dejar una cicatriz fibrosa; es decir tras el periodo de consolidación el tejido formado será histológicamente igual al previo a la fractura (21). Esto no quiere decir que cuando la fractura consolide lo haga de manera satisfactoria. Debido a las diferentes fuerzas que actúan sobre el hueso, los fragmentos pueden sufrir desplazamientos haciendo que esa fractura consolide en mala posición y alterando la funcionalidad. Nuestro papel a la hora de tratar estas fracturas será el de conseguir que el hueso consolide en la posición adecuada, para restablecer sus funciones lo antes posible. Con la batería de materiales de osteosíntesis con la que contamos, también podemos hacer que se recuperen las funciones del hueso mientras este consolida, acortando por tanto los tiempos de convalecencia de los pacientes (17, 18).

1.2.1 El proceso de consolidación de la fractura

Como ya se ha mencionado, la fractura de un hueso largo tiene dos consecuencias inmediatas: la pérdida de integridad mecánica y la discontinuidad física del hueso. Con la consolidación de la fractura se estabiliza el foco de dicha fractura y se restaura la continuidad del hueso recuperando así sus propiedades (22).

El término “callo de fractura” se refiere a la formación de hueso que rellena ese defecto producido por la fractura. Su proceso de formación comienza inmediatamente después de producirse la fractura (17, 22).

La consolidación es un proceso fisiológico. Los avances en biología celular y molecular nos han permitido conocer más a fondo el funcionamiento de los diferentes tipos celulares, proteínas y genes vitales para restaurar la integridad del hueso sin formación de tejido cicatricial residual (23). Cualquier agresión o alteración de ese equilibrio, tanto espacial como temporal, puede alterar la cascada de consolidación y hacer que el proceso se detenga.

El tejido óseo se comporta (biológica y mecánicamente) de diferentes maneras según el tratamiento escogido por el cirujano. Si éste decide un tratamiento quirúrgico en el cual el sistema de fijación utilizado nos otorgue estabilidad absoluta dará lugar a una consolidación “directa o primaria”. Si el sistema utilizado le da a la fractura una estabilidad relativa (como el tratamiento ortopédico o los enclavados) la consolidación se producirá de forma “indirecta o secundaria” (21, 24, 25).

Aunque la importancia de la estabilidad mecánica no es discutible, también merece la pena destacar que estas actuaciones quirúrgicas deben estar coordinadas en tiempo y espacio con la evolución de la fractura, para no interrumpir ni dificultar el proceso (23).

1.2.1.1 Consolidación directa o primaria.

Este proceso de consolidación no tiene lugar de manera natural. Requiere una reducción anatómica de la fractura, sin espacios interfragmentarios y de un sistema de fijación que le confiera una estabilidad absoluta; por tanto es un proceso que sólo se produce cuando el cirujano actúa con un sistema de fijación interna que confiere estabilidad absoluta y mantiene los extremos fracturarios a compresión (17, 21, 24).

Si el espacio entre fragmentos es menor de 0,01mm, la tensión entre ellos será menor de un 2% y se producirá una consolidación “por contacto” (21). En estas condiciones se formarán las unidades de remodelado o *cutting cones* cerca del foco fracturario.

Los *cutting cones* (Figura 1) se componen de osteoclastos en la zona de avance; éstos cruzan el foco fracturario generando cavidades longitudinales que serán rellenadas posteriormente de hueso generado por osteoblastos, situados en la zona más retrasada de la unidad de remodelado. A consecuencia de estas acciones se crean verdaderos puentes óseos entre ambos fragmentos y el restablecimiento de los sistemas de Havers en dirección axial (21, 26).

En los sistemas recién formados se producirá una invasión de vasos sanguíneos que llevarán formas precursoras osteoblásticas; estas osteonas

recién formadas madurarán y se remodelarán de forma directa dando lugar al hueso laminar (17, 19, 21, 26, 27).

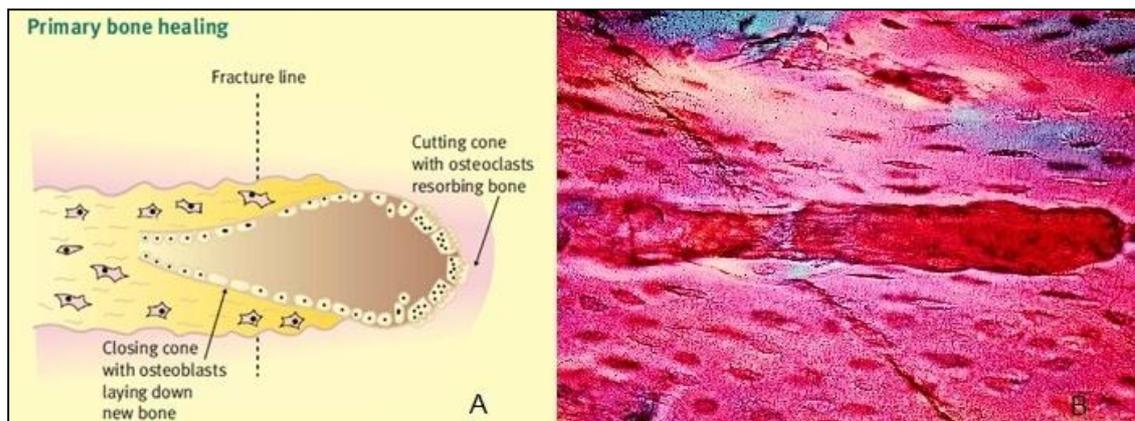


Figura1: (A) Diagrama del cono de corte; la zona frontal presenta numerosos osteoclastos que reabsorben el tejido óseo desvitalizado mientras que en la cola se asientan los osteoblastos cuya misión es la de crear nuevo hueso que rellene el canal hecho por los osteoclastos. (B) Preparación histológica en la que se visualiza el cono de corte, característico de la consolidación primaria o directa. Fuente: K.Ito SMP. Biology and Biomechanics in Bone Healing. AO Principles of Fracture Management. expanded s, editor2007. 9-31 p y Rajeev Jahagirdar BS. Principles of fracture healing and disorders in bone union. Surgery. 2008;27(2):63-9

1.2.1.2 Consolidación indirecta o secundaria.

Es la forma de consolidación más común; en este caso el cirujano no actúa sobre la fractura otorgando estabilidad absoluta sino que la estabilización es relativa. Un ejemplo de esto son los enclavados, sistema de osteosíntesis utilizado en este estudio y sobre el que desarrollamos nuestro modelo de pseudoartrosis (24).

Entre los fragmentos tiene lugar micromovimientos que estimulan la formación del callo de fractura y consolidación mediante la combinación de osificaciones endocondral y membranosa (24, 25, 28).

Los micromovimientos que tienen lugar en el foco de fractura estimulan la consolidación. Sin embargo no deben ser excesivos pues pueden causar el efecto contrario: retardos de consolidación y pseudoartrosis. Siempre que la distancia interfragmentaria sea menor de 2 mm, la amplitud del movimiento no sea mayor de 1 mm y que ese movimiento se produzca siguiendo el eje mayor del hueso fracturado, favorecerán la formación del callo de fractura (22, 26).

El callo de fractura

La consolidación de la fractura no solo involucra a los fragmentos óseos afectados sino que las estructuras circundantes también juegan un papel muy importante en todo el proceso. Principalmente participarán, en mayor o menor medida, cuatro elementos básicos que son (22, 24, 25, 27, 29):

- El hueso cortical.
- El periostio.
- Tejido fascial indiferenciado cercano al foco.
- Médula ósea.

Podemos dividir el proceso de consolidación en diferentes fases; los estadios básicos son la inflamación, la reparación y el remodelado (25, 29, 30) (Figura 2).

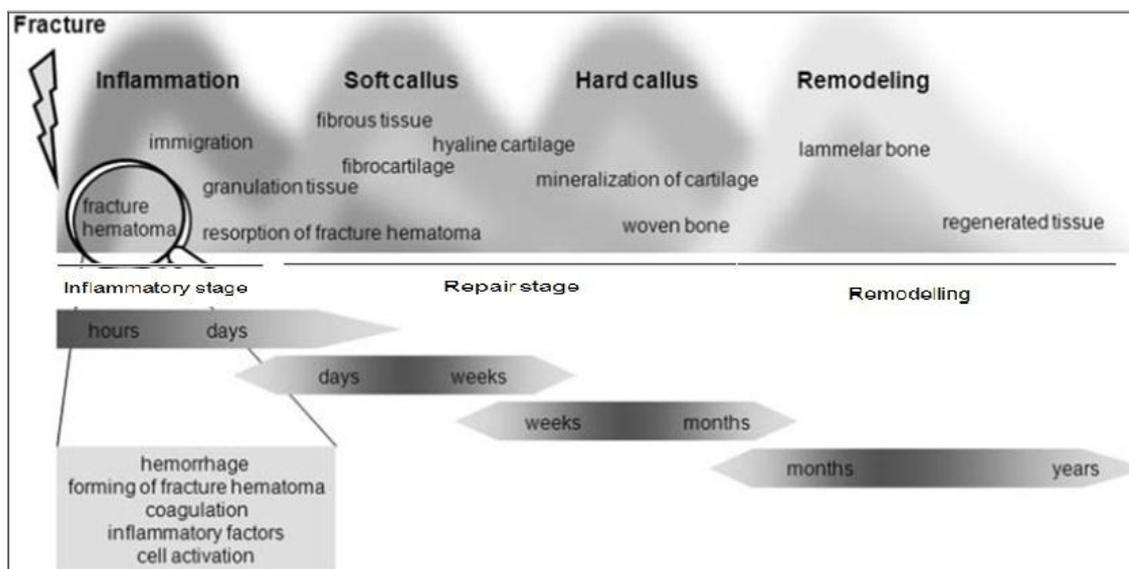


Figura 2: Diagrama del proceso de consolidación; división en varias partes que se suceden y solapan en el tiempo. Fuente: Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, et al. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. Tissue engineering Part B, Reviews. 2010; 16(4):427-34.(25)

Fase inflamatoria.

La reacción inmediata a la fractura es el sangrado, tanto del hueso como de los vasos y resto de partes blandas circundantes. Éste dará lugar a un hematoma que marca el inicio de la fase inflamatoria y el comienzo del proceso de consolidación (25). Esta fase es vital para la correcta consolidación pues dará

lugar a un coágulo entre los fragmentos que hará las veces de “plantilla” para el futuro callo de fractura (27, 31, 32).

Al mismo tiempo, los bordes fracturarios se presentan como una zona marginal avascularizada que se necrosa; estas células necróticas liberarán sustancias quimiotácticas, que inician la respuesta inflamatoria mediante la infiltración del hematoma por células inflamatorias (28).

La respuesta inflamatoria es muy potente y capaz de iniciar la consolidación, sin embargo, si no es autolimitada puede producir daño a nivel local; por eso diversos sistemas reguladores limitan su duración a una semana aproximadamente (17, 19, 28, 33).

Las primeras 24 horas son las más importantes, en éstas se producirá un pico de secreción de moléculas proinflamatorias, críticas para el correcto desarrollo del callo; estas moléculas son el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) y las interleuquinas-1 (IL-1), IL-6, IL-11 e IL-18.

Estos factores mencionados son primordiales ya que tienen capacidad de reclutamiento de células inflamatorias y promueven la angiogénesis (21). Además de todo esto, Tsuji et al (34) han encontrado en la proteína ósea morfogénica 2 (BMP-2) otro factor clave ya que detectan un aumento brusco en su secreción durante estas primeras 24 horas. Su importancia radica en su capacidad como señal de respuesta rápida ante una fractura (24, 34).

El TNF α presenta un aumento brusco de concentración a las 24 h de la producción de la fractura y volverá progresivamente a sus niveles basales a las 72h de la misma. En ese tiempo el TNF α es expresado por las células inflamatorias, entre ellas los macrófagos y se cree que su acción principal es inducir la respuesta inflamatoria secundaria. In vitro se ha demostrado que induce la diferenciación de células mesenquimales indiferenciadas hacia la línea osteogénica (21, 27, 28).

La IL-1 y la IL-6 se consideran como las moléculas más importantes para el proceso de consolidación de la fractura. En el caso de la IL-1 su expresión es bifásica coincidiendo en la fase aguda con la producción del TNF α . En la fase aguda de la inflamación estimula la secreción de IL-6 por los osteoblastos, la formación del callo cartilaginoso y la angiogénesis (21, 27).

La IL-6 solamente se produce en la fase aguda con los objetivos de estimular la angiogénesis, la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la diferenciación de osteoblastos y de osteoclastos (21).

Para que el hueso pueda consolidar es esencial la presencia de células mesenquimales indiferenciadas (35). Éstas proceden tanto de tejidos próximos (periostio y médula ósea), donde es esencial el papel del TNF α para la diferenciación a línea osteogénica, como de la circulación sistémica en la que las BMPs 2 y 7 juegan un papel importante para su reclutamiento desde el torrente sanguíneo a la zona de fractura (21, 27, 36).

Actualmente existen numerosas líneas de investigación que están probando el uso de estas moléculas en estudios clínicos para casos en los que la consolidación ha fracasado (23).

Fase de Reparación.

Aproximadamente al décimo día, el hematoma se rellena de tejido de granulación rico en fibrina (24, 37). Este tejido dará lugar a la osificación endocondral en la zona más periférica del foco, externo al periostio. Este tejido cartilaginoso es el que formará el callo blando de fractura, cuya misión es la de dar estabilidad al foco de fractura, evitar acortamientos y servir de molde al callo duro (21, 26). Al mismo tiempo que ocurre esto, bajo el periostio, comienza la osificación membranosa en las zonas más alejadas al reborde óseo fracturario y siempre subperióstico; esta formación dará lugar al callo duro y es la que otorga a la fractura la rigidez necesaria para permitir la carga (21).

La consolidación secundaria utiliza por tanto diferentes vías de osificación teniendo en cuenta la localización (médula ósea, periostio, inter-corticales y partes blandas circundantes).

Consolidación endostal: Se origina en la cavidad medular. Los componentes celulares de la médula se agruparán en dos zonas, una de alta y otra de baja densidad. En la zona de alta densidad celular, las células de la médula ósea se transformarán en precursores osteoblásticos que serán los responsables de la producción del callo endostal, a diferencia de las otras zonas implicadas (cortical, periostio y partes blandas circundantes), la zona medular está menos afectada por influencias de tipo mecánico (23, 28, 38).

Consolidación periostal: Tiene lugar a nivel subperióstico. Esta consolidación precisa de las dos formas de osificación, tanto la endocondral como la membranosa. La osificación intramembranosa ocurre relativamente rápido observándose en las zonas más alejadas de la fractura. Esto es debido a que este tipo de osificación precisa de un abundante aporte de oxígeno y bajas demandas mecánicas. Por eso no es posible que aparezca a nivel de la fractura donde las condiciones tanto mecánicas como vasculares son peores (18, 28, 39). El punto de referencia de esa tensión de oxígeno y estabilidad lo

marca el periostio; internamente a éste se producirá la osificación intramembranosa en zona mecánicamente más estable y externamente a él la endocondral, en zona más inestable mecánicamente (18, 32).

Consolidación entre las zonas terminales de hueso cortical: Es la zona más inhóspita del foco de fractura; en ella la tensión de oxígeno es baja y el pH está disminuido por el acúmulo de lactato debido a un insuficiente aporte vascular y a la inestabilidad mecánica de la zona (25, 39). Esto implica que la osificación intramembranosa no se puede llevar a cabo y en su lugar se desarrollará la endocondral (18, 38). La diferencia básica entre ambos tipos es el uso de un precursor cartilaginoso en el caso de la osificación endocondral. Cuando hay menor aporte sanguíneo el tejido formado es cartilaginoso, que es energéticamente menos demandante; así se confiere cierto grado de estabilidad al foco de fractura permitiendo la formación de yemas vasculares que aporten oxígeno a estas zonas y se sustituya ese tejido cartilaginoso por el hueso recién formado (18, 30, 31).

Consolidación del tejido fascial y de las partes blandas circundantes: Como en el caso de la consolidación entre los fragmentos corticales, la situación mecánica y vascular es precaria; por eso también tendrá lugar la osificación endocondral en esta zona (18).

La generación de ambos callos es totalmente dependiente de la aparición de células mesenquimales indiferenciadas, tanto de los tejidos cercanos implicados como de la sangre periférica. Tras su aparición, se desencadena la producción de matriz colágena de tipo I y tipo II. En este proceso la superfamilia del Factor de crecimiento transformante (TGF- β) parece tener gran importancia; sobre todo los TGF- β 2, TGF- β 3 y GDF-5 que está involucrados en la condrogénesis y por tanto en la osificación endocondral. Se cree que las BMP5 y 6 pueden estar relacionadas con la osificación intramembranosa (34).

Como ya se ha mencionado antes, la osificación intramembranosa no necesita de un precursor cartilaginoso para la formación de nuevo hueso mientras que la endocondral sí; en este aspecto se puede destacar que el paso de tejido cartilaginoso a óseo en este segundo tipo de osificación puede ser un punto de inflexión a la hora del correcto funcionamiento de la cascada de consolidación (24). Para que este callo blando se mineralice correctamente y pase a callo duro inmaduro, es vital la interacción con las células angiogénicas (24, 33).

A medida que el callo cartilaginoso progresa, los condroblastos se hipertrofian y la matriz extracelular se calcifica. Para que se produzca la calcificación de la matriz extracelular los condroblastos hipertrofiados deben segregar calcio y proteasas, que degradan la matriz y permiten su mineralización. En cuanto las

proteasas degradan los proteoglicanos de la matriz, se liberan iones de fósforo necesarios para su precipitación con los de calcio. Una vez que el callo cartilaginoso ha sido mineralizado comienza la angiogénesis (24, 40).

Durante la osificación endocondral es necesaria la apoptosis de los condrocitos y de su matriz para que se produzca la invasión por las nuevas yemas vasculares favoreciendo así la mineralización. Las moléculas más importantes en este proceso son el VEGF y la angiopoyetina (21). La angiopoyetina se segrega en las primeras horas de la fractura; ésto sugiere que su función es favorecer que se establezcan nuevos vasos desde los ya existentes (29).

Se cree que el VEGF es el factor regulador más importante para la vascularización del callo de fractura porque es neoangiogénico (21). Los osteoblastos y los condrocitos hipertróficos expresan esta citoquina y gracias a la creación de estos vasos llegarán más células mesenquimales indiferenciadas al callo de fractura favoreciendo aun más la mineralización del callo blando (24, 33).

El proceso de formación del callo duro está regulado por el M-CSF, RANK-L, OPG y TNF- α (21, 24, 40) El TNF- α sigue con su función reclutadora de células mesenquimales indiferenciadas, aunque en esta fase parece que su función más importante es inducir la apoptosis de los condrocitos (24). Por otro lado, las moléculas M-CSF, RANK-L y OPG serán las responsables de la activación de la línea osteoclástica, comenzando así la resorción del cartílago calcificado (21, 41).

Fase de Remodelado.

Una vez tenemos el callo de fractura formado, podemos decir que la continuidad física ha sido restaurada; no obstante es un tejido que no cumple con las propiedades del tejido óseo en cuanto a la histología y biomecánica se refiere; es desorganizado. El remodelado óseo no es otra cosa que la adaptación de ese callo a la estructura laminar con su cavidad medular y forma debidamente restauradas; este proceso es el más largo de todos pudiendo tardar años en completarse (18, 21, 42).

El patrón trabecular del tejido óseo está caracterizado por su orientación, de tal manera que sus líneas siguen las de mayor estrés para el hueso (42). Este concepto sigue la "ley de Wolf" del remodelado que dice que los cambios producidos en esta fase ocurren como respuesta a las demandas mecánicas sobre ese callo de fractura; es lo mismo que ocurre en el recambio del tejido óseo sin fractura previa (23, 38, 42).

IL-1 y 6 aumentan de nuevo en esta fase mientras que RANK-L, M-CSF y TGF- β disminuyen sus niveles (32).

1.3. Diagnóstico: ¿Cómo sabemos si la fractura ha consolidado?

A pesar de que el seguimiento de la consolidación de las fracturas es tarea habitual en nuestra práctica clínica y existen numerosos estudios que abordan este tema, existe una gran variabilidad entre los profesionales a la hora de determinar el éxito de la consolidación y su definición continua siendo tema de debate. Esto es debido a que es un proceso largo, complejo y continuo por lo que se hace imposible determinar un punto de inflexión en el cual pasemos de “fractura sin consolidar” a “fractura consolidada” (43).

Todos los cirujanos usamos los mismos factores pronósticos para valorar el retraso de la consolidación y pseudoartrosis, sin embargo parece que no existe consenso en cuanto a la importancia que les damos a esos factores ni a la definición exacta de estas dos entidades (Figura 3) (43-45).

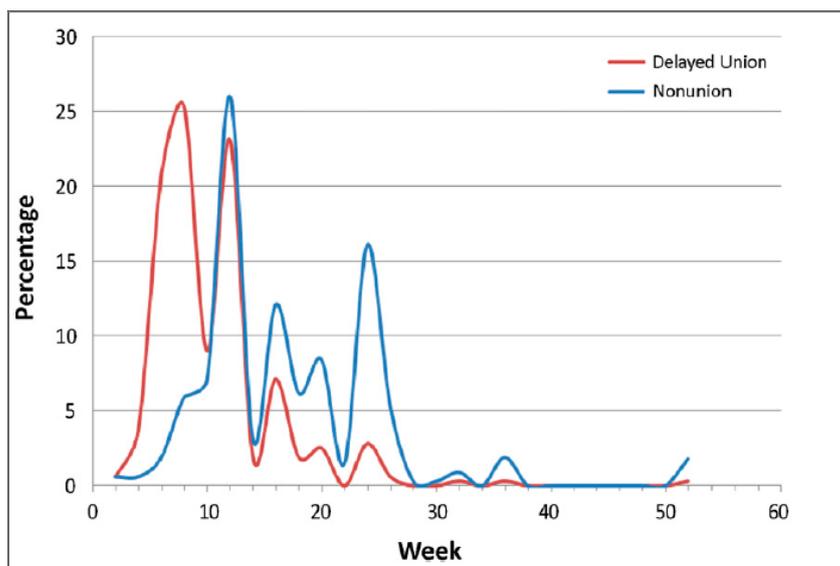


Figura 3: Predicción de ocurrencia de retrasos de consolidación y pseudoartrosis en fracturas de diáfisis humeral. Este gráfico es un ejemplo en el que los cirujanos diagnostican de retrasos de consolidación y pseudoartrosis. La mayoría considera el diagnóstico retraso en torno a la 8^a-12^a semana mientras que la pseudoartrosis en torno a la 12^a-24^a semana. No obstante se objetiva bastante variabilidad interobservador. Fuente: Bhandari M, Fong K, Sprague S, Williams D, Petrisor B. Variability in the definition and perceived causes of delayed unions and nonunions: a cross-sectional, multinational survey of orthopaedic surgeons. The Journal of bone and joint surgery American volume. 2012;94(15):e1091-6.

Establecer una definición estandarizable de los trastornos de consolidación tiene importancia tanto en la práctica clínica como en el ámbito de la

investigación. Si no existe una definición clara, los resultados de los estudios que realicemos pueden no ser comparables y en el caso de la práctica clínica pueden considerarse consolidadas fracturas que realmente no lo están y a la inversa.

Bhandari et al (44) realizan en 2012 un estudio en el que se valora el consenso de los cirujanos a la hora de diagnosticar retardo de consolidación y pseudoartrosis. El 88% de los cirujanos preguntados se decantan por catalogar de retardo de consolidación a aquella fractura en hueso largo que no consolida al 3^{er}-6^o mes y de pseudoartrosis a la que no lo hace a pesar de estar entre el 6^o y el 9^o (44).

Aunque diferimos en cuanto al tiempo de evolución y diagnóstico, lo que la gran mayoría de los cirujanos tenemos en común es el modo de evaluación de la fractura. En nuestra práctica clínica habitual la manera de evaluar si la fractura evoluciona hacia la consolidación de forma adecuada es mediante una serie de criterios clínicos y radiológicos (44-46).

1.3.1 Criterios diagnósticos clínicos.

El punto de partida debe ser una correcta exploración clínica. Debemos anticiparnos a los problemas que pueda suscitar la consolidación de una fractura sabiendo todos aquellos factores de riesgo que presente el paciente, tanto los dependientes de éste (fumador, vasculópata, desórdenes genéticos), como los relacionados con la propia fractura (conminución de la fractura, estado de partes blandas, pérdida ósea) (8, 9).

Existen diversos síntomas que pueden relacionarse con un fracaso de la consolidación; el factor predictor más consistente es el dolor con la carga sobre la extremidad afecta (46). Si este dolor se mantiene durante 3 meses tras la fractura será indicativo de retardo de la consolidación, si se prolonga más en el tiempo (hasta 6 meses) nos hará sospechar de una pseudoartrosis (44, 47).

Si bien este síntoma es el que más se relaciona con la falta de recuperación, existen otros síntomas que, sin presentar tanta consistencia, también se deben tener en cuenta como son: el dolor a nivel de la fractura, la sensación de fallo de la extremidad con la carga, la incapacidad para realizar las actividades de la vida cotidiana, el dolor a la palpación, etc (44, 47).

Desde el punto de vista médico, utilizar la clínica del paciente como único método diagnóstico de consolidación puede ser además de complicado muy inexacto; la clínica debe ser un motivo de sospecha, pues los síntomas descritos no son objetivables por el médico. En este sentido los test de calidad

de vida, pueden jugar un papel muy importante; son la única manera que tenemos en la actualidad de “objetivizar” los síntomas del paciente (48).

Busse et al (47, 49) demostraron que los test de calidad de vida *Short Form 36* (SF-36) así como el *Short musculoskeletal function assessment questionnaire* (SMFA-D) presentan diferencias estadísticamente significativas a la hora de diferenciar que pacientes se sienten recuperados de sus fracturas y los que desarrollan problemas de consolidación.

Existen a su vez, otra serie de datos clínicos objetivos que el médico puede recabar, como son los estudios que valoren la fuerza y resistencia mecánica del callo de fractura. Estas pruebas se basan en la determinación del cambio en la elasticidad ósea, la transmisión de ondas a través del callo, etc. Aunque presentan resultados excelentes en estudios experimentales, todavía no tienen aplicación en la práctica clínica diaria (43, 50).

1.3.2. Criterios diagnósticos radiológicos.

Las radiografías seriadas son la “piedra angular” del seguimiento de una fractura; tanto es así que en estudios como el de Corrales et al (45), determinan que hasta un 37% de los cirujanos, consideran que utilizando únicamente estos parámetros podemos diagnosticar al paciente de un trastorno de consolidación.

Los criterios más utilizados por los especialistas a la hora de determinar radiográficamente si una fractura ha consolidado son: la aparición de trabéculas y puentes óseos, la existencia de 3 ó 4 corticales entre ambos fragmentos y la obliteración o borramiento de la línea de fractura (43, 45).

Estos criterios no presentan el mismo grado de variabilidad inter e intraobservador. Whelan et al (51) publicaron un estudio en 2002 en el que destaca la mayor concordancia de resultados interobservador para el diagnóstico de presencia de 3 ó 4 corticales frente a la desaparición de la línea de fractura ($\kappa = 0,75$; 95% intervalo de confianza, 0,61-0,89 frente a $\kappa = 0,70$; 95% de intervalo de confianza, 0,56-0,84 respectivamente).

Aunque sí se trata de una medición objetiva de la evolución de la fractura, no existe una correlación muy fuerte entre la aparición del callo de fractura y la rigidez y resistencia del callo pues las imágenes radiográficas de consolidación siempre aparecen más tarde que la mejoría subjetiva del paciente. Por tanto, parece que lo más adecuado es la combinación de seguimiento radiográfico y estudio clínico del paciente para valorar la evolución de la fractura (8, 45, 52).

El estudio radiológico, es el método más utilizado en el 98% de los cirujanos y lo prefieren como herramienta de seguimiento habitual. Sin embargo, en casos complejos, la radiografía puede ser insuficiente. La utilización de la Tomografía Computarizada (CT) así como otros métodos diagnósticos tienen cabida en este apartado como técnicas de apoyo (9, 45).

La Tomografía Computarizada (CT) se utiliza sobre todo en fracturas que sabemos que tienen alta tasa de problemas de consolidación (como en el escafoides) o que por sus características, la valoración radiográfica puede ser dificultosa (gran conminución, material de osteosíntesis). En estos casos, la valoración puntual de esta técnica de imagen puede ser muy beneficiosa, ya que aporta una visión en tres dimensiones de la fractura, elimina superposiciones y tiene más sensibilidad y especificidad que la radiografía convencional (8, 9, 53).

Se ha valorado en numerosas ocasiones la posibilidad de realizar el seguimiento rutinario mediante el CT (8, 47, 53). En este sentido, el CT es un arma de doble filo; Bhattacharyya et al (54) demuestra, en un estudio publicado en 2006, una sensibilidad del 100% con un 62% de especificidad del CT como técnica de diagnóstico en pseudoartrosis de tibia con enclavado endomedular. Esto nos pone en una situación delicada, por un lado su alta sensibilidad podría hacerlo ideal como método de screening, sin embargo la especificidad tan baja, da lugar a numerosos falsos positivos que se traducen en pacientes que se someterían a cirugías muy agresivas sin necesidad de ello. Si a esto le sumamos el elevado coste que supone realizar esta prueba y las elevadas dosis de radiación a las que sometemos al paciente, parece lógico que actualmente sólo se utilice en casos complicados, como técnica de segunda línea tras el screening con la radiología convencional (8).

Con el objetivo de mejorar todas nuestras estrategias de diagnóstico, se han comenzado a utilizar otras técnicas auxiliares, como la ecografía y la absorciometría para el seguimiento de las fracturas. Si bien, es cierto que la absorciometría necesita de un CT para la cuantificación volumétrica de mineral que hay en el callo, parece que sus resultados son reproducibles y prometedores; no obstante una vez más son técnicas más utilizadas en investigación que en la práctica clínica por su inaccesibilidad para esta patología (55, 56).

Uno de los grandes inconvenientes de la radiografía convencional es que tardamos entre 6 y 8 semanas en comenzar a detectar cambios en la fractura; esto hace que sea una técnica de poca sensibilidad en las primeras fases de la consolidación (55). En este sentido, la utilización de la ecografía en las primeras semanas podría ser interesante ya que puede detectar cambios en el

callo en la fase inicial, 1-2 semanas post-fractura (56). Además la reciente evolución de esta técnica hacia el *Power Doppler Ultrasonography* o PDU hace incluso que podamos detectar el grado de vascularización del callo, que como ya sabemos es esencial para su correcta consolidación (57, 58).

Con toda la batería de pruebas de imagen que actualmente están en auge, puede que con el paso de unos años, la utilización de las técnicas básicas de radiología y tomografía queden obsoletas, aún cuando estas técnicas ahora mismo son inalcanzables para la mayoría de los especialistas. La curva de aprendizaje que presentan además de la falta de estudios que demuestren su reproducibilidad, hacen que por el momento el seguimiento de una fractura se base principalmente en la clínica y en la radiografía seriada, dejando el CT para la valoración del seguimiento en fracturas más complejas (55).

1.3.3. Otros criterios diagnósticos.

1.3.3.1. Marcadores bioquímicos a nivel sistémico.

Como ya se ha explicado en apartados anteriores, la cascada de consolidación empieza inmediatamente después de que se produzca la fractura e implica toda una serie de moléculas y células, que podrían ser de utilidad para valorar en qué fase de la consolidación nos encontramos (19, 47, 59). Sin embargo llevar esta teoría a la práctica no es tan sencillo como pueda parecer. Los niveles de factores de crecimiento, hormonas, etc. oscilan durante todo el proceso. Además según el tipo de hueso con el que nos encontremos y sus niveles podrán variar. Parece lógico pensar que los niveles de proteínas liberadas por fracturas de huesos largos más grandes (fémur, tibia) serán más altos que los de huesos más pequeños (radio, escafoides) (47, 60).

Aunque existen marcadores que derivan de la resorción ósea y los osteoclastos (61), otros derivan de la formación ósea y los osteoblastos. Se han estudiado ampliamente estos últimos y destacan entre ellos la fosfatasa alcalina específica del tejido óseo (ALP), el propéptido N-terminal del procolágeno tipo I (PINP), el propéptido N-terminal del procolágeno tipo III (PIIINP), el propéptido C-terminal del procolágeno I (PICP) y la osteocalcina (OC) (59). Lo más destacable de estos estudios es que muestran una gran variabilidad en cuanto a cantidad y tiempo, y que su aparición va relacionada con la fase de sustitución del callo blando por el duro, lo cual es menos apropiado para un diagnóstico precoz. Serían de mayor utilidad marcadores que aparecieran antes (62-64); dicho de otro modo, durante el seguimiento de un paciente en consultas, tenemos un periodo de unas 6-8 semanas en las que no podemos saber si hay problemas con la consolidación porque no tenemos herramientas diagnósticas. Por tanto encontrar un marcador que nos dé información sobre

ese periodo es de vital importancia; el TGF β 1 podría ser una aportación a la solución de este problema (65) (Figura 4).

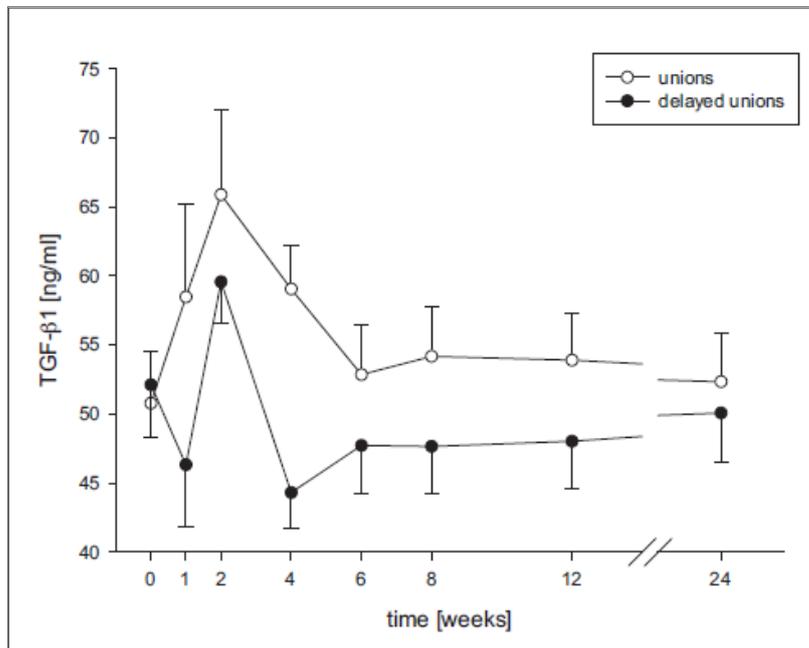


Figura 4: Niveles de TGF β 1 en concentraciones absolutas. Se puede ver como las concentraciones de TGF β 1 disminuyen drásticamente en el grupo de pseudoartrosis frente a las concentraciones del grupo control. Fuente: Hankenson KD, Zimmerman G, Marcucio R. Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury*. 2014;45 Suppl 2:S8-S15.

En los estudios realizados sobre esta molécula, se observa como sus niveles suben durante la segunda semana para volver a los niveles de referencia a la sexta. Llama la atención que en pacientes con retrasos de consolidación presentan valores muy por debajo de lo normal ya en la cuarta semana (figura 4), haciendo que esta molécula se presente como el futuro marcador, en el diagnóstico precoz de la pseudoartrosis (59, 65, 66).

1.3.3.2. Diagnóstico Histológico.

Este tipo de diagnóstico nos aporta una información esencial y generalmente de certeza cuando tenemos dudas sobre la consolidación de una fractura. Sin embargo dado que es un método invasivo y cruento no se utiliza habitualmente en la clínica práctica. Cuando hemos llegado al diagnóstico de pseudoartrosis por los medios descritos con anterioridad y decidimos que la cirugía es el tratamiento a seguir, aprovechamos el acto quirúrgico para obtener muestras del foco de fractura con el objetivo de confirmar por medios directos el diagnóstico y descartar otras patologías, que pueden estar asociadas, como la osteomielitis crónica.

Tanto el análisis al microscopio como el ultraestructural nos aportan datos muy valiosos sobre el estado de consolidación de la fractura. Últimamente se está investigando el papel que desempeña la expresión génica en el callo de fractura. Posibles soluciones al problema del diagnóstico precoz podrían esconderse tras el análisis proteómico y su correlación con los cambios que se produzcan durante la consolidación, pero es un terreno que todavía está en plena fase de desarrollo; para que esto suceda, inicialmente debemos contar con un mapa celular fenotípico y molecular del patrón normal de la consolidación, lo cual todavía está en proceso de desarrollo (59).

Las muestras histológicas que vamos a obtener con frecuencia son las procedentes de cirugías de rescate de pseudoartrosis en las que no encontraremos continuidad, ni del hueso cortical ni del trabecular, presentando además indicios de necrosis, etc (67, 68).

Dependiendo del tipo de pseudoartrosis ante la que nos encontremos (atrófica o hipertrófica), los hallazgos histológicos serán diferentes.

Si la pseudoartrosis es atrófica, es decir con poco potencial biológico para la consolidación, a nivel macroscópico objetivaremos bordes esclerosados y en el análisis microscópico podremos confirmar este hallazgo (8). Lo habitual es que haya poco componente celular (condrocitos, osteoblastos, etc) y que aparezca mucho tejido fibroso entre los fragmentos (69) (Figura 5).

En 1997 Hernigou et al (70) demostró el bajo nivel de células mesenquimales indiferenciadas que existen en los focos de pseudoartrosis de tibia en comparación con los niveles encontrados en pacientes cuyo proceso de consolidación fue normal. Evidentemente, no podemos tomar muestras histológicas a todos los pacientes para tener un nivel de referencia con el que comparar aquellos casos que no consolidan; pero este concepto nos da una idea de porqué se produce la no consolidación y cuál puede ser la línea de actuación a seguir.

Otro problema es que a pesar de la existencia de capacidad biológica de consolidación, se presente una inestabilidad franca en el foco de fractura (8). Lo esperable en el análisis macroscópico es la ausencia de puentes óseos interfragmentarios, pero al analizar microscópicamente la muestra se observa abundante celularidad (condrocitos) y material osteoide rodeando estos fragmentos (69).

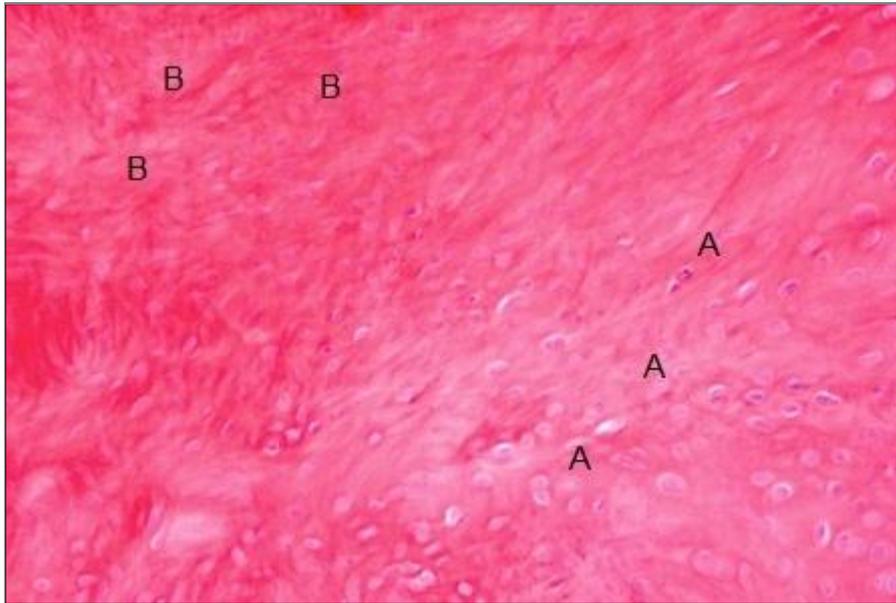


Figura 5: Preparación histológica de uno de los animales del estudio. Tinción Hematoxilina-eosina. Muestra de foco de fractura con pseudoartrosis atrófica. (A) Zona Activa con presencia de condroblastos formando osteoide. (B) Zona inactiva en la que se objetiva sobre todo una gran cantidad de material fibrilar y poca celularidad, característico de tejido fibrótico.

1.4. Factores que pueden alterar la consolidación.

La consolidación de una fractura es un proceso muy complejo. Presenta numerosas fases progresivas, es decir, sin la fase previa la siguiente no se puede realizar y además está regulado por multitud de células, mediadores, factores de crecimiento, etc (31). Si alguno de estas fases o alguno de estos mediadores implicados no funciona correctamente, puede desencadenar el trastorno de la consolidación y generar una pseudoartrosis (71).

Dada la gravedad de las consecuencias de un trastorno de la consolidación, es importante saber si el paciente que tenemos delante tiene mayor o menor riesgo de sufrir una pseudoartrosis. En este sentido nos podemos anticipar conociendo todos aquellos factores de riesgo que pueden condicionar el correcto desarrollo de la consolidación.

A continuación se describen brevemente los factores de riesgo más comunes.

1.4.1. Factores de riesgo relacionados con el paciente.

1.4.1.1. Factores genéticos.

Cualquier alteración en la expresión de los genes y moléculas implicadas puede alterar la consolidación.

A modo de ejemplo, expongo los casos más conocidos:

- Los polimorfismos en nucleótidos (SNP) de los genes conocidos por codificar moléculas inhibitoras de las BMP (Noggin y Smad6) se asocian de manera significativa al fracaso de la consolidación (41, 72).
- Se ha señalado la asociación significativa encontrada en un haplotipo de PDGF y las pseudoartrosis, indicando que algunos polimorfismos de este gen pueden estar relacionados con un aumento del riesgo de desarrollar pseudoartrosis (72-74).

1.4.1.2. Enfermedades sistémicas.

- Diabetes Mellitus: Tanto los pacientes del tipo I como lo del tipo II presentan más riesgo de pseudoartrosis. La alteración en los niveles de insulina hace que la producción de colágeno por parte de los osteoblastos esté disminuida. Determinados fármacos antidiabéticos, como son las tiazolidionas, tienen efectos antiosteogénicos. Además de esto, los niveles de hemoglobina glicosilada (HBA1c) superiores al 7%, la vasculopatía y la neuropatía periférica, que presentan estos pacientes, hacen que no sólo esté alterada la consolidación sino también la curación de partes blandas y que exista un mayor riesgo de infección (73-75).
- Obesidad: Las personas obesas tienen mayor predisposición a tener enfermedades de tipo músculo-esquelético y a sufrir complicaciones; la pseudoartrosis no es una excepción. Para el mismo tipo de fractura, el cirujano experimenta más dificultad en la reducción y en el tratamiento de partes blandas en personas obesas que en personas con índice de masa corporal normal. Además los sistemas de osteosíntesis no están diseñados para soportar cargas tan elevadas y a menudo se vuelven insuficientes. Todo esto hace que presenten mayor tasa de complicaciones en cuanto a la consolidación se refiere (73).
- Osteoporosis: Es una patología ósea cuya característica principal es el aumento del riesgo de sufrir una fractura por fragilidad del tejido óseo. Este hecho no debe confundirnos pues la fragilidad ósea no altera la consolidación de manera directa (13, 76). El aumento de la edad, las alteraciones en el

metabolismo óseo y el retraso de la maduración del callo sí son procesos que ocurren en los pacientes osteoporóticos y que pueden desencadenar alteraciones en la consolidación (73). Si a estos datos le sumamos la menor actividad del periostio, la aterosclerosis y la capacidad de respuesta de revascularización disminuida, tendremos como consecuencia un aumento de la tasa de pseudoartrosis en estos pacientes (73).

1.4.1.3. Edad avanzada.

Es un hecho que en los próximos años nos enfrentaremos a una población mayoritariamente envejecida. Esto conlleva que trataremos pacientes con mayores tasas de complicaciones; la pseudoartrosis es una de ellas (14).

La capacidad para mantener la estabilidad del foco de fractura de los sistemas de osteosíntesis se ve drásticamente disminuida por la osteoporosis y la respuesta a las señales moleculares y de las células osteoprogenitoras está mermada. De todos modos, no está del todo claro si estos sucesos se deben a la osteoporosis o a la edad propiamente dicha (3, 13, 73).

1.4.2. Factores relacionados con el ambiente.

1.4.2.1. Tabaco.

La nicotina inhibe la secreción de TNF α por medio de la activación de la vía colinérgica; además es un potente vasoconstrictor. Provoca una disminución de la perfusión tisular lo cual afecta de forma negativa, no sólo al proceso de consolidación, sino también a la recuperación de los tejidos circundantes, pudiendo ocasionar problemas con la cobertura cutánea de la fractura (39, 77).

Otras de las sustancias inhaladas con el tabaco es el monóxido de carbono. Éste tiene la capacidad de unirse a la hemoglobina con mayor afinidad que el oxígeno, con lo cual la capacidad de que llegue oxígeno al foco de fractura es menor aumentando así el riesgo de pseudoartrosis (8, 77).

1.4.2.2. Alcohol.

La ingesta excesiva de alcohol en el periodo postraumático inmediato, inhibe la formación ósea. Además el hueso neoformado carece de mineralización adecuada, lo que se traduce en un descenso de la estabilidad mecánica del foco aumentando el riesgo de pseudoartrosis (8, 73).

1.4.2.3. Fármacos.

A lo largo del tiempo que llevamos estudiando el proceso de consolidación, nos hemos dado cuenta que existen numerosos fármacos, utilizados para otras patologías que afectan de forma negativa a este proceso.

- **Corticoesteroides:** Son capaces de inducir la apoptosis, tanto en osteoblastos como en osteoclastos, además de inhibir la osteoblastogénesis. Como agentes antiinflamatorios afecta de forma negativa a la fase inicial de la consolidación, en la que la cascada inflamatoria es de vital importancia (73, 78).
- **Quimioterápicos:** Característicamente afectan aquellas células que tienen la capacidad de multiplicarse con rapidez, por eso no es de extrañar que la consolidación de las fracturas se vea afectada negativamente por ellos (78). Entre otros efectos negativos para la consolidación, destacan la inhibición de la neoangiogénesis y de la incorporación de los injertos óseos (73).
- **Antibióticos:** Las quinolonas son capaces de causar apoptosis en los condrocitos. El ciprofloxacino, que disminuye la síntesis de DNA y la proliferación celular o la gentamicina que en concentraciones elevadas disminuyen la proliferación de progenitores osteoblásticos son ejemplos evidentes del papel que juegan los antibióticos en la consolidación (73).
- **Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs):** Inhiben a la COX-2. Poco después de producirse la fractura, se activa la COX-2 y desencadena el proceso inflamatorio a nivel del foco fracturario (79). La COX-2 también es responsable de la fase de inducción de los osteoblastos así que es esencial en la cascada de la consolidación. Mientras la osificación endocondral se ve muy afectada por este tipo de fármacos, no hay hallazgos sugestivos de que la osificación intramembranosa sufra alteraciones (73, 80). Se ha comprobado en varios estudios en pacientes con fracturas que mantener más de 4 semanas el tratamiento con AINEs aumenta la tasa de pseudoartrosis (39, 81, 82).
- **Bifosfonatos:** Su administración produce un aumento en volumen y fuerza del callo de fractura. No obstante algunos autores creen que al inhibir el remodelado pueden tener un efecto similar al que ocurre con el cristal, es decir sea un callo rígido pero frágil (73).

1.4.3. Factores relacionados con el tipo de lesión.

Existen diversos factores relacionados con el tipo y gravedad de la lesión que pueden alterar de manera grave la consolidación.

Si la fractura se produjo por un mecanismo que implica alta energía es lógico pensar que puede causar problemas en la consolidación. El patrón de la fractura suele presentar más conminución y desplazamiento en estos casos, a menudo hay fragmentos óseos sin aporte vascular alguno (desperiostizados y desvascularizados), las partes blandas suelen estar más contundidas y el riesgo de lesión vascular asociada es mayor (75, 82, 83). Cuando el foco de fractura comunica con el exterior (fracturas abiertas) se pierde el hematoma fracturario, crucial en la fase inicial de la consolidación, además el riesgo de infección aumenta de manera drástica lo que también puede acarrear como consecuencia una pseudoartrosis (73, 82).

Atendiendo a la localización de la fractura dentro del hueso, el riesgo de pseudoartrosis puede variar. Las zonas con mayor aporte vascular, como las metáfisis, presentan menor riesgo de pseudoartrosis que las zonas con peor aporte vascular (75, 84).

1.4.4. Factores dependientes del tipo de tratamiento realizado.

El buen aporte vascular de los fragmentos óseos, así como el contacto directo, mantenido la estabilidad interfragmentaria entre ellos, es la situación más favorable para conseguir la consolidación de la fractura; sin embargo, si a la hora de realizar la cirugía no se es cuidadoso con las partes blandas, los abordajes son cruentos, se desperiostizan grandes segmentos fracturados o se dejan montajes inestables, en vez de ayudar a la consolidación se producirá un retardo de la misma (73, 82).

El enclavado de las fracturas es una técnica que respeta las partes blandas al máximo. Si bien es cierto que el fresado para la síntesis con clavos lesiona toda la circulación endostal, se ha comprobado en diversos estudios que a las 8-12 semanas esta se recupera de forma satisfactoria (17). Con la utilización del enclavado con bloqueo dinámico favorecemos la consolidación de la fractura mediante consolidación endocondral; Damos a la fractura la estabilidad relativa que necesita (siguiendo el eje mayor del hueso) y favorecemos los micromovimientos necesarios para la consolidación (85). Un enclavado con bloqueos estáticos puede resultar un montaje muy rígido para determinadas fracturas; ésto evitaría los micromovimientos impidiendo la correcta consolidación de las fracturas (85, 86).

1.5. El fracaso del proceso de consolidación: Pseudoartrosis.

El papel del traumatólogo va dirigido, en numerosas ocasiones, a valorar la evolución de las fracturas durante el proceso de consolidación. Para que nos hagamos una idea, como norma general la mayoría de las fracturas consolidan tras 3 ó 4 meses de evolución (46).

1.5.1. Definición de pseudoartrosis.

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, establecer el diagnóstico de pseudoartrosis no es tarea sencilla. El hecho de que la consolidación sea un proceso largo y continuo dificulta mucho a los cirujanos determinar en qué momento una fractura no va a consolidar (43). El primer paso a seguir no debe ser otro que la definición exacta, tanto del retardo de la consolidación como de la pseudoartrosis.

Bhandari et al (44) determina en 2012, el desacuerdo entre cirujanos a la hora de catalogar una fractura como no consolidada. Aún así determina que el 88% de los mismos consideran al retardo consolidatorio como la falta de consolidación antes del 6º mes y a la pseudoartrosis como la falta de consolidación antes del 9º mes.

La FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos establece una definición estandarizada basándose en dos criterios básicos: El tiempo de evolución de la fractura y los criterios radiológicos evolutivos. De este modo cataloga de pseudoartrosis a toda aquella fractura que no ha consolidado tras 9 meses de evolución y que además no ha mostrado signos radiológicos de mejora durante los últimos 3 meses (46, 82). No obstante, no deja de ser una definición que, como hemos descrito en apartados anteriores, depende de diversos factores, como el grado de vascularización, el tipo de hueso, la localización de la propia fractura, enfermedades del paciente, etc (46, 73).

1.5.2. Clasificación de la pseudoartrosis.

A la hora de clasificar el tipo de pseudoartrosis lo primero que debemos hacer es descartar una infección. Si no está infectada, es decir, si se trata de una pseudoartrosis aséptica, valoraremos el tipo de pseudoartrosis de la que se trata según las imágenes radiográficas que presenten (8, 82). La clasificación más conocida es la propuesta por Weber y Cech en la cual se describen los diferentes subtipos atendiendo a la capacidad biológica que presenta el hueso de consolidar (82, 84).

1.5.2.1. Pseudoartrosis Hipertrófica.

Podemos definir este tipo de pseudoartrosis como aquella que cuenta con la viabilidad biológica necesaria para que la consolidación se produzca con normalidad pero carecen de la estabilidad mecánica necesaria para que esto ocurra. Este fenómeno puede suceder por ejemplo, en fracturas tratadas de manera conservadora cuando son demasiado inestables o en indicaciones y tratamientos quirúrgicos inadecuados (82, 84, 87).

En la radiografía se puede ver callo más o menos voluminoso a ambos lados de la línea de fractura, pero no se ven puentes óseos que unan los fragmentos. Estos hallazgos radiográficos tienen una explicación muy sencilla; la formación del callo a ambos lados de la fractura que objetivamos radiográficamente tiene relación con la viabilidad vascular y del periostio, pero el exceso de movilidad en el foco hace imposible cualquier tipo de formación ósea en esa zona. Por tanto, una menor inestabilidad (síntesis estable) debería conducir a la consolidación de la fractura (46, 84) (Figura 6).

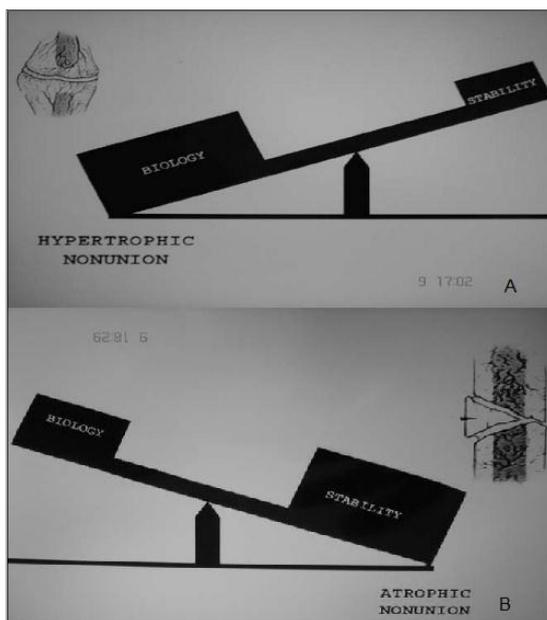


Figura 6: Esquemas representativos de los tipos más importantes de pseudoartrosis. Si pensamos en la consolidación como un proceso en el que es necesario tanto el aporte biológico como la estabilidad mecánica, objetivamos como en el caso de la pseudoartrosis hipertrófica (A) presenta un correcto aporte biológico pero una insuficiente estabilidad mecánica y por eso fracasa la consolidación. En el caso de la pseudoartrosis atrófica (B) la estabilidad mecánica no es el problema sino que la insuficiencia del componente biológico hace que la consolidación no se produzca. Fuente: Megas P. Classification of non-union. Injury. 2005;36 Suppl 4:S30-7.

1.5.2.2. Pseudoartrosis oligotrófica.

Éste es un tipo de pseudoartrosis que radiográficamente parece ser atrófica y sin embargo su potencial biológico está conservado (46, 87). Normalmente tiene lugar en fracturas que han sufrido un gran desplazamiento o distracción en las que la síntesis realizada no es la más adecuada en cuanto a la reducción, o cuando existen defectos óseos en el foco de fractura. Radiográficamente parece que al principio no hay cambios, a las 8-12 semanas los bordes comienzan a reabsorberse y comienza a decalcificarse; sin embargo estos bordes son biológicamente activos (46, 88).

1.5.2.3. Pseudoartrosis atrófica.

En este tipo de pseudoartrosis, la capacidad biológica de consolidación está comprometida. El aporte vascular es escaso o nulo (8, 88). Normalmente esto sucede en casos de gran conminución, fracturas abiertas y tras abordajes quirúrgicos cruentos que desperiostizan mucho el hueso y maltratan las partes blandas circundantes (46, 87).

En las radiografías no se verá callo, los bordes se mostrarán con un patrón de tipo escleroso y la línea de fractura estará claramente definida, como si no hubiese tenido lugar cambio alguno (8) (Figura 6). Para que este tipo de pseudoartrosis pueda consolidar necesitará el aporte del estímulo biológico que le falta, además de la síntesis estable; sin él no consolidará.

Con el paso de los años, ha llegado a cuestionarse la validez de este sistema de clasificación; es demasiado simple para la complejidad del problema del que se trata y el fracaso del 20% de las cirugías de rescate de las pseudoartrosis avala esta teoría (89). Por eso, han aparecido nuevos sistemas de clasificación, como el de Calori et al (89), en el que se relaciona el riesgo de pseudoartrosis con las características de base que presenta una fractura. Teóricamente sería lo ideal, pero la gran diversidad en cuanto a las características de cada fractura hacen muy difícil su validación.

1.5.3. Diagnóstico de pseudoartrosis.

Como ya hemos comentado en diversos apartados a lo largo de este trabajo, el punto de partida debe ser la realización de la historia clínica (84). Debemos anticiparnos a las complicaciones que pueda tener un paciente que sufre una fractura sabiendo, no solamente el mecanismo de producción o las características de la fractura (si es abierta, conminuta, etc), sino también todos los aspectos médicos que puedan afectar a la consolidación, es decir, su estado nutricional, enfermedades de base, factores de riesgo, etc. Dicho de otro modo, el diagnóstico será personalizado. Además debemos reconocer la

clínica y detectar en las pruebas de imagen estos fallos de consolidación (8, 84).

Lo primero que debemos descartar en una pseudoartrosis, sobre todo si la fractura inicial era abierta, es que no estemos ante una pseudoartrosis infectada (90). El diagnóstico de sospecha, una vez más nos lo dará la clínica, pero pruebas de laboratorio como la velocidad de sedimentación (VSG) y la proteína C-reactiva (PCR) nos descartarán que no estemos ante una infección oculta (9, 91).

Aunque la resonancia magnética puede ser una herramienta valiosa a la hora de detectar cambios de densidad en el hueso, el hecho de que muchos de estos pacientes porten material de osteosíntesis hace más difícil su valoración con esta técnica de imagen. No obstante, puede tener su utilidad a la hora de determinar la extensión de la infección por los cambios hallados (43, 91).

La toma de muestras para estudio microbiológico es un procedimiento de rutina en toda cirugía de pseudoartrosis; descarta la presencia de infección o la confirma de cara a un tratamiento en dos tiempos para la pseudoartrosis (84, 90). Una vez descartada la infección como causa del problema, debemos valorar qué ha sido el desencadenante de la pseudoartrosis y cómo podemos solucionarlo.

1.5.4. Opciones de tratamiento de una pseudoartrosis aséptica.

Aunque no se conocen con exactitud todos los procesos que se llevan a cabo durante la consolidación, sí que tenemos claro que es un proceso en el que cualquier mínima alteración puede conducirla al fracaso (23, 92). Conociendo la causa que originó en primer lugar la pseudoartrosis podremos llegar a su correcto diagnóstico y posterior tratamiento. Si no tenemos claro el problema de base, la solución puede no llegar nunca.

En este sentido, es importante entender el denominado *Diamond concept* (23), clave para establecer las diferentes líneas de investigación y modalidades de tratamiento. Este concepto, que explicamos brevemente a continuación, determina los cuatro pilares básicos que son necesarios para que la consolidación se lleve a cabo con éxito: las señales moleculares, las células osteoprogenitoras, la matriz extracelular y la estabilidad mecánica (Figura 7) (23).

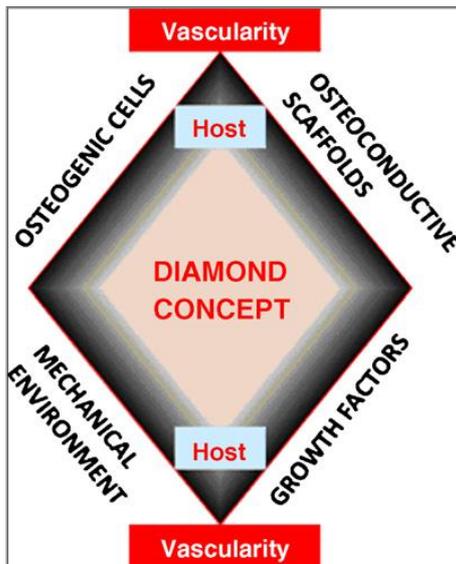


Figura 7: Esquema del *Diamond concept* como modelo de las interacciones que ocurren durante el proceso normal de consolidación de una fractura. Fuente: Giannoudis PV, Kontakis G. Treatment of long bone aseptic non-unions: monotherapy or polytherapy? Injury. 2009;40(10):1021-2.

Señales moleculares.

Básicamente podemos agrupar este tipo de señales en 3 categorías (27, 93):

- Citoquinas proinflamatorias.
- Superfamilia de las TGF- β y otros factores de crecimiento.
- Metaloproteasas y factores angiogénicos.

Todas estas moléculas se pueden encontrar en el hematoma de la fractura en diferentes cantidades según corresponda al momento en que analicemos su composición. Algunas como las BMP son conocidas por sus propiedades osteoinductivas (27, 36, 94).

Células osteoprogenitoras.

El segundo elemento de gran importancia en este proceso es la población celular. Las células mesenquimales pluripotenciales se reclutan, no sólo en las zonas cercanas a la fractura, sino también del torrente sanguíneo. La respuesta inmediata de la médula ósea ante una fractura es, como ya habíamos reflejado en apartados anteriores, la reagrupación en zonas de mayor y menor celularidad. Es en estas zonas de gran celularidad donde las células mesenquimales pluripotenciales sufren una transformación fenotípica a la línea osteoblástica (38, 94).

Matriz extracelular.

La importancia de este elemento radica en que otorga un medio adecuado para que todos los procesos celulares tengan lugar (23).

Estabilidad mecánica.

Es un factor crucial; sin la estabilidad del foco de fractura los puentes óseos interfragmentarios no se forman y se produce el fracaso de la consolidación. Así mismo, es esencial para que la maduración del callo tenga lugar. Esta es la base por la que se rige todo traumatólogo; siempre persigue la máxima de realizar un sistema lo suficientemente estable mecánicamente para conseguir que la fractura consolide (23, 28).

Además de estos cuatro componentes mencionados, la presencia de una vascularización adecuada y las condiciones óptimas del huésped, son indispensables para que la consolidación tenga lugar de manera correcta. De este modo se formará el marco ideal o *Biological chamber* (Figura 8) (92). El foco de fractura es un sistema permeable, es decir tienen lugar intercambios entre esa zona y el exterior. Lo ideal sería que ese ambiente se mantuviera siempre en condiciones óptimas para la consolidación, es decir se limitase la salida de todas las necesidades para la consolidación (injerto óseo) pero no se bloquease la entrada de sustancias necesarias (oxígeno, pH adecuado, etc). En este sentido parece que el tratamiento con la técnica de inducción de membrana puede ser una de las claves del éxito (95, 96).

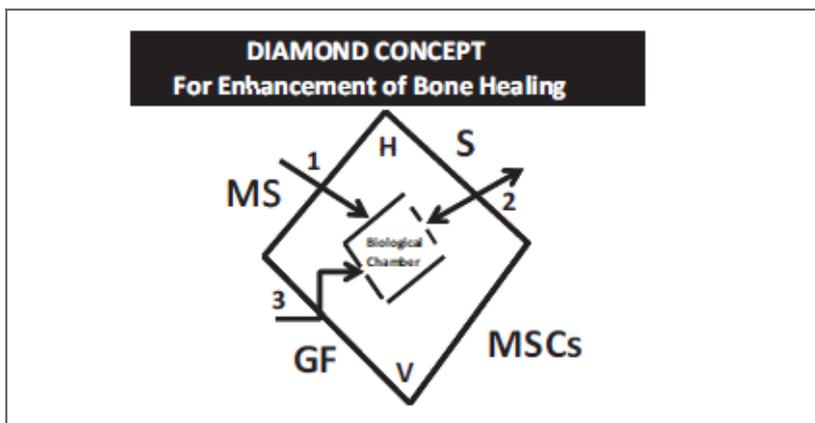


Figura 8: Diagrama *Diamond concept and Biological Chamber*. V= Vascularización, H= Factores del huésped, MS= estabilidad mecánica, MSC= Células mesenquimales, S= Matriz extracelular, GF= Factores de crecimiento, 1. Cámara cerrada, 2. Cámara abierta, 3. Cámara parcialmente cerrada Fuente: Calori GM, Giannoudis PV. Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber. Injury. 2011;42(11):1191-3.

El objetivo de un traumatólogo a la hora de tratar una pseudoartrosis irá encaminado a restablecer este ambiente; por tanto es indispensable valorar el marco biológico en el cual nos encontramos y estudiar si además de su estabilización mecánica. El aporte de diferentes tratamientos ya establecidos como efectivos (BMPs por ejemplo), pueden ayudarnos a conseguir la consolidación.

Parece claro que en los casos de pseudoartrosis hipertróficas el problema esencial es la falta de estabilidad mecánica; si solucionamos ese problema con una estabilización correcta el problema debería resolverse. En el caso de las pseudoartrosis oligotróficas la solución no parece tan clara, habrá que examinar si la reducción inicial fue correcta y si el componente biológico de esa pseudoartrosis no está alterado. Por último se presenta el caso de las pseudoartrosis atróficas; en ellas la restauración de la estabilidad mecánica es importante (como en las anteriores) pero su problema esencial radica en la falta de capacidad biológica para la consolidación (59, 94). Dicho de otro modo, por mucho que estabilicemos la fractura por uno u otro medio no conseguiremos que consolide a no ser que le demos esa capacidad biológica que le falta (decorticación, aporte vascular, aporte de injerto óseo, etc).

1.5.4.1. Tratamientos que mejoran la estabilidad mecánica.

En este tipo de tratamientos, los más reconocidos son los quirúrgicos. Es importante ser meticuloso a la hora de diseñar la estrategia de actuación; tener en cuenta la deformidad que presenta el hueso a tratar, el estado de salud del paciente y las vías de abordaje previas para que las partes blandas resulten lo menos dañadas posibles por los gestos quirúrgicos futuros (91).

Tratamiento Quirúrgico.

Básicamente se describen 3 técnicas: el enclavado, la fijación interna con placa y el fijador externo. Independientemente de utilizar uno u otro método, se podrán añadir tratamientos coadyuvantes que describiremos más adelante:

- Enclavado intramedular tras retirada del enclavado previo: La principal ventaja de este método radica en la poca agresión que sufren las partes blandas durante la vía de abordaje; no obstante retirar un clavo intramedular, volver a fresar y reenclavar la fractura con un clavo más ajustado, que aumente el contacto endostal, es un procedimiento agresivo; no apto para todo tipo de pacientes (90, 91). Además se debe tener en cuenta que si la pseudoartrosis tiene lugar en la zona metafisodiafisaria de huesos largos este método no será útil y por tanto no sólo no solucionamos el problema sino que le producimos más agresión al organismo (91).

- Fijación interna con placa tras retirada del enclavado previo: A parte de la agresión añadida que supone la retirada del clavo, debemos realizar una vía de abordaje más o menos agresiva en función de la localización, para realizar la osteosíntesis. No obstante nos permite acceder al foco de pseudoartrosis y tomar muestras, retirar el tejido fibroso y cruentar el lecho. Además aportamos una estabilidad absoluta a la fractura. En casos de pseudoartrosis hipertróficas sería el tratamiento de elección; permite realizar una síntesis a compresión, con estabilidad absoluta, que es el problema básico de este tipo de pseudoartrosis (91).
- Fijador externo: Es un método muy útil en los casos de pseudoartrosis infectadas en las que son necesarias las resecciones amplias (91, 97).

En los últimos años, va adquiriendo un papel importante la utilización de la técnica de Masquelet de inducción de membrana (95). Esta técnica consta de dos partes; en la primera se realiza el desbridamiento del foco y se coloca un espaciador de cemento con antibiótico, todo ello es estabilizado con el fijador externo. Durante esta fase el espaciador no sólo sirve de molde para evitar que el tejido fibroso ocupe el espacio del defecto óseo a rellenar, sino que induce la formación de una membrana vascularizada. Después de unas 6-8 semanas se procede a retirar el espaciador y comprobar que sea formado la membrana; se rellena el defecto óseo con injerto y se estabiliza mecánicamente la pseudoartrosis con uno de los medios explicados con anterioridad en este apartado (94, 97).

La membrana dará al injerto el aporte vascular extra que necesita; además se ha comprobado que libera gran cantidad de sustancias como VEGF, TGF- β 1 o BMP2 que, como ya se describió con anterioridad, son capitales que la consolidación se lleve a cabo con éxito (96). Esta membrana hace que el entorno del injerto esté controlado, es decir sigue el concepto de "biological chamber" y la membrana semipermeable; deja pasar vascularización y sustancias favorecedoras de la consolidación pero actúa de barrera evitando que esas moléculas escapen o que el injerto se reabsorba (95, 97). Esta técnica no se puede describir únicamente como aporte de estabilidad mecánica pues, independientemente de ésta, el aporte biológico al sistema es innegable. En los últimos años varios estudios se han centrado no sólo en mejorar la técnica y delimitar sus indicaciones, sino también en valorar el uso combinado de esta técnica junto al aporte de células madre (98) o diversos factores como el BMP2 con resultados prometedores (97).

- Fijación con placa con enclavado previo in situ: Esta técnica supone un paso intermedio. En estos casos el paciente suele tener un estado de salud en el límite de lo necesario para plantearse grandes gestos quirúrgicos. Así mismo

presenta como problema base una pseudoartrosis en la que su estabilidad mecánica ha fracasado y necesita una solución. Debido a esto, diversos autores(99, 100) abogan por realizar una síntesis a compresión con placa manteniendo el clavo in situ. Esto nos ofrece varias ventajas: Eliminamos la agresión de la retirada del clavo, conseguimos una síntesis de estabilidad absoluta con la placa y además podemos permitir la carga al paciente(101). Evidentemente está presente el hecho de que debemos abrir el foco de fractura pero es una agresión mínima en comparación a la cirugía que se le plantearía. Además nos permite refrescar el foco y tomar muestras (91).

Tratamiento conservador.

El tratamiento ortopédico puede tener su utilidad en casos en los que con una inmovilización externa la estabilidad mecánica sea suficiente aunque esto es extremadamente infrecuente. Podría barajarse su utilización en casos en los que la consolidación se ve enlentecida, como en los pacientes osteoporóticos, que tienen buen potencial biológico de curación o como ayuda de algún pequeño gesto quirúrgico (osteotomía del peroné en pseudoartrosis de tibia) en pacientes muy deteriorados (91).

1.5.4.2. Tratamientos que mejoran el componente biológico.

En la actualidad se están estudiando muchos medios para conseguir dar a las pseudoartrosis atróficas ese aporte biológico “extra” que precisa para consolidar. Se han desarrollado varias técnicas que actúan de forma directa sobre el foco, pero de manera no invasiva, como los ultrasonidos o la estimulación eléctrica, que han demostrado tener eficacia aunque lo más utilizado y conocido por todos los cirujanos es el aporte directo de ese componente biológico, bien sea a modo de injerto óseo, células madre o factores de crecimiento.

Métodos de actuación directa.

1. Métodos no invasivos:

- Ondas de choque extracorpóreas: La efectividad de esta técnica para incrementar la masa ósea y la fuerza del callo se ha descrito en varios estudios (91). Además se describe su capacidad para estimular la angiogénesis y la diferenciación de las células mesenquimales indiferenciadas (102). Todo esto favorecería la consolidación de las pseudoartrosis atróficas. No obstante, aunque se han publicado casos en los que la técnica presenta resultados prometedores (102), la evidencia científica al respecto es limitada.

- **Electroestimulación:** Basándose en la aplicación de fuerzas de compresión y distracción sobre el foco de fractura, se generan potenciales eléctricos capaces de estimular la consolidación. Aunque hay estudios prospectivos que apuntan que esta técnica es efectiva (103), los metaanálisis realizados sobre el tema concluyen que la evidencia científica sobre la capacidad de consolidación de esta técnica no está demostrada ya que los estudios que la avalan presentan varios factores de confusión (91, 104).
- **Ultrasonidos de baja frecuencia:** Se basa en la aplicación de energía de baja frecuencia al foco de fractura lo que estimularía a las células (91). Parece que es tanto más efectivo cuanto antes se aplica (105), es decir, que tendría más utilidad en retardos de consolidación. En cualquier caso, los estudios actuales sobre el tema analizan muestras muy pequeñas de pacientes y por tanto sus resultados son difícilmente valorables (91).

2. Métodos invasivos.

- **Injerto óseo autólogo:** Es uno de los tratamientos más antiguos y reconocidos para esta patología. Para garantizar su eficacia, casi tan importante como el propio aporte del injerto es el lecho donde se colocará. Debe prepararse apropiadamente en la cirugía, es decir, se debe cruentar, eliminar toda la fibrosis dejando un lecho sangrante sobre el que colocar el injerto (87).

El tipo de injerto óseo más conocido y utilizado hasta la fecha por su reconocida eficacia es el autólogo. Gracias a su contenido en células mesenquimales y células precursoras de osteoblastos, tiene gran poder osteoconductor y osteogénico; además la cantidad de BMP que presenta hace que tenga osteoinductora (39). Sin embargo, el injerto autólogo es muy variable; es decir, su eficacia depende bastante de la celularidad y de la cantidad de factores de crecimiento que tenga, así como de determinados factores de riesgo (fumador, alcoholismo, fármacos), lo que hace que no sea un método infalible (7, 106).

La zona donante más frecuente para la obtención de injerto óseo autólogo es la cresta iliaca. Aunque presenta grandes ventajas como zona donante (su extracción es un procedimiento rápido, permite sacar injertos tricorticales sin alterar la estabilidad de la estructura donante), presenta complicaciones nada desdeñables como la infección, dolor de tipo crónico de la zona donante, molestias en la marcha durante 3 ó 4 semanas, parestesias del nervio femoro-cutáneo o incluso hernias abdominales (39, 107, 108). Todas estas complicaciones, además del hecho de que el contenido en BMPs de este tipo de injerto sea escaso, limitando la capacidad osteoinductora, hacen que se

planteen nuevas zonas donantes, como el fresado-aspirado de médula ósea de huesos largos que describiremos a continuación (107).

- Aspirado de médula ósea de huesos largos (RIA): La utilización del aspirado endomedular de los huesos largos es una técnica relativamente nueva pero que en los estudios iniciales ha resultado ser prometedora (107, 109). Permite obtener grandes cantidades de injerto y por los estudios realizados en 2006 por Schmidmaier et al (110) presenta en su composición niveles más elevados de factor de crecimiento fibroblástico α (FGF- α), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) y BMP2, que el injerto de cresta iliaca, lo que le otorga mayor poder osteoinductor (108, 110). Además de todo esto provoca menos molestias al paciente en cuanto al tiempo de convalecencia para la deambulaci3n. Sin embargo, no est3 exento de complicaciones; es una intervenci3n mucho m3s laboriosa que la extracci3n de cresta iliaca, lo que alarga los tiempos de intervenci3n y existe adem3s el riesgo de fractura intraoperatoria. Otro inconveniente que presenta es la imposibilidad de obtener injerto estructural (39, 107, 110).
- Gel de concentrado plaquetario La concentraci3n de factores de crecimiento en este producto presenta una gran variabilidad (7, 39, 111). Adem3s al contrario de lo que se pensaba, este producto no es un osteoinductor, sino que puede actuar inhibiendo las BMPs con lo cual puede incluso hacer el efecto contrario al deseado (112).
- Factor de crecimiento endotelial (VEGF): Es bien conocida su contribuci3n a la consolidaci3n en condiciones normales; as3 mismo, tambi3n sabemos que para que el injerto 3seo tenga 3xito es necesario un buen ambiente en el que el aporte sangu3neo sea correcto (33). Aunque el VEGF no parece implicado directamente en la diferenciaci3n de los osteoblastos, puede ser de ayuda a la hora de crear un microambiente adecuado para que esta diferenciaci3n tenga lugar, tal como muestran los estudios realizados por Eckardt et al (113).
- Matriz 3sea desmineralizada: Los estudios realizados hasta la fecha no revelan resultados esperanzadores sobre este producto. De hecho, aunque posee cierto poder osteoinductor (por la cantidad de BMP2 que tiene) (114), 3ste se ve muy disminuido tras su procesamiento (39, 111). No obstante, en un lecho propicio s3 que puede ser de cierta utilidad, bien utiliz3ndolo solo o bien en combinaci3n con otros productos (39).
- Prote3nas morfogen3ticas 3seas (BMPs): Desde que se descubri3 el alto poder osteoinductivo de estas prote3nas, se han dedicado muchos estudios a

investigar qué función desempeñan y qué moléculas pueden ser las más útiles en cuanto a la aplicación clínica (39, 111).

Las acciones de las BMPs son muy numerosas, desde la quimiotaxis de células formadoras de hueso hasta la proliferación de las células mesenquimales indiferenciadas. Son capaces de unirse a receptores específicos de las células indiferenciadas para dar lugar a líneas celulares formadoras de osteoblastos. Se conocen más de 14 BMPs que puedan resultar de utilidad en la práctica clínica. Las BMP2, 4 y 9 tienen gran importancia a la hora de estimular a las células mesenquimales indiferenciadas hacia la línea osteoblástica. Además la BMP 2 junto con la 7 colaboran activamente para favorecer el paso de preosteoblasto a osteoblasto(36).

Actualmente hay dos formas comercializadas: RhBMP7 y RhBMP2. Aunque han demostrado en diversos estudios su efectividad en el tratamiento de pseudoartrosis en tibia (115, 116), presentan varios problemas a tener en cuenta: su acción es local, por tanto no se puede considerar como tratamiento en pacientes no aptos para la cirugía; es muy lábil, por eso durante el procesamiento de la matriz ósea desmineralizada baja mucho su concentración y además cuenta con el problema administrativo añadido de ser un fármaco cuya utilización es personalizada, es decir el cirujano debe recibir la aprobación de su centro para la utilización del producto con cada paciente, por su alto coste (39), .

A pesar de los problemas que presentan para su administración, los artículos publicados hasta la fecha señalan su beneficio en cuanto a porcentaje y tiempo de consolidación (115, 117).

En un estudio multicéntrico realizado en 2009, Kanakaris et al (118) recogen prospectivamente 30 pacientes diagnosticados de pseudoartrosis atrófica aséptica de diáfisis femoral y se tratan con estabilización mecánica y RhBMP7, obteniendo una tasa de consolidación del 87% a los 6 meses. El resto de pacientes que no consolidaron se sometieron nuevamente a una cirugía en la que además de la RhBMP se utilizó injerto óseo autólogo, consolidando finalmente. Esta técnica combinada abre otra puerta de actuación, que es la de utilizar politerapia; es decir, asociar injerto autólogo, la BMP y la estabilidad mecánica (7, 117-119). Giannoudis presentó en 2009 una serie de 45 casos de pseudoartrosis atrófica diafisarias de fémur, en las que realizó una síntesis estabilizadora y utilizó una combinación de injerto autólogo y RhBMP7, con lo que consiguió la consolidación del 100% de los casos en un tiempo medio de 7 meses (117). El que con la combinación de terapias se obtengan estos resultados es lógico a la vista de los principios “diamond concept” y “biologicalchamber” comentados previamente (23, 94).

- Células madre: Desde el trabajo in vitro del equipo de Friedenstein (35), en la que ponía de manifiesto la importancia de las células mesenquimales indiferenciadas a la hora de la creación de nuevo tejido óseo en el contexto de una fractura, se han venido realizando diversos estudios para valorar la aplicabilidad de su utilización en problemas de consolidación. Algunas de estas técnicas, como el uso percutáneo, presentan resultados muy variables (106). Esto puede deberse a varios motivos: en primer lugar, la implantación de estas células se hace en un lecho fibroso, con mal aporte vascular, lo que limitaría su efectividad. En segundo lugar, es una técnica que depende de la extracción de las células de la cresta iliaca del paciente, procedimiento cuyo rendimiento varía enormemente según los factores de riesgo que presente, como ya se ha comentado con anterioridad (5, 23, 106). Además recientes estudios demuestran que el aislamiento de las células troncales es un proceso costoso y que puede ser menos efectivo que procesado más simple en el que se incluyen todas las células mononucleares de la médula ósea (BM-MNCs) (120).

Una posible solución a estos problemas podría venir de su utilización en combinación con el injerto óseo, como politerapia, en una cirugía que prepare el lecho de la pseudoartrosis. Es decir seguir los principios del “diamond concept” (23). La serie de casos presentada por el equipo del Dr. Fernández-Bances, aunque muy limitada, presenta resultados alentadores con esta línea de actuación (98).

Métodos de actuación indirecta.

Cuando diagnosticamos a un paciente de pseudoartrosis aséptica, habitualmente necesita algún tipo de actuación directa, ya sea la estabilización mecánica o el aporte de ese componente biológico que le faltaba para que la consolidación tuviera lugar. Pero existen pacientes en los que su estado de salud no permite ninguna actuación de este tipo y son estos pacientes, los que más se podrían beneficiar de un tratamiento médico que fuera capaz de conseguir que la consolidación tuviera lugar con normalidad.

En este aspecto es importante destacar que los fármacos utilizados para la osteoporosis pueden ser la clave (3). Éstos utilizan las vías del remodelado óseo y por ello no sólo servirían para el tratamiento de la osteoporosis, sino también para favorecer la consolidación de las fracturas. Actualmente se están estudiando tres clases de fármacos con este propósito: Los agentes antirresortivos (bifosfonatos e inhibidores del RANK-L), los análogos de la hormona paratiroidea (PTH), los moduladores de la vía WNT y el ranelato de estroncio (objeto de este estudio).

1. Vías comunes al tratamiento de la osteoporosis y la consolidación.

- Vía OPG/ RANK/ RANKL.

El sistema OPG/ RANK/ RANKL es trascendental en el proceso de resorción ósea; supone el principal sistema regulador de la formación y la actividad osteoclástica (121). Básicamente, funciona de la siguiente forma: el RANKL secretado, bien en forma soluble bien unido a membrana, es producido por los precursores de la línea osteoblástica y por los osteocitos. Esta molécula se unirá al RANK, presente en la membrana del precursor osteoclástico. EL complejo RANK/RANKL activará a TRAF6, el cual a su vez activará a NF- κ B, que se translocará al núcleo y estimulará la expresión de c-Fos. Éste a su vez interactuará con NFATc1 para provocar la expresión de los genes necesarios para la maduración de los precursores osteoclásticos y su posterior activación (122).

Así mismo también existe un competidor de esta molécula que es la osteoprotegerina (OPG) (Figura 9). Ésta es segregada por los osteoblastos y actuará de “señuelo” bloqueando la unión de RANKL a su ligando natural (RANK) obteniéndose este modo el bloqueo de la osteoclastogénesis (121, 123). EL papel principal que desempeña la OPG dentro de este sistema será por tanto el de limitar las acciones desencadenadas por el RANKL (121, 122).

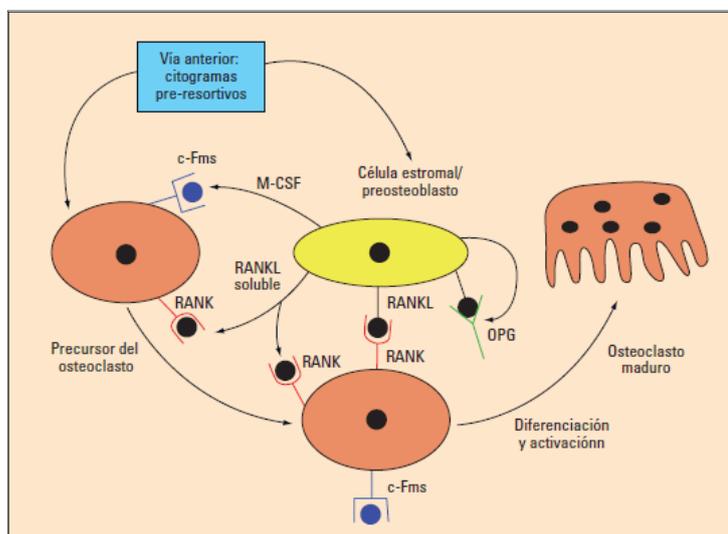


Figura 9: Sistema OPG/ RANK/ RANKL y el desarrollo de la osteoclastogénesis. Fuente: Solán XN. Tratamiento de la osteoporosis con fármacos osteoformadores y otros. Mecanismo de acción de la PTH 1-34, PTH intacta, denosumab, ranelato de estroncio, calcitonina y nuevos fármacos en perspectiva. Medicine. 2010;10(60):4144-8.

La expresión de la OPG está regulada a la inversa por los mismos factores que regulan al RANKL; dicho de otro modo, cuando la expresión del RANKL se estimula disminuye la expresión de OPG y lo mismo sucede a la inversa (121). Esto hace que el cociente OPG/RANKL sea uno de los principales determinantes de masa ósea: cuanto menor es ese cociente, mayor es la resorción ósea y por tanto más acusada la tendencia a disminuir de ésta (121, 122).

Son numerosos los estudios que demuestran la relación de la vía OPG/RANK/RANKL con patologías músculo- esqueléticas caracterizadas por la pérdida de masa ósea (121, 124). No obstante, la relación de este eje con la consolidación de las fracturas no está claramente definida. En 2001 Kon et al (125) estudiaron su implicación en modelos experimentales de fracturas de tibia en ratas. Observaron que durante todo el proceso reparativo la OPG permanece en niveles muy superiores a los encontrados durante la fase previa a la fractura. Este aumento forma dos picos de máxima expresión: a las 24 horas de la fractura y en el día 7, coincidiendo con la formación cartilaginosa (125). En contraposición el RANKL, que casi era indetectable en la fase previa a la fractura, aparecía de manera reseñable durante la consolidación (125, 126). Los niveles de esta última molécula ascienden en los días 3 y 14, cuando los de OPG descienden. Por tanto, aunque podemos afirmar que el eje OPG/RANK/RANKL está claramente involucrado en la reabsorción endocondral y en el remodelado óseo, hasta el momento ha sido imposible determinar su nivel de implicación (125, 127).

Sobre la base de los datos experimentales, surgen estudios clínicos que analizan la concentración de estas moléculas, tanto a nivel sistémico como local, con el objetivo de confirmar tales hallazgos. Parece que el tratamiento con OPG o con inhibidores del RANKL pueden ser líneas de actuación interesantes en el tratamiento de fracturas y pseudoartrosis (126, 128).

- Vía Wnt- β - catenina.

La diferenciación de los precursores de los osteoblastos se ve favorecida por la activación de la vía Wnt. El ligando Wnt se une a dos correceptores, las proteínas “frizzled” (fzl) y las “low density lipoprotein receptor related protein” 5 y 6 (LRP5 y 6) (Figura 10)(123, 129).

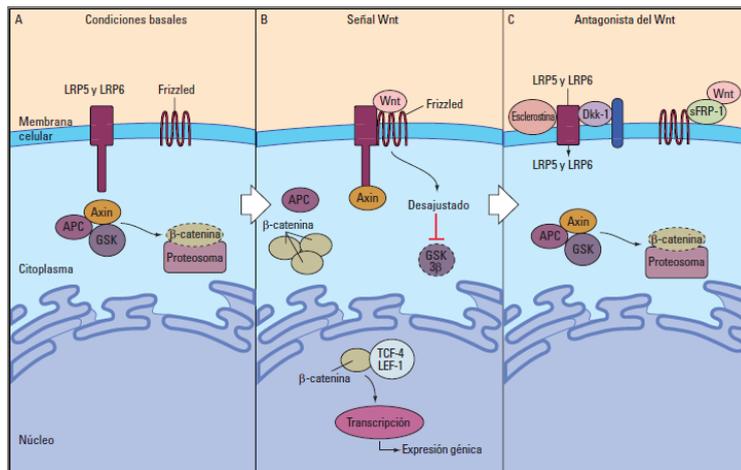


Figura 10: Formación ósea vía de la Wnt. Fuente: Solán XN. Tratamiento de la osteoporosis con fármacos osteoformadores y otros. Mecanismo de acción de la PTH 1-34, PTH intacta, denosumab, ranelato de estroncio, calcitonina y nuevos fármacos en perspectiva. *Medicine*. 2010;10(60):4144-8.

Entre los antagonistas de esta vía destacan una proteína soluble llamada Dickkopf (Dkk1) y otra codificada por el gen SOST, llamada esclerostina, cuya acción evita la activación de los correceptores por lo ligandos Wnt (121, 130).

Al unirse los ligandos Wnt sus correceptores, disminuye la fosforilación de la β -catenina, aumentan sus niveles citoplasmáticos y se trasloca al núcleo, donde es capaz de regular la expresión de ciertos genes, con la colaboración de otros factores de transcripción (Tcf/Lef) y coactivadores (131, 132).

Diversos estudios en animales de experimentación han demostrado la elevación de los niveles de todos los componentes de la vía Wnt- β -catenina en el lugar de la fractura así como un incremento mantenido del ARNm de estas proteínas durante los primeros 21 días postfractura. Además determinan que esta vía se activa en múltiples células implicadas en la consolidación (130, 132).

Por lo anteriormente expuesto, parece bastante claro que niveles elevados de β -catenina se asocian a un aumento de la formación ósea. Este descubrimiento ha conducido al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas, siendo especialmente interesante la inhibición de la esclerostina (123). Sabiendo que un déficit de esta última favorece la consolidación de las fracturas, produce el aumento de masa ósea y que el gen que la codifica se expresa esencialmente en el esqueleto, no es de extrañar que sea una de las líneas de actuación más interesante hasta el momento (132-134).

Aunque las vías Wnt- β -catenina y OPG/RANK/RANKL parecen sistemas independientes, lo cierto es que están interrelacionadas. De hecho la

capacidad de los osteoblastos para expresar OPG viene regulada por la vía Wnt- β - catenina (121).

2. Fármacos: Principios generales de actuación.

- Agentes antirresortivos (Bifosfonatos, Inhibidores del RANKL).

Bifosfonatos: Suponen uno de los tratamientos más utilizados para la osteoporosis y la prevención de fracturas. Su acción antirreabsortiva se basa en la unión del fármaco a los cristales de hidroxapatita del hueso. Cuando los osteoclastos reabsorben el tejido óseo incorporan la molécula y esto induce su apoptosis (135, 136). Además se ha demostrado que su administración a dosis bajas favorece la osteoblastogénesis e inhibe la osteoclastogénesis (136). Ello conduce a un aumento de la densidad mineral ósea (DMO) (3, 135, 137).

En cuanto a la consolidación de las fracturas, estos fármacos son un arma de doble filo. En diversos estudios experimentales realizados sobre modelos de consolidación endocondral no parecen afectar a las fases iniciales de la formación del callo; no obstante sí que se encuentran diferencias en cuanto al remodelado óseo (135). El callo de fractura resultante será voluminoso y con alto contenido mineral; sin embargo, el tiempo de maduración y remodelado del callo se verá muy alargado. Esto explicaría porqué en animales tratados con bifosfonatos su callo es histológica y mecánicamente menos efectivo que el que presentan los animales control (138).

Todos estos datos nos presentan un dilema. Por un lado, la terapia con bifosfonatos se ha mostrado efectiva como tratamiento de la osteoporosis. Por el contrario, sabemos que en caso de producirse una fractura debemos retirarlo si queremos conseguir una correcta consolidación, pues se deposita preferentemente en la zona de la fractura impidiendo el remodelado (137). En las actuales recomendaciones referentes al tratamiento de fracturas de cadera, se destaca la importancia de retirar la terapia al menos durante las 6 semanas postfractura (139). Todo esto parece evidenciar que la terapia con bifosfonatos no está indicada para el tratamiento de las fracturas y mucho menos para el de las pseudoartrosis (Figura 10).

Inhibidores del RANK-L (Denosumab): El denosumab es un anticuerpo monoclonal humano frente al RANK-L (123, 135, 140). La reducción del riesgo de fracturas vertebrales con este fármaco se sitúa en un 68% y la de fracturas de cadera en un 40% (123, 140). La ventaja que presenta frente a los bifosfonatos es que no se acumula en el tejido óseo (123, 135). Su indicación principal es la osteoporosis postmenopáusica, aunque también se utiliza en la prevención de pérdida de masa ósea producida por los inhibidores de la

aromatasa en el cáncer de mama (123) y en algunos otros tipos de osteoporosis.

Los estudios, que valoran la consolidación endocondral en modelos de experimentación tratados con denosumab, no evidencian diferencias respecto al tratamiento con bifosfonatos en cuanto a consolidación se refiere. Al igual que con los bifosfonatos, se forma un callo voluminoso y con una DMO elevada, pero con retardo del remodelado óseo (135, 137, 141). Las diferencias más notables se encuentran en el estudio biomecánico, donde se constata un callo más resistente a las fuerzas de torsión en los animales tratados con denosumab (141).

Todo lo anteriormente expuesto hace que el denosumab sea una alternativa real a los bifosfonatos, en cuanto a osteoporosis se refiere pero no supone una solución al tema a tratar en este trabajo.

- Análogos de hormona paratiroidea (PTH).

Las paratiroides segregan la hormona paratiroidea (PTH) tras el estímulo producido por la hipocalcemia. Ante la disminución del calcio iónico se produce su liberación con los consiguientes aumentos de producción de $1,25(\text{OH})_2$ Vitamina D_3 , de la reabsorción de calcio a nivel del túbulo renal e intestino y de la resorción ósea (123). Por tanto podemos decir que la principal función de esta hormona es la homeostasis del calcio.

Además la PTH regula la expresión génica de los osteoblastos, activa la señal de supervivencia y retrasa la apoptosis; de esta forma se incrementa el número total de osteoblastos. Este efecto se produce gracias a la activación del factor de transcripción Runx2 y agentes antiapoptóticos ligados a los genes Bcl-2³ (123).

La administración exógena de PTH puede ser muy beneficiosa. Está ampliamente demostrado que, en caso de administrarse en forma de pulsos intermitentes, favorece la diferenciación de células mesenquimales indiferenciadas hacia la línea osteoblástica e incrementa la proliferación y diferenciación de los osteoblastos a través de la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMP_c) (123, 137). Sin embargo, los niveles crónicamente elevados, favorecen la actividad osteoclástica y conducen a un aumento de la resorción ósea (123, 142). Esta acción antagónica según el modo de administración se conoce como efecto paradójico o acción dual de la PTH (135, 137).

Al ser un fármaco osteoformador, es de esperar que sea útil como tratamiento de fracturas y pseudoartrosis; los estudios experimentales sobre fracturas diafisarias en ratas avalan esta teoría (137, 143). En ellos se ha demostrado que la PTH favorece la formación del callo de fractura mediante la estimulación y proliferación temprana de células osteoprogenitoras; también se detectaron importantes aumentos de producción de las proteínas de matriz ósea así como de la actividad osteoclastogénica durante la fase de remodelado del callo (144). Posteriormente se han publicado nuevos datos que demuestran la efectividad de la PTH en los estadios tempranos de la consolidación endocondral mediante un aumento de la expresión de los genes de la vía Wnt, indicando que su actividad tiene relación con esta vía (137, 143, 144).

Con todo lo que se expone anteriormente, parecería que la PTH podría suponer una solución a los problemas de consolidación. Sin embargo, varios estudios clínicos aleatorizados randomizados no han mostrado diferencias estadísticamente significativas entre la administración a altas dosis de PTH y el placebo (145, 146).

- Moduladores de la vía Wnt- β -catenina.

Como ya se ha mencionado previamente, con el descubrimiento de la implicación de la vía Wnt- β -catenina en la estimulación de la formación ósea, se ha abierto un nuevo campo de investigación y desarrollo de nuevos fármacos (123).

Sabiendo que determinados factores, como Dkk1 y la esclerostina, se unen al complejo LRP5/6 e inhiben la actividad de la vía, sus anticuerpos serán potentes inductores de formación ósea (135, 137).

En los modelos de experimentación de fracturas de fémur tratadas con el anticuerpo anti-Dkk1, se ha observado el aumento del callo de fractura, de su resistencia y de la DMO. Así mismo se encontró el aumento de DMO en la extremidad no fracturada (130).

En el caso del anticuerpo de la esclerostina, se ha visto que su capacidad es similar en cuanto a la formación y mineralización ósea. Además de demostrarse en diversos estudios un aumento de grosor, tanto de las trabéculas como de las corticales (135, 137).

Ambos anticuerpos han demostrado su potencial utilidad a la hora de prevenir la desmineralización en miembros inmovilizados, la consolidación fracturaria y el tratamiento de la osteoporosis en modelos experimentales.

Lamentablemente solo existen estudios clínicos que avalan el tratamiento de la osteoporosis con este tipo de anticuerpos (132, 135).

- Ranelato de Estroncio.

El ranelato de estroncio (RE) es un compuesto que consta de dos átomos de Estroncio (Sr) en un núcleo orgánico que es el ácido ranélico (123) (Figura 11).

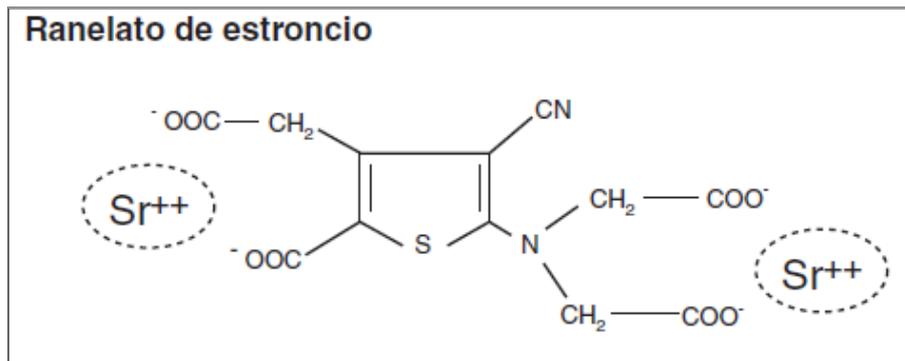


Figura 11: Fórmula química del Ranelato de Estroncio. Fuente: Palacios S SBR, Valdés C, Vázquez F. Recomendaciones sobre ranelato de estroncio en el tratamiento de la osteoporosis. Prog Obstet Ginecol. 2012;55(1):38-9.

Farmacocinética y mecanismo de acción:

En 1993 comenzó el desarrollo preclínico del RE, que incluyó numerosos estudios in vitro e in vivo con modelos experimentales y que permitieron el conocimiento de la farmacocinética de la sustancia y su mecanismo de acción.

Estudios in vitro sobre la formación y resorción ósea:

Se han publicado numerosos estudios en los que se analiza el efecto dual del fármaco; por un lado presenta un efecto positivo en la formación de tejido óseo y por el otro una disminución de la resorción de dicho tejido (147-149).

El ranelato de estroncio ha demostrado tener un efecto positivo sobre la replicación de células osteoprogenitoras y preosteoblastos, a la par que incrementa la síntesis de proteínas colágenas y no colágenas en osteoblastos maduros de rata (131, 147, 148). Es capaz de estimular la diferenciación de precursores osteoblásticos a osteoblastos maduros. Además favorece la diferenciación de osteoblastos humanos a osteocitos (Figura 12). No obstante, hay que señalar que estos efectos estimuladores de la formación observados en modelos experimentales no han sido reproducidos en todos los sistemas, por lo que son cuestionados por algunos autores (147, 148, 150).

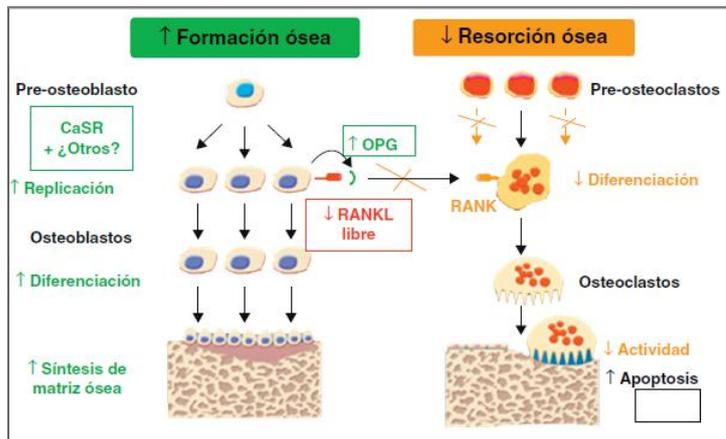


Figura 12: Mecanismo de acción sobre la proliferación y resorción. Fuente: Palacios S SBR, Valdés C, Vázquez F. Recomendaciones sobre ranelato de estroncio en el tratamiento de la osteoporosis. Prog Obstet Ginecol. 2012;55(1):38-9.

Más acuerdo existe sobre el efecto antiresortivo del RE. La inhibición de la resorción ósea se podría explicar a través de la inhibición, tanto de la diferenciación de los osteoclastos como de su capacidad de resorción. En cultivos de osteoclastos de rata, el RE inhibe, de forma dosis dependiente, la expresión de la anhidrasa carbónica II y el receptor de la vitronectina (151). Existen datos que indican que el RE también presenta efecto estimulador de la producción de osteoprotegerina (OPG) que, como hemos mencionado con anterioridad en este trabajo, es un conocido inhibidor de la osteoclastogénesis (Figura 12) (152).

Junto a la acción dual sobre las células óseas, se ha visto que el RE también tiene efectos sobre el mineral de la matriz ósea. Los iones de estroncio (Sr) son capaces de sustituir a los iones de calcio en los cristales de hidroxiapatita (153). Esta sustitución tendrá lugar, no sólo durante la formación de hueso nuevo (sustitución iónica), sino también en los cristales ya formados, por sustitución del calcio en la superficie del cristal de hidroxiapatita (intercambio iónico en superficie) (Figura 12) (147, 154).

Estudios en animales de experimentación:

En ratas hembra, el RE incrementa la formación ósea y disminuye su resorción, obteniendo como resultado un incremento de la masa ósea al mismo tiempo que una mineralización ósea conservada (153, 155).

En los estudios recientes realizados por el equipo de Ammann, se ha comprobado que el RE activa el receptor sensible a los niveles extracelulares de calcio (*calcium-sensing receptor* o CaSR), estando este último implicado en la replicación de preosteoblastos y osteoblastos (figura 12) (153).

El RE ha demostrado ser capaz de incrementar los niveles de osteoprotegerina (OPG) y a la vez suprimir el RANKL. Estos efectos se suprimen al silenciar parcialmente el CaSR, sugiriendo la implicación de este receptor (figura 12) (150, 152).

Farmacocinética y fase I:

Las propiedades farmacocinéticas han sido evaluadas en hombres y mujeres sanos. El RE se disocia en el aparato gastrointestinal, escindiéndose por un lado el estroncio (Sr) o elemento activo en el metabolismo óseo y el ácido ranélico, que no tiene actividad farmacológica (151). La absorción del estroncio (Sr) es dosis-dependiente; sin embargo, el pico de la concentración plasmática (C_{máx}) es menor de lo que correspondería proporcionalmente, probablemente debido a un proceso de saturación, como ocurre con el calcio (151, 156).

Tras la ingesta de 2g. de RE, la biodisponibilidad absoluta del estroncio (Sr) es del 25%. Si comparamos la administración del RE asociada al calcio o ingerida tras las comidas con la administración de la misma dosis en ayunas, la biodisponibilidad se reduce a un 60-70%.

La máxima concentración de estroncio se alcanza a las 3-5 horas de la administración de una dosis de 2g. El 25% se une a proteínas plasmáticas; como tiene una alta afinidad por el tejido óseo, se depositará preferentemente en el hueso de reciente formación (151, 156).

El estroncio no se metaboliza y no inhibe el citocromo P450; su eliminación es independiente del tiempo y de la dosis, teniendo una vida media efectiva de 60 horas aproximadamente. Los análisis farmacocinéticos han demostrado que la edad y el peso no afectan al aclaramiento del estroncio; por eso no necesita un ajuste de dosis (151).

Estudios clínicos fase II-III y eficacia clínica:

El RE es el primer tratamiento de la osteoporosis que parece aumentar la formación y reducir la resorción ósea de forma simultánea. Un mecanismo de acción dual innovador que llevó a su uso en la clínica.

La dosis necesaria para el tratamiento y prevención de la osteoporosis postmenopáusica fue evaluada en dos ensayos clínicos: PREVOS (*Prevention of osteoporosis Study*) y STRATOS (*Strontium administration for treatment of osteoporosis*) (157). Ambos estudios fueron aleatorizados, doble ciego y controlados con placebo y la conclusión fue, que la dosis diaria de 2 gramos era la de mejor relación eficacia-seguridad. La confirmación de que esta dosis era eficaz vino de la mano del estudio fase III FIRST (*Fracture international run*

in strontium trial) del cual surgieron dos estudios de gran importancia, SOTI (*Spinal osteoporosis therapeutic intervention*), que analizaba el efecto de prevención de fracturas vertebrales y TROPOS (*Treatment of peripheral osteoporosis*), con el objetivo de estudiar la eficacia del ranelato de estroncio en las fracturas periféricas (157, 158). La reducción de incidencia de fractura se puede valorar en la siguiente tabla (Tabla 1).

Año		RRR Fr V (IC del 95%)	RRR Fr NV (IC del 95%)	RRR Fr Cadera (IC del 95%)
3	SOTI	41 (0,48-0,73)		
	TROPOS	39 (0,51-0,73)	16 (0,70-0,99)	36 (0,41-0,99)
4	SOTI	33 (0,55-0,81)		
5	TROPOS	24 (0,65-0,88)	15 (0,73-0,99)	43 (0,33-0,97)

Tabla 1: Reducción (%) con Ranelato de Estroncio vs placebo de nuevas fracturas vertebrales y no vertebrales de los estudios SOTI y TROPOS en grupos de alto riesgo (mujeres de 74 años o más con DMO en cuello femoral de $-2,4$). Nuevas fracturas vertebrales (N Fr V), Nuevas Fracturas no vertebrales (N Fr NV), Nuevas fracturas de cadera (N Fr Cadera).

Efecto del Ranelato de Estroncio sobre la consolidación de fracturas y pseudoartrosis:

Después de analizar los efectos que produce el RE sobre el tejido óseo, parece razonable pensar que su uso podría ser de ayuda en los problemas de falta de consolidación.

El equipo de Cebesoy (159), estudió en 2007 el efecto del RE en la consolidación de las fracturas. Su estudio se realizó en un modelo experimental de fractura de tibia en rata tratada con inmovilización. Basándose en estudios radiográficos y cortes histológicos, no hallaron diferencias atribuibles al uso de RE. No obstante la falta de estudios biomecánicos y densitométricos así como otros temas relativos a la metodología del estudio, que trataremos en la discusión del presente trabajo, hacen pensar que se debería barajar la posibilidad de que si fuese efectivo.

A diferencia de los datos presentados por Cebesoy, varios autores abordan este tema utilizando modelos experimentales de fracturas en rata ovariectomizada (160, 161). Estos autores sí publican datos que confirman el

beneficio estadísticamente significativo del tratamiento con RE en fracturas osteoporóticas. Li et al (160) estudió los efectos de la administración sistémica de RE en ratas ovariectomizadas y no ovariectomizadas a las que les había realizado una osteotomía. A las 8 semanas encontró un aumento de la formación ósea, DMO e incremento de las propiedades biomecánicas y estructurales del callo en el grupo de ratas ovariectomizadas.

Ozturan et al (161) realizó un estudio similar en el que, tras 6 semanas de tratamiento con RE, detectó un aumento estadísticamente significativo de la resistencia y de la madurez del callo en el grupo de ratas ovariectomizadas tratadas con RE frente al grupo control.

A la vista de estos resultados, podemos decir que al menos, en el caso de fracturas osteoporóticas, el tratamiento con RE, sí podría ser beneficioso.

El hecho de que las condiciones metabólicas sean diferentes en las fracturas osteoporóticas puede ser la clave. Las ratas ovariectomizadas presentan un recambio óseo muy elevado, con gran destrucción de tejido óseo, donde el RE, puede jugar un papel muy importante a la hora de favorecer la consolidación (160). No obstante, estos estudios son metodológicamente más completos que el anteriormente mencionado, por lo que merece la pena no descartar aún, la posibilidad de que no sólo sea efectivo en fracturas osteoporóticas, sino también en el resto de fracturas.

1.6. Influencia genética sobre la consolidación de las fracturas.

Como se ha reflejado en apartados anteriores, sabemos que el tejido óseo tiene una gran capacidad de autorreparación (21, 71); no obstante, persisten casos en los que este proceso no se lleva a cabo. Según Szczyński et al, hasta un 65% de los pacientes diagnosticados de pseudoartrosis no tendrían una causa conocida asociada (162).

Se han señalado varios factores de riesgo como asociados a un mayor riesgo de padecer una pseudoartrosis de tipo atrófico. Entre ellos la insuficiente estabilidad mecánica, la desvitalización de los fragmentos óseos a consecuencia del extenso daño de partes blandas (incluyendo al periostio), las fracturas abiertas, algunos fármacos, etc (73).

Además de todos estos factores, en los últimos años se ha estudiado el papel del “factor genético” y la importancia que tiene en la consolidación de las fracturas (163). Lo cierto es que, si analizamos los resultados que tenemos en la práctica clínica diaria, existen casos en los que un tratamiento similar a dos

fracturas de patrón muy similar no obtiene el mismo resultado, consolidando en unos casos y en otros no.

Niikura et al (164) observó en sus estudios un descenso de la expresión de diversas BMPs y un aumento de algunos de sus inhibidores (Noggin y sclerostina) en animales que presentaron pseudoartrosis. En otros estudios con la misma finalidad encontraron una expresión de IGF-I/II e IGFBP6 más elevada en los casos que presentaban pseudoartrosis que en los que no se presentaba dicha patología (165).

Las investigaciones actuales han demostrado que determinados genes y expresiones moleculares son los responsables del inicio y regulación de la cascada de consolidación entendiéndose entonces que variaciones en la expresión genética durante la consolidación pueden alterar el proceso de consolidación (72, 166).

1.6.1. Predisposición genética a la pseudoartrosis.

Como ya se ha comentado, además de los factores conocidos que aumentan el riesgo de desarrollar una pseudoartrosis atrófica, el factor genético también juega un papel importante. En estudios experimentales in vivo esa variabilidad genética afecta al proceso de consolidación (163).

Además de la fisiopatología ya conocida de la pseudoartrosis, la variabilidad genética juega un papel importante interactuando con los factores ambientales; puede ser la causa del fracaso de la consolidación (163).

Existen pocos estudios que evalúan la variabilidad genética en humanos y la importancia de esta variabilidad a la hora de predisponer a la pseudoartrosis (Figura 13).

En estos estudios se analizan varios polimorfismos bialélicos (SNPs) de genes implicados en el proceso de consolidación y se explora su relación con la propensión a desarrollar esta patología (72).

El primer estudio que exploró la influencia de las variantes alélicas en la susceptibilidad de padecer una pseudoartrosis atrófica se centró en varios SNPs de genes de la vía de las BMP (BMP2 y 7 y los inhibidores Noggin y Smad6) en pacientes con fracturas. Fueron evaluados debido a la asociación encontrada entre ellos y la aparición de pseudoartrosis en fracturas de huesos largos (167).

La selección de estas moléculas para su estudio se decidió en base al hecho de que se ha demostrado previamente que las BMPs son poderosos agentes osteoinductores y juegan un papel importante en la consolidación (5).

Merece la pena destacar el descubrimiento de dos SNPs en los genes Noggin y Smad6 que se asocian a un mayor riesgo de sufrir pseudoartrosis atróficas si tiene lugar una fractura. Esto apoya la hipótesis de que las variantes genéticas y su expresión durante el proceso de consolidación, pueden modular la formación ósea en respuesta a una fractura (163).

Varios estudios demuestran además la importancia de estas dos moléculas (Noggin y Smad6) en la patofisiología músculo-esquelética. En el caso de Noggin, recientes estudios sobre ratones transgénicos con sobreexpresión de esta molécula, revelaron un aumento de las fracturas y osteopenia en estos animales frente al grupo control (168, 169). Además de éste hecho, Aspengberg et al (169) ha constatado en sus estudios la capacidad de Noggin para inhibir la osificación intramembranosa y la formación ósea, alterando la capacidad de consolidación.

En el caso de Smad6, los estudios de Horiki et al (170), sobre ratones transgénicos que sobreexpresan esta molécula, han detectado un déficit de osificación endocronal en estos animales alterando el proceso normal de consolidación.

Author	N	Study groups	Genes and polymorphisms	Genetic analysis	Conclusion
Dimitriou et al., 2011 ⁵	109	62 patients with atrophic non-union vs. 47 patients with uneventful fracture healing	BMP-2: rs1005464, rs235768, rs235764 BMP-7: rs4811822, rs1475000, rs186659 Noggin: rs1442828, rs1372857, rs9915822 Smad6: rs2053423, rs2119261, rs3934908	SNP analysis	Two specific polymorphisms of two inhibitors of the BMP pathway: Noggin (the G/G genotype of the rs1372857 SNP) and Smad6 (the T/T genotype of the rs2053423 SNP) were found to be associated with a greater risk of fracture non-union.
Szczęsnyet al., 2011 ³²	295	151 patients with non-union vs. 144 patients with uneventful fracture healing	TLR2: G2259A TLR4: 1/W (Asp299Gly) & 2/W (Thr399Ile) CD14: G-159T CRP: G1059C IL-6: G176C IL-1: genotype 2/2 TGF-β: codon 10 C/T	Analysis of mutation frequency of genes	Specific variants of the TLR 4 (mutated 1/W but not 2/W) and TGF-β gen (mutated homozygote T and heterozygote C/T) may be associated with increased risk of fracture non-union due to impaired pathogen recognition and elimination, leading to prolonged pathogen existence in the fracture gaps and healing delays.
Zeckey et al., 2011 ³⁸	94	50 patients with aseptic femoral and tibial non-unions vs. 44 patients with uneventful fracture healing	BMP-2: rs2273072 BMP-4: rs17563 BMP-7: rs6127983 IL-1: rs16944, rs1143634 IL-2: rs2069763, rs2069762 IL-6: rs1800795 IL-8: rs4073 TNF-α: rs1799724, rs909253 IGF-1: rs978458, rs7136446, rs9989002 MMP-9: rs3918242 MMP-13: rs2252070 PDGF-A: rs1800814, rs62433334, rs13309625	SNP analysis	There was a significant association between the CCG haplotype of PDGF-A and the occurrence of non-unions. There was also a trend to an association between the gene frequency of polymorphism rs62433334 (PDGF-A) and non-unions, and a trend towards an association of uneventful healing and the polymorphism rs2252070 of MMP-13. Overall, polymorphisms within the PDGF gene seem to be a genetic risk factor for the development of non-unions of the lower extremity following fracture.
Total	498	non-union vs. fracture union			

Figura 13: Tabla resumen de los principales estudios de investigación en humanos sobre la predisposición genética a la pseudoartrosis. *Bone morphogenetic protein (BMP), C- Reactive protein (CRP), Insulin-like growth factor (IGF), Interleukin (IL), Matrix metalloproteinasas (MMP), Platelet-derived growth factor (PDGF), Single nucleotide polymorphism (SNP), Transforming growth factor (TGF), Toll- like receptors (TLR), Tumor necrosis factor (TNF)* Dimitriou R, Carr IM, West RM, Markham AF, Giannoudis PV. Genetic predisposition to fracture non-union: a case control study of a preliminary single nucleotide polymorphisms analysis of the BMP pathway. BMC musculoskeletal disorders. 2011;12:44.

1.6.2. Importancia clínica de la predisposición genética a la pseudoartrosis.

Desde el punto de vista de la clínica, la demostración de una susceptibilidad genética a la pseudoartrosis se realizaría a través de un análisis de las variantes genéticas y podría ser un instrumento importante para detectar pacientes “en riesgo” de forma temprana.

Este hecho podría ayudar a la hora de diseñar nuevas estrategias de tratamiento que favorecieran la consolidación en pacientes con un perfil genético desfavorable (163).

1.7. Estudio de las alteraciones de la consolidación en modelos de experimentación animal.

Como ya se ha comentado con anterioridad, el hecho de que en un futuro próximo nos tengamos que enfrentar a pacientes de más edad, con problemas de salud más graves y con mayor tendencia a sufrir trastornos de consolidación, hace que nos planteemos si el enfoque actual del tratamiento es el mejor posible.

En la actualidad, si un paciente sufre un trastorno de consolidación, lo habitual es que deba someterse al menos a una cirugía extra de mayor agresividad que la previa, sin garantías de que sea suficiente (3, 8). Este tipo de cirugías de rescate suponen numerosas comorbilidades, incluso la muerte a los pacientes ancianos y pluripatológicos. Con la expectativa de envejecimiento de la población, se hacen necesarias alternativas a estos tratamientos tan agresivos.

En este sentido, sería interesante encontrar una terapia de aplicación poco agresiva, es decir preferiblemente un fármaco antes que una cirugía y de administración oral mejor que intravenosa, que consiguiese una alta tasa de consolidación con los menores efectos secundarios posibles.

Sin embargo, no debe olvidarse que todos los tratamientos tienen efectos secundarios que pueden suponer una pérdida de bienestar de un subtipo de pacientes, que ya de por sí tienen una calidad de vida limitada. Por ello, antes de plantearse el uso de un fármaco en la clínica, es importante saber hasta qué punto puede ser beneficioso mediante su estudio en animales de experimentación. En la actualidad se emplea el símil entre el modelo animal y la “maqueta del arquitecto”, es decir son y actúan como herramientas científicas.

1.7.1. Conceptos básicos sobre el uso de animales de experimentación.

Los modelos animales siguen siendo cruciales para incrementar el conocimiento de las funciones y mecanismos del organismo, así como para saber cómo trabajan los fármacos, desarrollando nuevos agentes terapéuticos y obteniendo datos críticos para el avance de los nuevos compuestos hacia los ensayos clínicos.

En el sentido estricto de la palabra, el modelo animal representa un intento por imitar las patologías y los procesos asociados a la enfermedad humana.

1.7.1.1. Consideraciones generales.

La utilización de modelos animales pasa por el desarrollo de un sistema de ensayo que nos permita comprender el mecanismo básico de la enfermedad, de forma que pueda ser sistemáticamente manipulada para que podamos entender mejor sus bases biológicas. Como punto a destacar, los modelos animales se basan en su correspondencia con el desarrollo clínico de la enfermedad en humanos. Por este motivo es capital constatar la validez del modelo experimental, siendo el punto más crítico que ha de cumplir cualquier modelo que se utilice (171).

Uno de los usos más comunes de los modelos animales está relacionado con la evaluación de nuevas entidades químicas, para el tratamiento de enfermedades. Para ello es importante el concepto de validez predictiva, esto es que los compuestos que tienen un efecto determinado sobre los humanos lo tenga también sobre el animal del modelo y a la inversa, es decir que un compuesto sin efecto en el ser humano no tenga efecto sobre el modelo (controles positivos y negativos respectivamente) (171, 172).

El significado y la validez respecto a la utilidad en términos de extrapolación de resultados en modelos experimentales animales dependerán de la selección del animal adecuado.

1.7.1.2. Selección del modelo adecuado.

La selección de la especie, raza y cepa, así como el método a aplicar, es una de las decisiones más importantes. Los objetivos del protocolo juegan un papel importante en la selección del animal más adecuado a la finalidad experimental.

Es importante tener en cuenta la extrapolación de los resultados obtenidos; aunque existan diferencias lógicas entre las distintas especies y el ser humano, aún es posible encontrar similitudes. Por eso mismo, al realizar el diseño

experimental deben conocerse las características anatómicas y funcionales de cada especie y así obtener los resultados más extrapolables posibles (171, 173).

La validez de cualquier información obtenida del modelo dependerá de la pertinencia del animal seleccionado. Dicha selección no debe estar basada únicamente en la disponibilidad, familiaridad o coste.

Según Svendsen y Hau (172), para elegir el modelo animal más adecuado a la finalidad experimental deberían plantearse las siguientes preguntas:

1. Definir la pregunta o hipótesis a confirmar.
2. Decidir el substrato sobre el cual estudiar la hipótesis (órgano, tejido, célula, etc).
3. Determinar con qué especie animal trabajar y a partir de la cuál obtener el substrato.
4. Establecer la especie y/o raza animal que mejor proporciona el substrato (en cuanto a accesibilidad, problemas técnicos, menor daño para el ejemplar, etc).
5. Establecer que factores prácticos podrán influir sobre el desarrollo de la experiencias a realizar (disponibilidad de material de otros experimentos previos, adiestramiento del personal técnico, coste económico, etc).
6. Duración de la experiencia a realizar.
7. Seleccionar el modelo animal a partir de las consideraciones científicas, prácticas y éticas previamente adquiridas.

Es casi imposible dar unas reglas específicas para la selección del mejor modelo animal, sin embargo sí podemos seguir una serie de reglas generales que nos ayudarán a que nuestro modelo experimental sea una buena "maqueta" para el investigador (174). En particular, hay una serie de características que se deben considerar cuidadosamente:

1. Adecuado como análogo.
2. Capacidad de transferir información.
3. Uniformidad genética de los organismos utilizados.
4. Conocimiento de las propiedades biológicas.

5. Coste y disponibilidad.
6. Generalización de los resultados.
7. Facilidad y adaptabilidad de la manipulación experimental.
8. Consecuencias etiológicas.
9. Implicaciones éticas.
10. Disponibilidad de alojamiento.
11. Tamaño del animal.
12. Número de individuos necesarios.
13. Esperanza de vida.
14. Sexo.
15. Cantidad de datos necesarios.
16. Edad de los animales.
17. Necesidad de descendencia.

Habitualmente los estudios se realizan en rata, ratón o cobaya por ser animales de donde se extrae mucha información, se ha acumulado gran experiencia trabajando con ellas y cumplen casi todas sino todas las premisas anteriormente expuestas.

1.7.1.3. Extrapolación del animal al hombre.

El término extrapolación se utiliza con frecuencia para describir cómo los datos obtenidos de estudios con animales pueden ser aplicados en humanos.

La extrapolación de los resultados se puede realizar de dos formas:

- Cualitativa: Si un modelo animal presenta reacciones a estímulos que se reproducen en otras especies animales y en la humana.
- Cuantitativa: Si un modelo animal permite discriminar los efectos de diferentes dosis de un determinado producto y después estas dosis son aplicables o tienen efectos idénticos en otras especies animales o en la especie humana.

La validez de la extrapolación puede ser altamente complicada como consecuencia de la pregunta: ¿para qué humanos va destinado?

Es muy común obtener resultados desde modelos animales genéticamente definidos, mientras que los humanos, a los cuales va destinado, son muy variables en cuanto a genética, ambiente, dietas, etc. Todo esto puede ser importante en modelos farmacológicos y toxicológicos (173).

No hay unas normas preestablecidas para analizar la validez de la extrapolación de una especie a otra. Esto debe ser evaluado individualmente para cada experimento y habitualmente debe ser verificado en la especie objetivo. La base lógica que hay detrás de la extrapolación de resultados de una especie animal a otra está basada en la homología, la semejanza evolutiva, las estructuras morfológicas y los procesos fisiológicos entre las diferentes especies animales y los humanos (171).

1.7.2. Modelos experimentales para el estudio de fracturas.

Como hemos adelantado en el apartado anterior, la clave para que un modelo experimental sea de utilidad es la capacidad de extrapolación de los datos obtenidos (173). Para ello es imprescindible la validez del modelo a la hora de reflejar la “situación clínica” así como la buena reproducibilidad del mismo (175). Es importante tener en cuenta las limitaciones de cada modelo para no cometer errores de extrapolación.

Cuando un modelo experimental se utiliza para valorar las fracturas y las alteraciones de consolidación de las mismas, es importante que refleje fielmente la biomecánica y la fisiología tan particular que tiene en este aspecto el ser humano(175). Esto no siempre se cumple. Por ejemplo en algunos modelos de pseudoartrosis se simula esta patología con un gran defecto óseo en situación aguda, mientras que la pseudoartrosis de un paciente no tiene por qué caracterizarse por tener un gran defecto óseo y por definición no es aguda. Dado que ningún animal presenta nuestras mismas características anatómicas, histológicas, biomecánicas, etc. debemos “ingeniárnoslas” para que el modelo recree la situación clínica lo más fielmente posible (171).

1.7.2.1. Factores dependientes del animal que limitan la validez del modelo.

Existen muchos factores que actúan sobre el modelo experimental y alteran los resultados; se deben tener en cuenta para que las conclusiones resulten correctas. Básicamente serán:

- Edad: Diversos estudios han demostrado que la edad del animal afecta tanto a la calidad ósea como al tiempo de consolidación.
- Sexo: El “turnover” y la reparación ósea pueden verse alterados por la influencia del ciclo hormonal de las hembras. En ratas ovariectomizadas, sobre todo si se trata de ratas “añosas” se presentan con mayor facilidad una disminución de densidad mineral ósea y los retrasos de consolidación, siendo un modelo perfecto para la simulación de fracturas osteoporóticas (176).
- Elección del animal: Existen múltiples animales utilizados para la investigación de la consolidación de las fracturas. Lamentablemente ninguno cumple todas las propiedades del hueso del ser humano. No obstante, dado que algunos presentan grandes similitudes, pueden tomarse como modelos (177).

En nuestro caso hemos utilizado ratas. Hasta un 36% de los investigadores las utilizan para este tipo de modelos experimentales (175, 176). Las ratas presentan un hueso de características similares al nuestro; tiene un buen remodelado del tejido esponjoso aunque menor en el tejido cortical. No obstante, la rata es un modelo muy útil para los estudios sobre huesos largos. Son animales fáciles de alojar (las hembras pueden compartir jaulas), higiénicos y de coste asequible (175).

1.7.2.2. Factores dependientes de la metodología que influyen en la validez.

Como ya hemos comentado, existen numerosos factores dependientes de las características del animal que pueden alterar el resultado final. No obstante, la validez de un modelo de experimentación no depende únicamente de las características del animal elegido sino también de las técnicas quirúrgicas e implantes que utilizamos y que van a influir en el resultado.

- Cirugía abierta/cerrada: Existen técnicas capaces de producir una fractura cerrada (guillotina) en el hueso del animal de experimentación. Si para su estabilización utilizamos el enclavado endomedular, seríamos capaces de reproducir fielmente la consolidación secundaria por segunda intención. Si abrimos el foco para realizar la fractura perderíamos el hematoma fracturario alterando el resultado (175).
- Realización de la fractura: Si realizamos la fractura de manera cerrada, utilizando una guillotina o cualquier otro medio, la fractura será mucho más estable; esto es debido a que los fragmentos están perfectamente engranados, las partes blandas les aportan cierto grado de “empaquetamiento” que los

mantiene en su posición, etc. Si optamos por realizar una osteotomía abierta todas estas características se perderán haciéndola más parecida a la situación que queremos reproducir (175). Además de todo eso, Park describe en sus estudios que la reacción del tejido óseo a la sierra difiere de la producida por la fractura y también alteraría la consolidación de la misma (179).

- Técnicas de estabilización: Como se ha descrito con anterioridad, la consolidación de la fractura tendrá lugar gracias a la combinación de las consolidaciones endocondral y membranosa. Si utilizamos técnicas de fijación rígida, como las placas, predominará la consolidación membranosa; si por el contrario optamos por una fijación relativa, como es el caso de los enclavados y los fijadores externos, predominará la consolidación endocondral. Por todo ésto, deberíamos escoger el método de fijación según nos interese el predominio de uno u otro tipo de consolidación (175, 176).
- Fármacos: Se ha demostrado que diversos fármacos administrados a los animales, durante el proceso quirúrgico, son capaces de alterar la consolidación de la fractura. Este es el caso de ciertos anestésicos inhalados, analgésicos o antibióticos. Por eso es necesaria la aplicación de protocolos para el uso correcto de los mismos con el objetivo de disminuir o limitar su uso en el tiempo (175, 176).

1.7.3. Modelos experimentales para el estudio de pseudoartrosis atróficas.

Por consenso, se diagnostica de pseudoartrosis a los animales de experimentación cuya fractura no ha consolidado durante el periodo que dura el estudio. En la mayoría de los animales de pequeño tamaño, se considera que un periodo 10-15 semanas es razonable para esto (175).

Dado que existen diversos tipos y causas de pseudoartrosis lo lógico es que se intenten reproducir fielmente estas situaciones en los modelos animales; dicho de otro modo, si se produce una pseudoartrosis tras un mecanismo de alta energía lo lógico es que se reproduzcan los hechos en el modelo para conseguir que sea extrapolable. Como el trabajo que nos ocupa se refiere al estudio de pseudoartrosis atróficas, a continuación se explicarán algunos medios, descritos en la bibliografía, para reproducirla.

- Interposición de material extraño a la fractura: Consiste en aislar ambos extremos del hueso fracturado entre ellos, colocando algún material ajeno al callo para impedir a consolidación. Aunque fue de los primeros métodos en utilizarse, lo cierto es que su reproductibilidad es limitada sus resultados inconsistentes (178).

- Agresión química o térmica: Dado que una reproducción fiel de lo que es una pseudoartrosis atrófica conlleva la inexistencia de potencial biológico de consolidación en el foco de fractura, la lesión del periostio de uno u otro modo puede reproducir esta situación (178).

Kokubu (179) se basa en esta teoría para realizar su modelo de pseudoartrosis atrófica.

En su estudio recoge una muestra de 96 ratas Long Evans de las cuales a la mitad les realiza una fractura cerrada y síntesis anterógrada con agujas de kirschner y a la otra mitad les realiza la fractura, abre el foco de fractura y cauteriza 2mm. de periostio a cada lado del foco. Tras los análisis radiológicos, biomecánicos e histológicos pertinentes, se comprobó la efectividad de este método para crear pseudoartrosis atróficas.

En este sentido el estudio de Geris (180) también es interesante. Este autor realiza el mismo procedimiento pero, en vez de abrir el foco, crea la fractura con una fresa de alta velocidad provocando un aumento de temperatura que destruye el periostio circundante

- Reintervención quirúrgica: Numerosos autores recurren a la reintervención de los animales de experimentación con el objeto de resecar y eliminar el tejido circundante reparativo (endostio y periostio) del foco de fractura. Este método ha conseguido buenos resultados en todo tipo de animal de experimentación (175).

- Creación de un defecto óseo: Mediante una osteotomía de resección a nivel de la fractura, creamos un déficit óseo que no consolida por si solo durante el periodo de observación del animal; el tamaño que debe tener ese defecto es objeto de estudio y debate en la actualidad. García (181) demostró que el defecto necesario para generar un modelo reproducible de pseudartrosis femoral en rata es de 1,8mm. Manteniendo el defecto con un sistema de fijación y desperiostizando los 2mm circundantes al foco de resección obtienen un 100% de pseudoartrosis atróficas (181).

Kaspar (183) diseña un modelo en el que simula la situación biológica más fielmente. Sobre ratas Sprague-Dawley realiza una osteotomía con sierra y estabiliza esta fractura con un fijador externo tras resecar una cuña de 2mm de hueso y desperiostizar el foco de fractura ampliamente. Este procedimiento se parece más a la situación a imitar, que es la intervención quirúrgica de las fracturas.

Mills et al (175) determina de forma genérica, que una resección del 10% del tamaño del hueso es más que suficiente para crear esta situación de forma reproducible.

1.8. Estudio biomecánico de la pseudoartrosis.

Podemos definir la biomecánica como la ciencia que estudia el comportamiento mecánico de un tejido u órgano como consecuencia de las cargas que le afectan, la constitución microestructural del propio material y las restricciones impuestas por otros órganos o por el entorno del tejido así como el cambio que se produce en él con el paso del tiempo (182). La aplicación de esta ciencia nos ayudará a valorar la estructura ósea y su riesgo de sufrir fracturas.

El hueso presenta unas determinadas características que contribuyen a su resistencia frente a traumatismos. Estas características son:

- La geometría ósea o cantidad de tejido óseo dispuesto en las corticales y en las trabéculas óseas (183).
- Las propiedades bioquímicas del tejido (183).
- La masa ósea, medible a través de la densitometría mineral ósea (DMO). A pesar de ser la única técnica disponible en la clínica práctica habitual, lo cierto es que se ha mostrado como un predictor limitado del riesgo de fractura en pacientes osteoporóticos(182, 184).

Dado que en la práctica clínica tenemos recursos limitados para identificar qué pacientes están en riesgo de sufrir una fractura osteoporótica, se están buscando nuevos métodos que nos ayuden a identificar estos pacientes. Dado que la DMO tiene un valor limitado, se están valorando procedimientos para analizar otros factores que influyen en la resistencia, como la geometría, la microarquitectura y la “calidad” del tejido óseo (Figura 14).

Con el desarrollo de las nuevas técnicas de imagen (resonancia magnética y CT de alta resolución), es posible estudiar la microarquitectura del tejido óseo. Estas técnicas no dañan la muestra con lo que se puede repetir la prueba si se precisa. El único inconveniente que presenta actualmente es la cantidad de tiempo y dinero que supone realizar esta prueba (184).

Las técnicas de evaluación de las propiedades biomecánicas aportan información directa sobre la resistencia del hueso. Sometiendo las muestras a pruebas de compresión, torsión o flexión hasta el momento de la fractura

obtendremos datos sobre la rigidez, la energía necesaria para fracturar el hueso, etc (183, 184).

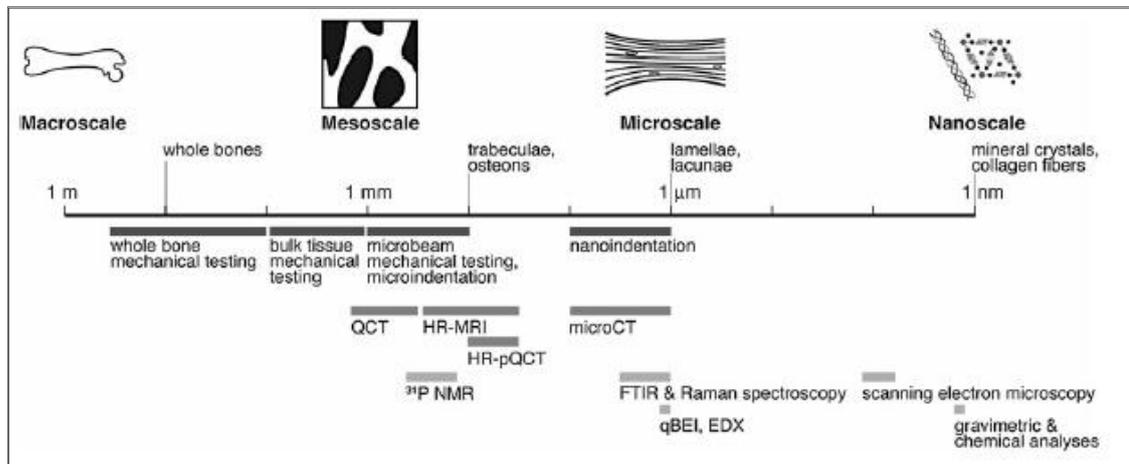


Figura 14: Métodos de evaluación mecánicos en las bandas superiores, métodos de microarquitectura/geometría en las intermedias y métodos que evalúan los componentes del hueso en las bandas inferiores. Fuente: Donnelly E. Methods for assessing bone quality: a review. Clinical orthopaedics and related research. 2011;469(8):2128-38.

1.8.1. Propiedades de los materiales y respuesta de los mismos a las fuerzas.

Para poder realizar las pruebas biomecánicas en condiciones óptimas, es necesario que se cumplan una serie de requisitos y condiciones térmicas, mecánicas, físicas, etc. Hay que considerar la estructura y geometría del material y sus posibles modificaciones durante su procesado (183, 185).

Debido a las fuerzas de cohesión, los átomos que componen un objeto ocupan posiciones definidas y en equilibrio. Cuando alguna fuerza exterior actúa sobre un objeto se altera la posición en equilibrio de los átomos que lo componen y se produce una deformación. Al mismo tiempo, y debido a las fuerzas de cohesión entre los átomos, se generan fuerzas interiores que se oponen a las fuerzas aplicadas y, por tanto, a la deformación del objeto (185).

La relación entre la carga aplicada y la deformación producida en el material en respuesta a la misma se denomina curva de carga-deformación (*load-deformation curve*). Esta curva se puede dividir en dos partes: Deformación elástica y deformación plástica.

- **Deformación elástica:** El material se deforma mientras la fuerza actuante está presente; en el momento en que ésta desaparece el material adopta su forma original.

- Deformación plástica: Según Young, cuando la fuerza actuante sobre el material sobrepasa la capacidad de recuperación de éste, se deforma permanentemente; es decir, aunque se retire esa fuerza actuante la deformación persiste. A este hecho se le denomina deformación plástica (Figura 15). Si se continúa aplicando carga se puede llegar a producir fatiga o rotura de dicho material (183, 185).

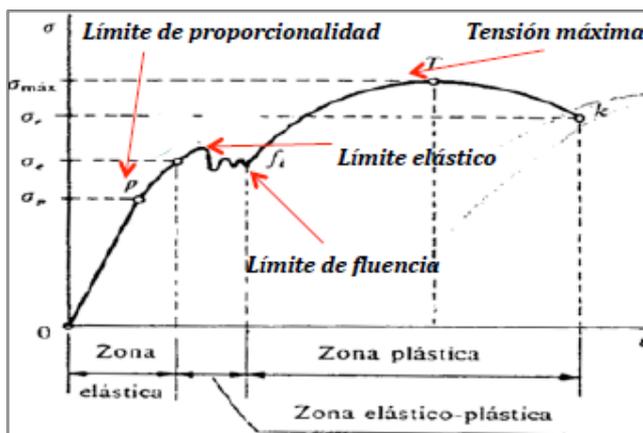


Figura 15: Ejemplo de curva carga-deformación.

Dado que existen multitud de pruebas biomecánicas, a continuación describiremos únicamente las utilizadas en el presente trabajo: Ensayo de flexión en cuatro puntos y microindentación.

1.8.2. Ensayo de flexión en cuatro puntos.

Estos ensayos son sencillos en cuanto a realización, permiten evaluar la resistencia de huesos de pequeños animales, en los que otro tipo de ensayos son más difíciles de realizar (185).

Básicamente consiste en aplicar una fuerza deformante sobre la superficie del material (en este caso la diáfisis femoral de la rata) y a medida que esto sucede en unos puntos tendrán lugar fuerzas de compresión, en otros fuerzas de tensión y en otros ambas fuerzas se neutralizarán (Figura 16). En teoría la zona central de la prueba sería el eje neutro; por encima de ese eje se producen fuerzas de tensión, por debajo de compresión. Dado que el tejido óseo soporta mejor la compresión que la tensión, la muestra se romperá con mayor frecuencia por el lado donde se produce esta última (185).

El esquema explicado corresponde al ensayo de flexión en tres puntos. Este ensayo no es correcto del todo pues al aplicar la fuerza en el centro de la muestra se producen fuerzas de cizalla a través de la misma; si se aplica la

fuerza en cuatro puntos se evita este último hecho y la fuerza se aplica de forma casi constante en toda la longitud de la muestra (183).

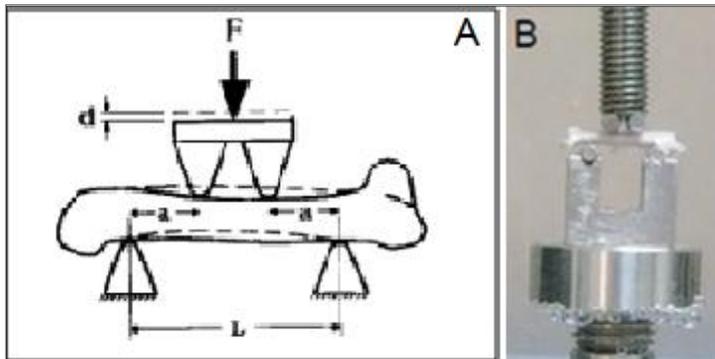


Figura 16: Muestra de uno de los ensayos realizados a los animales de experimentación del presente trabajo y esquema del ensayo de flexión en cuatro puntos. Fuente: Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. Bone. 1993;14(4):595-608.

También es importante considerar la longitud de la probeta; si ésta es muy corta se producirán fuerzas de cizalla en lugar de las de flexión. Habitualmente se necesitará una longitud equivalente a 16 veces el grosor de la muestra. Como es imposible conseguir esta última premisa en el caso de tener una muestra de fémur de rata, establecemos que debe ser de al menos 15 mm. (en el caso de las hembras) para asegurarnos de que el 85-90% de las fuerzas que se producen son de flexión (185).

Como resultado obtendremos una gráfica parecida a la que se obtiene para conocer el módulo de elasticidad. En el eje de coordenadas aparece la fuerza empleada para ocasionar la deformidad y en el abscisas la deformación producida. Al romperse el material obtendremos los datos de fuerza y energía máxima registrados momentos antes de que se produzca la fractura (Figura 17).

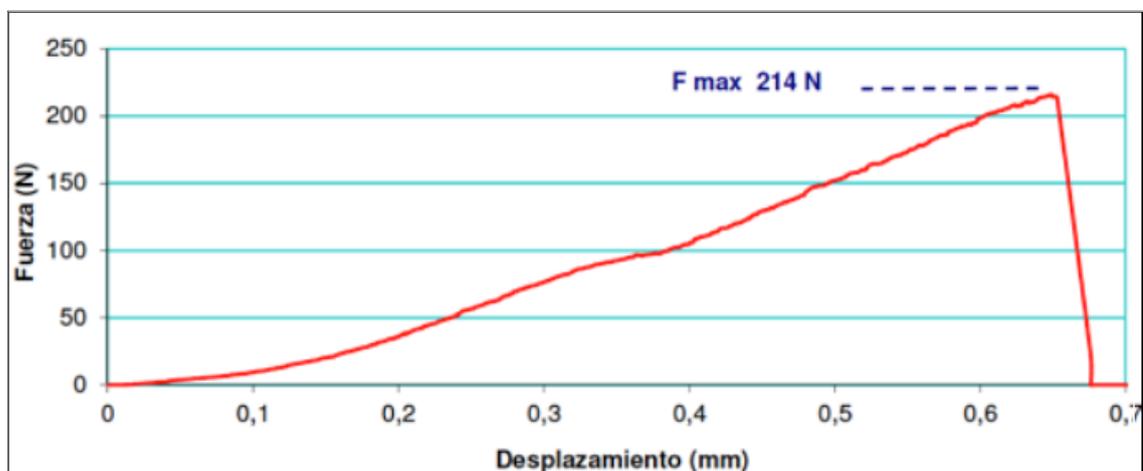


Figura 17: Gráfica obtenida en uno de los ensayos del trabajo. En esta gráfica podemos objetivar la fuerza máxima que es la necesaria para producir la fractura del material.

1.8.3. Ensayos de microindentación.

Podemos definir la dureza como la resistencia que ofrece un cuerpo a dejarse penetrar por otro. Esta definición explica perfectamente las bases de la indentación; sometemos materiales a experimentos de penetración con un instrumento penetrador de carga conocida para crear una huella. La relación entre el área de la huella creada y la fuerza necesaria para producirla nos indicará la dureza del material a ensayo (184). Dependiendo de la carga a la que sometemos el material a estudio, podemos dividir los ensayos de indentación en macro, micro y nanoindentación.

Se han descrito varios estudios en función de la forma que tenga el penetrador; para este trabajo se ha utilizado el de Berkovich que tiene forma de pirámide con base triangular (Figura 18).

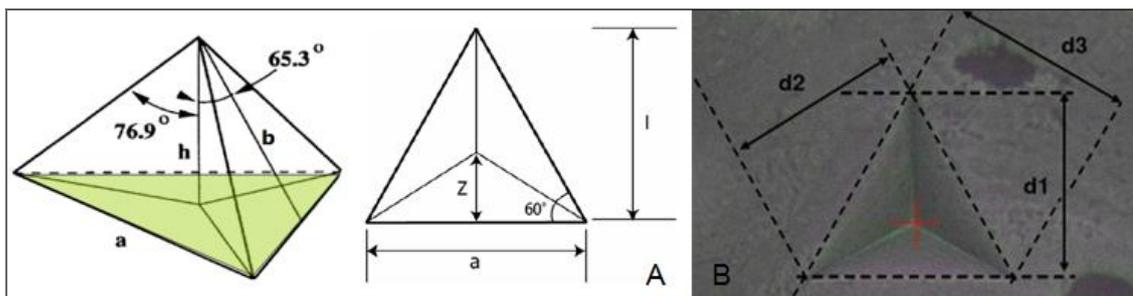


Figura 18: (A) Representación esquemática del indentador tipo Berkovich. (B) Muestra obtenida durante el estudio, determinación de las tres alturas de la huella.

Una vez realizado el ensayo, la dureza depende de la forma geométrica del indentador. El área de la huella se puede obtener bien por medición directa de la fotografía, obtenida con microscopio, bien por las relaciones geométricas del indentador y la curva del ensayo (Figura 17).

A parte de la dureza, en estos ensayos se obtiene información sobre el módulo de elasticidad, el trabajo elástico y el plástico, etc (182, 186).

Este ensayo nos da una información muy valiosa en el estudio de las propiedades del hueso. No obstante hasta el momento ha tenido poca cabida en la práctica clínica pues para poder realizarse exige una muestra de tejido, es decir una biopsia para la obtención del mismo. Con la aparición de microindentadores diseñados para realizar sus ensayos sin muestra, como el "reference point microindentation" este problema podría verse resuelto en un periodo corto de tiempo (182, 186).

Díez-Pérez ha realizado con este dispositivo en pacientes con fractura por fragilidad ósea previa y en un grupo de control. Los parámetros que obtuvo diferenciaban claramente ambos grupos (182).

Gallant comprara los resultados de este microindentador con los ensayos previos de flexión en tres puntos y compresión axial. Los parámetros obtenidos resultaron ser equivalentes (187).

A pesar de todos los aspectos favorables del uso de este instrumento, presenta varios inconvenientes como el ángulo de ataque del indentador respecto de la diáfisis y la necesidad de ejercer una compresión contra la superficie del hueso de forma constante por lo que es recomendable que lo utilice un cirujano experto; no obstante es un arma de indudable valor diagnóstico (186).

Justificación y objetivos.

Justificación y objetivos.

Justificación y objetivos.

Justificación y objetivos.

2. Justificación y objetivos.

El retraso o el fracaso en el proceso de consolidación de las fracturas es uno de los mayores retos a los que se puede enfrentar un traumatólogo. De todas las fracturas que se producen anualmente, se estima que entre un 6 y un 10% evolucionan de este modo, lo que supone un importante problema desde todos los puntos de vista.

En estos pacientes se ven muy limitadas sus actividades de la vida cotidiana, tanto por la incapacidad que les supone este proceso como por las numerosas cirugías y tratamientos a los que se ven sometidos. Por tanto no es de extrañar que a menudo sufran problemas psicológicos, como consecuencia de este hecho. Si a esto le sumamos que no pueden realizar su trabajo de forma adecuada (por las numerosas bajas que sufren, incapacidad física, etc.) y que los tratamientos son muy costosos (en días de hospitalización, cirugías y tratamientos médicos), las pseudoartrosis suponen una importante carga, tanto para el paciente como para el sistema sanitario (9).

Se estima que en el año 2050, el 37% de la población española tendrá más de 65 años. Este es un dato muy importante ya que la calidad ósea de estos pacientes es mucho peor, favoreciendo el aumento de las fracturas por fragilidad, el fracaso de los implantes y el riesgo de los retardos de consolidación. Además presentan mayor tasa de comorbilidades que la población joven lo que supone enfrentarnos a una población a tratar de mayor complejidad médica, quirúrgica y de peor pronóstico dadas sus características (1).

Considerando el marco de actuación y las graves repercusiones que genera una pseudoartrosis, es capital para el traumatólogo conseguir mejorar las expectativas de su tratamiento, disminuyendo en la medida de lo posible la tasa de pseudoartrosis.

En los últimos años se ha planteado la posibilidad de acelerar la consolidación de las fracturas mediante el uso de fármacos desarrollados para tratar la osteoporosis, ya que algunos han demostrado un efecto anabólico en estudios experimentales con animales.

El ranelato de estroncio es un fármaco utilizado en el tratamiento de la osteoporosis y con actividad sobre la consolidación de las fracturas. En estudios con animales de experimentación ha presentado resultados

prometedores, en el tratamiento de la fractura, pero no hay datos disponibles sobre su uso en pseudoartrosis (160).

Este trabajo se planteó como un intento de avanzar en el tratamiento de la pseudoartrosis. Teniendo en cuenta, la falta de modelos experimentales de pseudoartrosis atróficas estandarizados, el primer paso a seguir fue desarrollar uno propio que sea válido, contrastado y reproducible. Una vez logrado el modelo, se realizó la segunda parte, consistente en evaluar la acción del ranelato de estroncio como tratamiento de esta complicación.

2.1. Hipótesis.

La hipótesis general de este estudio fue que se podría establecer un modelo experimental de pseudoartrosis femoral reproducible, que facilitara los estudios preclínicos y los factores condicionantes de la pseudoartrosis humana, y en particular analizar el efecto de fármacos estimuladores de la formación ósea, como el ranelato de estroncio.

2.2. Objetivos:

2.2.1. Objetivos generales.

- Diseñar un modelo experimental de pseudoartrosis atrófica femoral en ratas Sprague-Dawley.
- Valorar si la administración de ranelato de estroncio, influye favorablemente en la evolución de la pseudoartrosis experimental.

2.2.2. Objetivos específicos.

- Valorar la formación de manguito perióstico cortical desde el punto de vista radiológico (grado de consolidación de la pseudoartrosis) en función del tratamiento aplicado, en las diferentes etapas del estudio.
- Valorar las características histológicas de la región de la pseudoartrosis y el efecto del tratamiento, especialmente sobre la neo-formación de hueso versus tejido fibrocartilaginoso.
- Determinar la influencia del tratamiento sobre la expresión de genes de la vía Wnt y otros relacionados con la osteogénesis.
- Valorar la influencia del tratamiento sobre la dureza del hueso y la resistencia del callo de fractura.

Material y métodos.

Material y métodos.

Material y métodos.

3. Material y métodos.

A continuación se expone el sistema empleado para la creación del modelo de experimental de pseudoartrosis y la obtención de las muestras procedentes de los animales así como el tipo de análisis de los datos obtenidos.

3.1. Metodología del modelo experimental de pseudoartrosis atrófica.

La primera etapa del proyecto consistió en crear un modelo experimental de pseudoartrosis. Para ello el primer paso fue decidir, no sólo el animal a utilizar sino también la raza. Las razones que nos llevaron a utilizar la rata Sprague-Dawley, hembra de 12-16 semanas de edad y un peso entre 250 y 290 gr como animal de experimentación fueron:

- La asequibilidad y accesibilidad: Es un animal de experimentación poco costoso y su tasa de reproducción es alta; ésto nos permite tener un número considerable de especímenes con un coste aceptable. Además de ser adecuado por su estructura ósea, el tiempo de consolidación de sus fracturas es breve, lo que hace que se acorte el tiempo de duración del experimento, abaratando aun más los costes.
- El manejo en el estabulario: Dado que es un animal que se utiliza con mucha frecuencia, el personal del estabulario está formado para llevar a cabo sus cuidados a la perfección. Son animales de manejo sencillo, higiénicos y las hembras se pueden estabular juntas. Por ello, supone un ahorro de mantenimiento considerable.
- El manejo durante el estudio: Se realizaron estudios pre-piloto con diferentes intervenciones quirúrgicas y estudios radiográficos, antes de comenzar con el estudio definitivo. Así pudimos evaluar y perfeccionar el modelo diseñado sin alterar los resultados finales ya que estos animales no se incluyeron en el estudio.

Pudimos comprobar que la vía de abordaje era adecuada, el material de osteosíntesis era el correcto y las radiografías que hacíamos eran reproducibles.

La rata Sprague-Dawley, hembra de 12-16 semanas de edad y un peso entre 250 y 290 gr, tiene un fémur de longitud y diámetros que nos permite enclavarlo

con un tornillo autorroscante de rosca completa de 20 mm y 24 mm de longitud, que queda bloqueado en las corticales.

El objetivo fue crear un modelo experimental de pseudoartrosis atrófica femoral que imitase las características de ese tipo de pseudoartrosis en humanos; es decir un ambiente estable mecánicamente en el que el componente biológico de la consolidación esté alterado con mayor o menor grado de pérdida de tejido óseo.

Para conseguir la simulación de pseudoartrosis atrófica en el modelo experimental incluimos las siguientes características:

- Un defecto óseo estable y mantenido en el tiempo por medio de un tornillo intramedular.
- Pérdida de las propiedades del hematoma fracturario mediante el abordaje quirúrgico del fémur.
- Alteración de la vascularización endostal; para ello, se fresa el canal con una boca de 1,1 x 22 mm. a nivel intercondíleo, y se introduce un tornillo intramedular que además sirve para dar estabilidad mantenida en el tiempo al defecto óseo a nivel de la fractura.
- Se realizó una fractura en la diáfisis femoral. Por sus características anatómicas es el lugar donde con más frecuencia tienen lugar los trastornos de la consolidación, por lo que el grado de similitud con un paciente real es mayor.

Para realizar la fractura se utilizó una vía de abordaje lateral al muslo. Se realizó la osteotomía de sustracción femoral circular, un bloque de hueso de 2 mm dejando un defecto óseo a nivel medio-femoral. Para mantener este defecto y permitir la carga inmediata se estabilizó la osteotomía (manteniendo el defecto) con un tornillo endomedular retrógrado (introducción intercondílea), autorroscante, de rosca completa. Previamente se fresa el canal endomedular, con el fin de eliminar la circulación endostal, tal como ocurre habitualmente en un paciente tratado por este método.

Al final del proceso se realizó un lavado exhaustivo de la zona de la osteotomía con suero salino con el objetivo eliminar cualquier posibilidad de formación de hematoma fracturario.

La decisión de establecer un defecto óseo de 2 mm se basó en la literatura sobre otros modelos experimentales. Además para estandarizar el procedimiento y facilitar la inserción del tornillo, la osteotomía se realizó a nivel medio-diafisario femoral a 1cm de la articulación de la rodilla (Figura 19).

La diferencia anatómica de los fémures de humanos y ratas hace que se planteen varios problemas de ejecución del enclavado. En la práctica clínica el enclavado retrogrado se utiliza para fracturas distales femorales y cuando existen problemas de inserción a nivel del trocánter (obesidad, implantes previos en cadera); el abordaje más estandarizado para realizar un enclavado de fémur es el anterógrado. En las ratas el trocánter mayor es muy estrecho en el plano antero-posterior (Figura 19), esto hace que enclavar el fémur por esta vía sea dificultoso, por ello se optó por un abordaje retrógrado.



Figuras 19: Muestra macroscópica: Fémur de rata Sprague-Dawley procedente de los fémures del estudio pre-piloto. Podemos comprobar cómo el trocánter mayor es tan estrecho que imposibilita cualquier enclavado por esa vía.

En experimentos preliminares se observó que la cabeza del tornillo era muy voluminosa y protruía a nivel intercondíleo, provocando que las ratas no cargasen sobre la pata. Por este motivo, se rebajó el contorno de la cabeza del tornillo, manteniendo la superficie relativa al engranaje del destornillador y se avellanó la zona de inserción, con avellanador de 1,5mm (Figuras 20A, 20B y 20C).



Figura 20: (A-B-C) Ejemplo comparativo de tornillo de acero modificado de cortical autorroscante de 20 mm. y 24 mm. de longitud, con la cabeza modificada (rebajando el perfil de la misma con una máquina amoladora). Dicha modificación de la cabeza del tornillo evita la excesiva protrusión a nivel del aparato extensor de la rodilla. (C) Ejemplo de protrusión de la cabeza del tornillo sin modificar en ratona del estudio pre-piloto.

Además de todas estas diferencias se plantea la más obvia, el tamaño. Dado el tamaño de estos fémures no teníamos bloqueos distales. Por tanto, la osteotomía podría colapsarse o se podría producir una rotación de la extremidad. Para evitar esto, escogimos un tamaño de tornillo cuyas espiras ocupaban todo el grosor del canal femoral de las ratas (22-24mm).

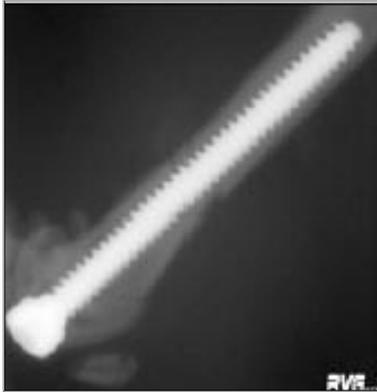


Figura 21: Radiografía lateral de fémur procedente de animal de prueba para el diseño del modelo de experimentación. Como se puede comprobar el diámetro del tornillo ocupa el canal medular y las espiras otorgan el agarre que el tornillo necesita para evitar colapsos y rotaciones de la extremidad operada.

Si observamos con detenimiento la figura 21, que corresponde a una radiografía lateral de fémur, de uno de los animales de prueba del modelo experimental podemos determinar claramente que el diámetro del tornillo ocupa en gran medida el canal endomedular.

3.2. Grupos experimentales.

Todas las fases del experimento (recepción, cría, intervención quirúrgica, reanimación, mantenimiento y eutanasia) fueron realizadas en el Servicio de estabulación y Experimentación Animal (SEEA) de la Universidad de Cantabria. Este servicio está registrado ante la Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca como establecimiento usuario con número de registro 39/1/U. En lo referente al manejo, salud y bienestar de los animales se rigen por el Real Decreto 1201/05 y por la normativa de la Comunidad Autónoma de Cantabria.

Para realizar el estudio lo primero que se planteó fue escoger el número de ratas. Dado que es un estudio experimental con un modelo novedoso, no pudimos seguir la pauta habitual para estimar la muestra necesaria, por tanto nos basamos en publicaciones anteriores sobre animales de experimentación. El número de ratas empleado fue de 36, dividido en diferentes grupos.

Se escogió como animal de experimentación la hembra rata Sprague-Dawley, hembra de 12-16 semanas de edad y un peso entre 250 y 290 gr. Estos animales procedían, en su totalidad, del laboratorio OFA SD de Charles River (Maryland- Estados Unidos). Se escogió este animal debido a que se ajusta a las necesidades del estudio; es decir son animales de manejo conocido por el personal del animalario, de coste asequible y el laboratorio de Charles-River ofrece animales sin colonizaciones, problema que presentan muchos otros animalarios.

Los animales se sometieron a una alimentación ad libitum, con la dieta de mantenimiento para rata y ratón A04® de Panlab SLU. Durante todo el proceso, las ratas vivieron en las mismas condiciones de humedad (50-60%), temperatura (22^o-24^o) y ritmo circadiano (fotoperiodo de 12 horas de luz de 8 a 22h). Fueron enjauladas de manera independiente a partir del día de la intervención, sin restricciones para deambulación o carga sobre la extremidad intervenida. Para evaluar la salud de los animales se recogió el peso semanal de las mismas. En el anexo 2 se pueden observar gráficas con la evolución del peso de las ratas empleadas en el estudio.

Para la realización del estudio procedimos a la división en tres grupos de los 36 animales de experimentación:

Grupo A1 o Grupo control fractura: En este grupo, formado por 12 roedores, se procedió a realizar la fractura (OT) sin osteotomía de sustracción. Posteriormente se estabilizó la osteotomía con un tornillo intramedular retrógrado y se procedió a la administración diaria de 0,6 ml. de suero salino fisiológico por vía oral, durante cinco días a la semana (lunes a viernes).

Grupo A2 o Grupo control osteotomía: A los 12 roedores que componían este grupo se les realizó una osteotomía de sustracción (OS) sintetizada con el mismo método que el grupo anterior. Del mismo modo se procedió a la administración diaria de 0,6 ml. de suero salino fisiológico por vía oral, durante cinco días a la semana (lunes a viernes).

Grupo B o Grupo ranelato de estroncio: Grupo de estudio compuesto por 12 roedores sometidos a una osteotomía de sustracción sintetizada mediante un tornillo intramedular retrógrado. Como tratamiento se les administró diariamente una dosis de ranelato de estroncio (Protelos®-Les Laboratoires SERVIER, Gidy, Francia) por vía oral a una dosis de 900mg/Kg/día evitando la presencia de alimento en el estómago al menos 2 horas antes y 2 horas después de la administración, durante cinco días a la semana (lunes a viernes).

Este tratamiento se mantuvo durante 12 semanas, comenzando el mismo día de la cirugía.

3.3. Protocolo de intervención quirúrgica.

3.3.1. Manejo anestésico de los animales.

Para poder realizar la cirugía fue necesario someter a las ratas a una anestesia general, llevada a cabo por el veterinario responsable del SEEA.

El proceso de anestesia comenzó dos horas antes de cada intervención: Durante este periodo se administró, como premedicación, enrofloxacino (Baytril® Bayer HealthCare) por vía intramuscular a dosis de 10 mg/Kg. a modo de profilaxis antibiótica y buprenorfina (Tecnopren® Tecnofarma) por vía subcutánea a dosis de 0,1 mg/Kg.

La inducción anestésica se realizó con ketamina (Ketolar® Pfizer España) por vía intraperitoneal a dosis de 40mg/Kg. y xilacina (Rompun® Bayer HealthCare) a dosis de 2,5 mg/Kg. también por vía intraperitoneal.

Como fase de mantenimiento de la anestesia se administró una mascarilla al animal con oxígeno e Isoflurano al 0,5%. Además se colocó un catéter endovenoso salinizado en una de las venas de la cola, como vía de acceso rápido. Para evitar problemas de hipotermia durante la cirugía, todo el proceso se llevó a cabo sobre una manta eléctrica a temperaturas de 35-36°C (Figura 22).

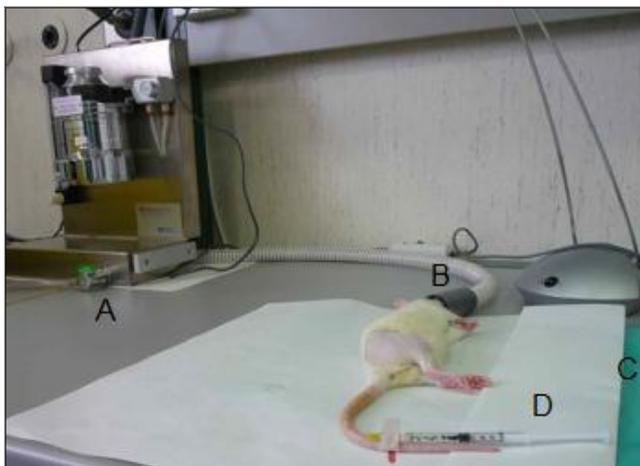


Figura 22: Elementos necesarios para la anestesia general de la rata. (A) Dispositivo de almacenamiento de anestesia inhalada, (B) mascarilla de aporte de oxígeno e Isoflurano, (C). Manta térmica y (D) catéter endovenoso.

Al finalizar la intervención, se procedió a la reanimación del animal utilizando atipamezol (Antisedan® Pfizer) intramuscular a dosis de 0,1 mg/Kg. y un bolo de infusión lenta de suero salino fisiológico al 5% a dosis de 10ml/Kg.

3.3.2. La técnica quirúrgica.

Una vez anestesiada, se preparó el campo quirúrgico, rasurando y lavando la pata trasera derecha (por protocolo), se pintó con una solución de povidona yodada y se cubrió con un paño estéril, dejando libre la extremidad a intervenir, la vía aérea y el catéter endovenoso. Posteriormente se utilizó la vía de abordaje lateral para la osteotomía diafisaria de fémur (Figuras 23A y 23B).

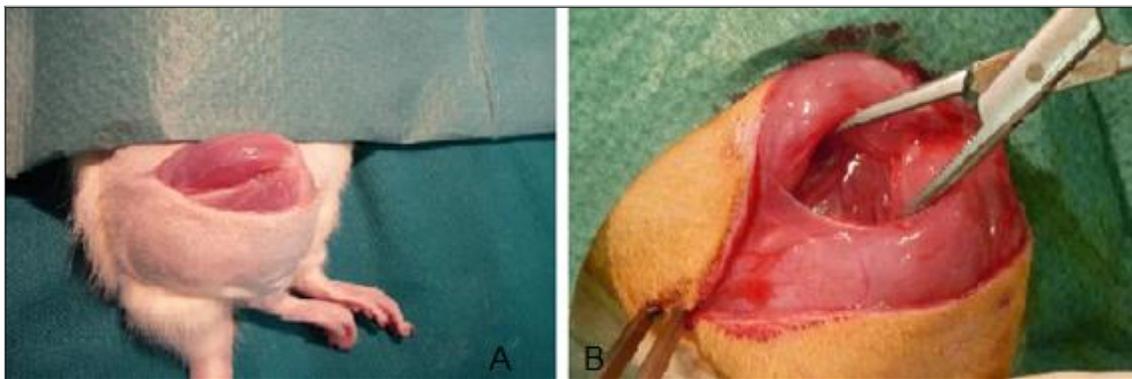


Figura 23: (A) Incisión longitudinal a nivel lateral del muslo para la exposición de la diáfisis. (B) La disección debe ser roma para evitar excesivo sangrado.

Una vez hemos localizado el punto donde realizaremos la osteotomía, comenzamos con la vía que nos permitirá introducir el tornillo que la estabilizará. Para ello se realiza el abordaje a la rodilla, accediendo a los cóndilos femorales del animal por vía parapatelar medial; esto permitirá una luxación segura del aparato extensor hacia el lado externo (Figuras 24A y 24B).



Figura 24: (A) Incisión pararrotuliana medial. (B) Aspecto de la escotadura intercondílea una vez realizado el abordaje medial a la rodilla con luxación externa de la rótula.

Se localiza el punto de entrada del tornillo (zona intercondílea) y se perfora la cortical hasta entrar en el canal endomedular. Este punto es crítico ya que la tendencia es a centrar el orificio en la escotadura intercondílea y por la morfología del hueso (Figura 19) desde ahí no se accede bien al canal. Lo ideal es hacer un poco más superior el punto de entrada, de ese modo accedemos perfectamente al canal (Figuras 25A y 25B).

Para perforar esta cortical y entrar al canal utilizaremos una broca de 1,1 mm de diámetro y 22 mm de longitud (Figura 25B). Cuando terminamos de fresar el canal, se avellanó la entrada con un avellanador de 1,5 mm y antes de proceder a la osteotomía, introdujimos el tornillo en el canal de forma parcial. Este gesto limita el sangrado de la rata y nos indica la dirección que sigue el fémur de manera más exacta. Una vez realizado este pequeño acto pudimos a realizar la osteotomía.

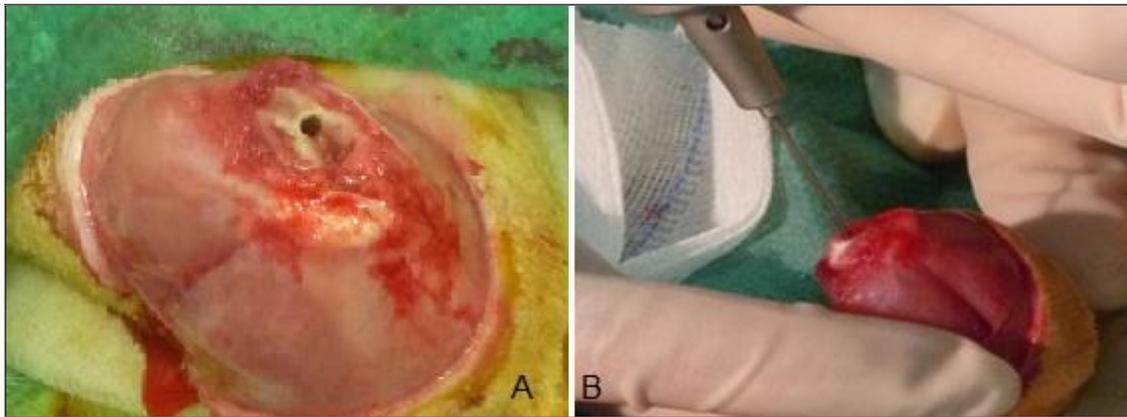


Figura 25: (A) Punto de entrada al canal endomedular ya avellanado; para ello utilizaremos el avellanador de 1.5mm. (B) Detalle del fresado endomedular.

Para realizar la osteotomía se utilizó una mini-sierra oscilante de 5,5 mm de longitud. Hicimos un primer corte a 1 cm de la articulación, a nivel medio-diafisario, donde el fémur de la rata tiene una forma cilíndrica. A partir de este punto la técnica varió ligeramente según el subgrupo al que pertenece la rata:

- En el grupo A1 o grupo de fractura sin osteotomía se realiza un único corte a 1 cm de la articulación.
- En los grupos A2 y B se procede a realizar un segundo corte, a 2 mm del realizado con anterioridad, de tal manera que se talla y extrae un cilindro de 2 mm de anchura, osteotomía de sustracción (Figuras 26A y 26B).

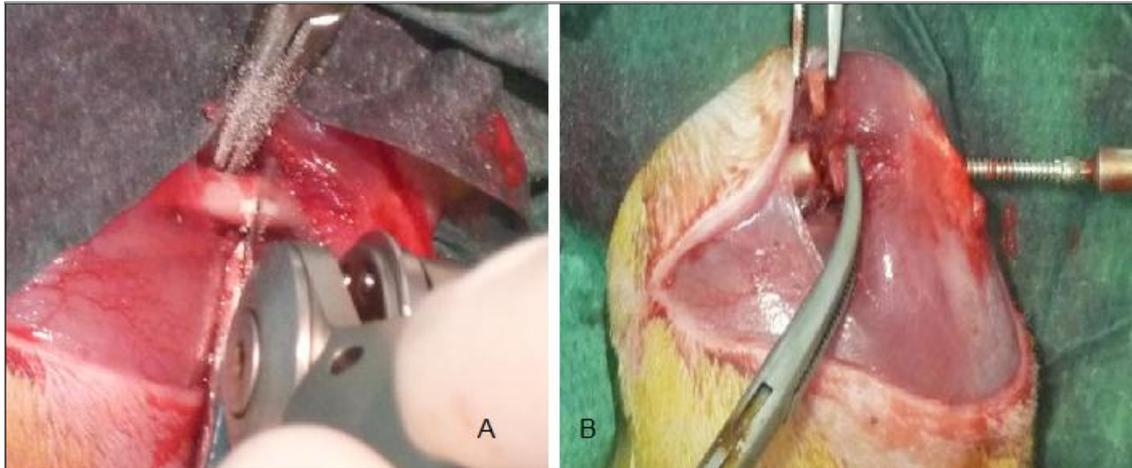


Figura 26: (A) Detalle del nivel de la osteotomía. (B) Realización de osteotomía de sustracción a nivel metafiso-diafisario femoral

En los otros dos grupos se procede a completar la inserción del tornillo. Este es un tornillo de 2mm de diámetro y 24mm de longitud al cual se le ha limado toda la parte de la cabeza que es innecesaria para la presa del destornillador, disminuyendo el perfil de la misma para evitar los problemas derivados del punto de entrada.

La inserción completa del tornillo es el paso más crítico de la intervención. Si no se realiza correctamente, la extremidad de la rata puede quedar malrotada y en consecuencia alterar los resultados, pues la carga no se realiza de la misma forma. Además sin la ayuda de un segundo cirujano es difícil mantener el defecto cilíndrico de 2 mm en los casos de los grupos A2 y B. Por eso mientras el cirujano introduce el tornillo, el ayudante sujetará con dos pinzas los extremos de la osteotomía al tiempo que controla que el *gap* sea de 2 mm ayudándose de otro tornillo de 2 mm, parcialmente interpuesto en forma de cuña (Figura 27A, 27B y 27C).



Figura 27: (A-B) Imágenes de la sujeción de los extremos de la osteotomía para evitar malrotaciones. (C) Detalle del "gap" de fractura (2mm).

Para todo el procedimiento de fresado u osteotomizado utilizamos el motor Hall® MicroPower™ de Linvatec-Conmed™. El equipo consta de una consola eléctrica modelo E9000 y dos terminales (el de la osteotomía es el motor Micro Power Medium Sagital Saw™ y el del fresado el motor Micro Power Speed Drill™).

Una vez comprobamos que el implante no interfiría en la movilidad de la rodilla y que la alineación del fémur era la correcta, nos aseguramos de que el defecto óseo creado era estable, es decir que el tornillo impide el colapso. Tras confirmar todo lo anteriormente expuesto se lavó el lecho con abundante suero salino fisiológico y se cerraron las incisiones con una sutura continua con DEXON® de 2.0 (Covidien, Mansfield, Massachusetts, U.S.A), tanto en planos profundos como en piel. Posteriormente se volvió a limpiar la herida con suero y se aplicó povidona yodada (Betadine® PurduePharma, LP, Connecticut, U.S.A) (Figuras 28A y 28B).

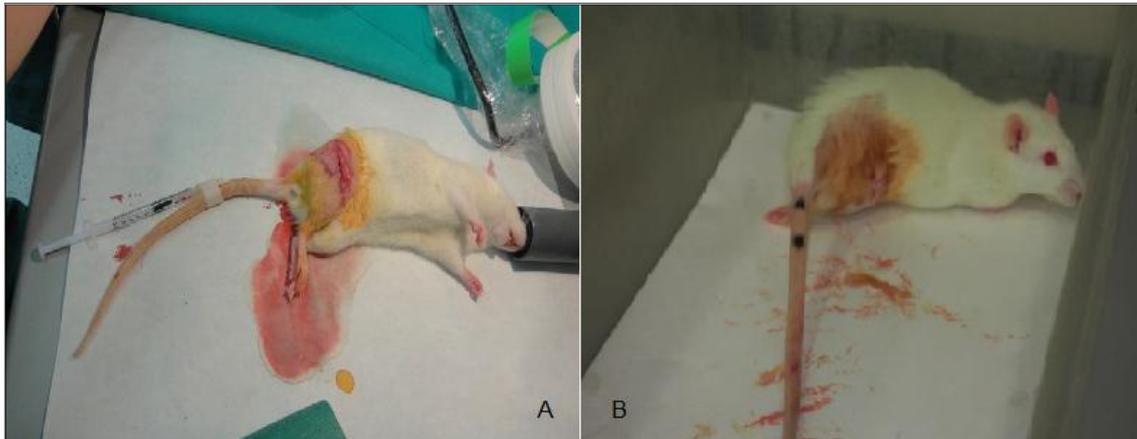


Figura 28: (A) Lavado con abundante suero salino fisiológico y cierre por planos de las heridas quirúrgicas. (B) Sujeto perteneciente al estudio, se puede ver como desde el primer momento intenta la carga con la extremidad operada.

3.4. Metodología de la extracción de muestras.

Al cumplir las 12 semanas de la intervención, el veterinario anestesiaba a los animales con una mezcla, por vía subcutánea, de ketamina (Pfizer®, Alcobendas, Madrid, España) a dosis de 7,5 mg/Kg y medetomidina (Domtor-Pfizer®, Alcobendas, Madrid, España) a dosis de 1 mg/Kg.

Una vez inconscientes, se procedía a la eutanasia del animal por inhalación de dióxido de carbono en una cámara especial.

Con el animal muerto procedíamos a la extracción del fémur intervenido y del contralateral. En el caso del intervenido, una vez extraído se debía quitar el

tornillo que utilizamos para mantener el foco estabilizado, con cuidado de no dañar el foco de pseudoartrosis. Para ello un ayudante cogía con dos pinzas los extremos del fémur, mientras el cirujano extraía el tornillo, evitando las rotaciones que pudieran dañar el tejido a estudio.

Una vez extraído el tornillo, se trasladaba cada muestra al laboratorio de destino correspondiente en el medio de conservación adecuado para los diferentes estudios.

3.5. Metodología del análisis histológico.

Tras el sacrificio de los animales, a las 12 semanas se realizó el análisis histológico.

El primer lugar se procedió a la fijación y decalcificación de las muestras. En nuestro caso la fijación se realizó con formol neutro al 10% y la decalcificación con DECAL®. Cuando la muestra estaba decalcificada, se procedía a la inclusión en parafina, tras lo cual se realizaban los cortes con el micrótopo (5 micras de grosor). Cada corte se introdujo en un baño de agua destilada (a 40°C aproximadamente), posteriormente se recogió con un portaobjetos y se tiñó, en nuestro caso con Tricrómico de Masson o con Hematoxilina-eosina. El resultado de todo este proceso se protege con un cubre-objetos que permite su posterior observación con el microscopio óptico.

Según la tinción aplicada, veremos unas u otras estructuras con más claridad en la muestra. En las muestras teñidas con hematoxilina-eosina podremos valorar el callo óseo formado entre los fragmentos de la fractura, la cantidad de osteoide y los condrocitos. En las muestras teñidas con Tricrómico de Masson se puede objetivar con mayor claridad la cantidad de fibrosis interfragmentaria que pueda existir.

Para homogeneizarlas regiones a analizar, se tomaron varios cortes de cada muestra eligiendo siempre los más centrales de la pieza, así se observa con claridad el foco de la pseudoartrosis.

La categorización de cada muestra se realizó tras observar todas las muestras obtenidas de cada animal con ambas tinciones. Esta categorización la realizó un experto en Anatomía Patológica desconocedor del grupo al que pertenecía el animal. Así mismo, evaluó las muestras empleando la escala de graduación histológica de Allen (188). Esta clasificación valora de 0 a 6 el grado de consolidación basándose en la histología (Tabla 2).

TABLA 2: Clasificación de Allen	
Grado de consolidación	Características histológicas.
Grado 1	Pseudoartrosis: Tejido fibroso interfragmentario.
Grado 2	Unión incompleta: Tejido fibroso y cartilaginoso.
Grado 3	Unión completa con tejido cartilaginoso.
Grado 4	Unión ósea incompleta con áreas de osificación: Cantidad equivalente de cartílago y hueso trabecular.
Grado 5	Unión ósea incompleta con predominancia de células óseas.
Grado 6	Consolidación ósea completa: Hueso entre ambos fragmentos óseos.

Tabla 2: Test de consolidación histológica de Allen. Fuente: Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. Acta orthopaedica Scandinavica. 1980;51(4):595-600.

3.6. Metodología de la evaluación radiológica

3.6.1. Realización de los controles radiográficos.

Para poder evaluar y comparar cada muestra de forma radiográfica es esencial obtener unas buenas proyecciones del fémur. Esto supone dos problemas importantes, el primero es colocar siempre de la misma manera a la rata para que la proyección sea comparable y el segundo que la rata esté inmóvil. Por ese motivo se debe anestésiar a la rata para la realización de cada estudio radiográfico (según pauta expuesta en el apartado anterior).

Para decidir la proyección óptima (AP y lateral), ensayamos con anterioridad varias posiciones en las que poner a la rata. La proyección lateral no supuso ningún problema; para obtenerla bastó con colocar a la rata en decúbito supino con la pata extendida sobre el transductor. La propia anatomía de la rata hace que la pata se coloque lateral al transductor de forma natural. Para obtener la proyección antero-posterior; colocamos a la rata semisentada, sujetando la pata operada en extensión para obtener la proyección deseada al tiempo que las extremidades delanteras se fijaron para que permitieran el paso del tubo de rayos X que emite la radiación desde la parte superior.

El aparato utilizado para la radiología fue el CCX digital® de TrophyTrexGroup™. Este aparato tiene un transductor de rayos X muy

pequeño, lo que facilitó el manejo. Las imágenes radiográficas se procesaron con el programa informático de la misma casa comercial.

3.6.2. Valoración de las imágenes radiológicas.

Para valorar la evolución de la consolidación se realizaron radiografías a los 7 días y a las 6 y 12 semanas. Por ese motivo cada rata tiene 6 controles radiográficos (dos proyecciones de cada control).

La valoración de la consolidación radiográfica se realizó por dos observadores independientes. Para valorar el grado de consolidación se utilizó una escala de graduación basada en el número de corticales que hay en las dos proyecciones de cada estudio (188). La graduación sigue el esquema de la tabla 3.

TABLA 3: Clasificación de consolidación radiológica	
Grado consolidación	Número corticales
Grado 0	Ninguna cortical. (Pseudoartrosis atrófica).
Grado 1	1 cortical (Retardo de consolidación).
Grado 2	2 corticales (Retardo de consolidación).
Grado 3	3 corticales (consolidación).
Grado 4	4 corticales (consolidación).

Tabla 3: Escala de graduación para la valoración radiológica de la consolidación.

Como se puede observar en la tabla 3, consideraremos que ha consolidado si se ven 3 ó 4 corticales en las radiografías; si hay 1 ó 2 corticales se considerará que existe retardo de la consolidación (cuando se esperaría que la fractura estuviera consolidada) y si no se objetiva ninguna cortical se considerará que existe una pseudoartrosis.

Estas radiografías se analizaron por observadores que no conocían el tratamiento al que se había sometido a los animales de experimentación.

Las figuras 29 (A-F) son ejemplos de los controles radiográficos tomados a uno de los animales de experimentación y la puntuación que el observador le otorgó.

En este caso de ejemplo el observador dio una puntuación de 0 en las radiografías de control postoperatorio (A-B), a las que se realizaron a las 6 semanas les dio una puntuación de 1 (C-D) mientras que a las imágenes referentes a las 12 semanas de evolución les dio una puntuación de 4, considerando como consolidado el defecto óseo creado artificialmente.

Aunque la gradación de la consolidación según el número de corticales objetivadas es un método que ha demostrado ser reproducible, también se realizó la medición la longitud del defecto óseo a nivel de la pseudoartrosis, con el fin de evaluar la reproductibilidad del modelo de experimentación.

Esta medición se realizó, sobre todas las proyecciones radiográficas laterales obtenidas a los 7 días de tratamiento, con el programa informático AutoCAD LT®. Tomando como referencia el diámetro del tornillo (que sabíamos que era exactamente de 2 mm).

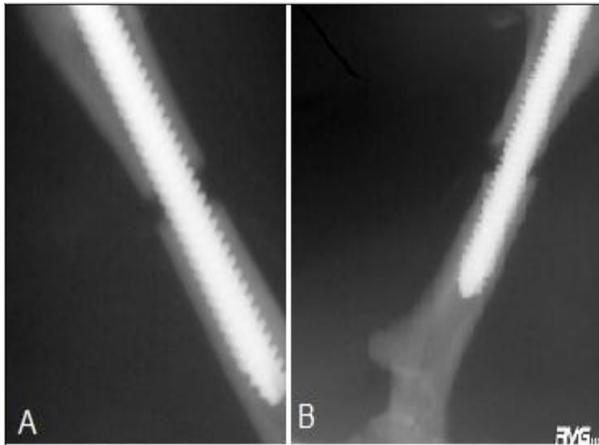


Figura 29(A-B): Controles radiográficos postoperatorios; visiones antero-posterior y lateral respectivamente, pertenecientes a uno de los animales a estudio. Como se puede comprobar el tornillo cumple su función a la perfección, es decir mantiene el gap de pseudoartrosis correctamente.

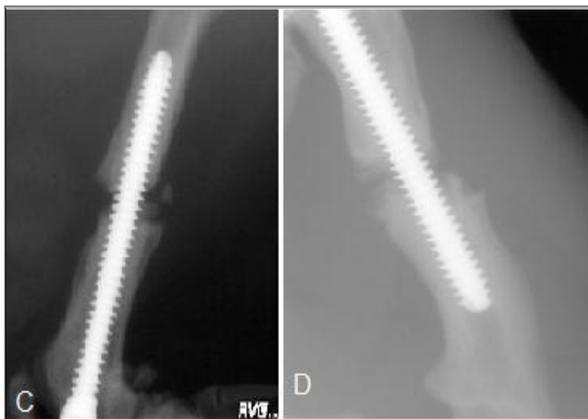


Figura 29(C-D): Controles radiográficos a las 6 semanas; visiones antero-posterior y lateral respectivamente, pertenecientes a uno de los animales estudiados.

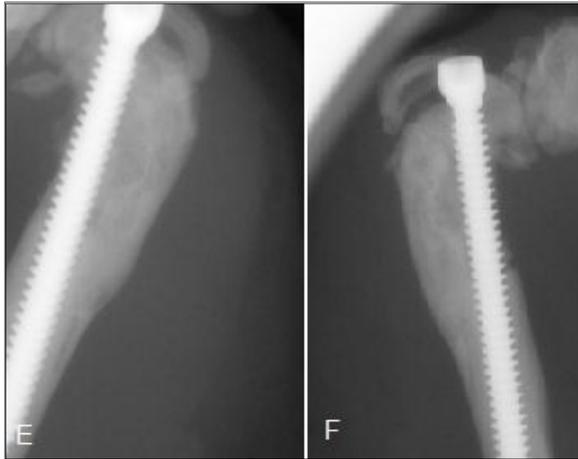


Figura 29(E-F): Controles radiográficos a las 12 semanas; visiones antero-posterior y lateral respectivamente, pertenecientes a uno de los animales estudiados.

3.7. Metodología del análisis biomecánico.

Para la realización de los estudios biomecánicos, contamos con el apoyo del Laboratorio de Ciencias de los Materiales (LADICIM) de la Universidad de Cantabria. En este análisis se estudiaron tanto los fémures derechos como los izquierdos.

Se sometieron a estudio 14 de los animales. Las muestras se mantuvieron en una nevera a temperatura de 4°C sumergidas en suero fisiológico, analizándose en un periodo nunca superior a 24 horas, evitando así la degradación de las muestras.

El análisis biomecánico realizado incluía dos tipos de estudios diferentes, microindentación y ensayo de flexión en cuatro puntos. Se utilizó la diáfisis para el ensayo de flexión máxima y las epífisis distales y proximales para los ensayos de microindentación (Figura 30).



Figura 30: Muestra para los estudios biomecánicos; división de las epífisis para estudio de micro-indentación y de la diáfisis los ensayos de máxima flexión en cuatro puntos.

Los investigadores de LADICIM no tenían conocimiento del tratamiento seguido por cada animal de experimentación; esa información solo fue proporcionada una vez finalizados los ensayos.

3.7.1. Ensayo de flexión en cuatro puntos.

Como ya se ha comentado, para este ensayo se utilizó la diáfisis de los fémures extraídos, tanto operados como no operados. Por tanto contamos con una muestra de 24 fémures.

La metodología del ensayo fue la siguiente:

1. Realización del ensayo en un depósito de metacrilato, la muestra está sumergida en suero salino fisiológico a una temperatura estable de 38°C, dentro de ese depósito.
2. Colocación de la diáfisis apoyada, en los extremos, sobre dos cilindros fijos separados a una distancia de 15mm.
3. Aplicación de una velocidad constante sobre dos puntos separados (5 mm.) en la sección centro-luz del hueso con un vástago móvil (Figura 31A y 31B).
4. Incremento de la fuerza aplicada por el vástago, de manera progresiva, hasta que el hueso se fracture.
5. Registro de una gráfica en la que se recoja la fuerza que se aplica sobre la diáfisis y el desplazamiento provocado por dicha fuerza.

Los resultados de este experimento se expresan mediante la fuerza máxima ($F_{m\acute{a}x}$) que soporta el hueso antes de fracturarse y la energía máxima ($E_{m\acute{a}x}$) absorbida hasta ese momento.

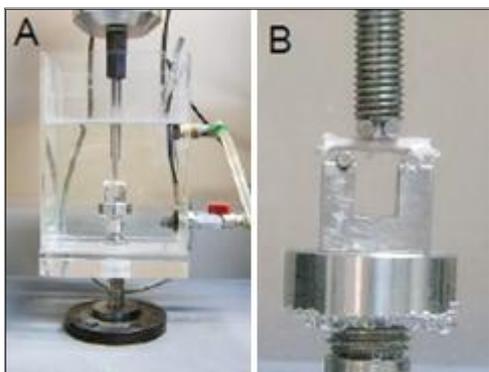


Figura 31: (A) Montaje completo del ensayo en cuatro puntos. (B) Detalle de la diáfisis apoyada sobre los cilindros.

3.7.2. Ensayos de microindentación.

Como ya se ha comentado, para este ensayo se utilizaron las epífisis de los fémures extraídos, tanto operados como no operados. Para evitar que los datos obtenidos de la zona del “gap de pseudoartrosis/fractura” pudieran alterarse, decidimos no separar la epífisis distal del fémur operado. Por tanto contamos con un total de 36 muestras para este estudio.

Los ensayos de microindentación se realizaron con el ultramicroindentador DUH-211 Shimadzu®, con indentador piramidal tipo Berkovich. Para que las muestras obtenidas se puedan ensayar deben ser incluidas en un cilindro de resina acrílica; en nuestro caso se utilizó una de dos componentes: Viafixliquid y ViafixPowder de Struers® que se cura y endurece en frío lo cual no afecta a las propiedades del hueso. Posteriormente deben pulirse para poder ser ensayadas en el microindentador (Figura 32A y 32B).

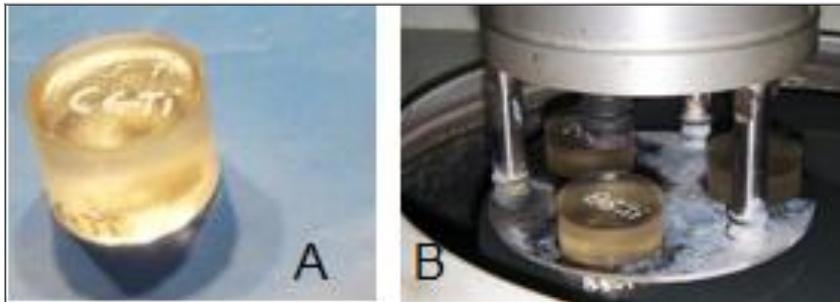


Figura 32: (A) Cilindro de resina en el que queda incluida la muestra para el estudio de microindentación. (B) Pulidora de los cilindros para estudio.

Una vez que las muestras están listas se almacenan en una nevera a 5°C cubiertas por un paño humedecido en suero salino fisiológico con el objetivo de evitar su desecación. Cuando se va a proceder al ensayo, se introducen en una cubeta termostática hasta alcanzar los 37°C.

De cada muestra se realizan un mínimo de 14 ensayos en cortical y 14 en tejido esponjoso. Como se describió anteriormente, cada ensayo nos da una cifra determinada de dureza que está relacionada con la huella que deja el indentador sobre la superficie del material ensayado. En el anexo 3 se recogen los resultados de cada una de estas pruebas.

3.8. Metodología del análisis molecular.

Tras la eutanasia del animal, procedimos a la extracción de los fémures intervenidos (derechos). Tras la extracción del tornillo endomedular cortaremos con la minisierra el hueso innecesario tomando 0,5cm de hueso sano por encima y debajo de la zona a estudio.

La muestra obtenida se mete en un tubo de ensayo y se congela con nitrógeno líquido a -196°C para ser transportado al laboratorio donde permanecerán a -80°C hasta el procesado.

Lo primero que se debe realizar es triturar la muestra; para lograrlo se vuelve a enfriar la muestra a -196°C , lo que produce la cristalización y lo hace más fácil. Este triturado se mezcla posteriormente con 2 ml. de Trizol®. Tras enfriar la muestra en hielo, se centrifuga a 4000 rpm. 10 minutos y recogemos el sobrenadante. Siguiendo el protocolo del fabricante, se añaden 200 μl . de cloroformo por cada ml de Trizol®, se agita manualmente y se deja reposar 10 minutos. A continuación se vuelve a centrifugar a 13000 rpm. durante 15 minutos, todo esto a 4°C de temperatura.

De este proceso se obtendrán 3 fases, la que está en la parte superior del tubo y es más clara es la fase que nos interesa; en este paso es importante tener mucho cuidado a la hora de su extracción para evitar contaminaciones con las otras dos fases.

Esta fase extraída se mezcla con la misma cantidad de isopropanol a -70°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifuga la muestra a 13200 rpm. durante 10 minutos, nuevamente a 4°C obteniendo 2 fases.

De las 2 fases obtenidas eliminamos el sobrenadante y se procesa el precipitado. Se lava con etanol al 80% frío, se mezcla y se vuelve a centrifugar a 7500 rpm. durante 5 minutos a la misma temperatura que en fases anteriores. Retiramos el sobrenadante y se deja secar dentro de la campana extractora.

Una vez evaporados los restos de etanol se rehidrata la muestra con 20 μl . de agua libre de RNasa y se purifica con RNeasy® Mini Elute® Cleanup Kit (Qiagen™). El resultado final de todo este proceso es la obtención de RNAm del hueso del animal de experimentación. Para comprobar la calidad sometimos la muestra a un examen de integridad, por electroforesis en gel de agarosa, en el que deben aparecer las bandas 18s y 28s.

El paso siguiente es cuantificarlo; para ello utilizaremos un espectrómetro que medirá la absorbancia de luz de las sustancias en función de la longitud de

onda utilizada. Este paso es necesario para comenzar la retro-transcripción y la PCR cuantitativa, siempre con la misma cantidad de muestra.

Para la retro-transcripción empleamos el preparado comercial Prime Script reagen Kit Perfect Real Time®. Se necesitarán 2µg de RNAm de cada muestra. El producto final de la retrotranscripción será el DNA complementario y por PCR cuantitativa en tiempo real seremos capaces de cuantificar la transcripción de los genes de interés. Para ello se utilizaron ensayos Taqman (Life Technologies) basados en la actividad exonucleasa de la TAq-polimerasa, así como amplímeros y sondas específicas para cada uno de los cDNAs. Los resultados se normalizaron cuantificando un gen constitutivo o “housekeeping”. A tal fin se determinaron los transcritos de TBP (TATA box binding protein) y se utilizó el método del $2^{-\Delta Ct}$.

Este estudio se realizó en una segunda fase con 12 ratas más (6 del grupo A2 y 6 del grupo B). Se les administró el tratamiento correspondiente durante 15 días y se estudiaron los femures intervenidos.

3.8.1. Genes analizados en este estudio.

Dada la inviabilidad de un estudio que abarque todos los genes implicados en la cascada de la consolidación, hemos seleccionado los más representativos de cada fase, que se describen brevemente a continuación.

RUNX2 (Factor de transcripción relacionado con runt): Pertenece a la familia RUNX y está localizado en el cromosoma 6, posición 6p21. Este gen es el responsable de la codificación de una proteína nuclear con un dominio ligando de ADN Runt. Esta proteína es una de las más importantes para la inducción de la diferenciación de los osteoblastos (41, 189).

WNT5A (Miembro 5^a de la familia de integración MMTV tipo Wingless): Pertenece a la familia Wnt y está localizado en el cromosoma 3, posición 3p21-p14. Es el responsable de la codificación de proteínas implicadas en procesos de embriogénesis, apoptosis u oncogénesis. A nivel óseo es una proteína cuya acción favorece la diferenciación de los osteoblastos (190).

SOX9 (Región determinante del sexo box-9): Pertenece a la familia de los ligandos de ADN (HMG-box) y está localizado en el cromosoma 17, posición 17q23. Este gen codifica una proteína que regula al gen de la hormona antimülleriana y al factor esteroideogénico 1 (191).

En cuanto al tema a tratar en el presente trabajo, juega un papel capital en la diferenciación de los condrocitos actuando como regulador del proceso (191).

COL1A1 (Colágeno tipo 1 α 1): Se localiza en el cromosoma 17, en posición 17q21.33. Codifica las cadenas de proteínas α 1 del colágeno tipo I. Este tipo de colágeno está presente en el tejido conectivo de múltiples zonas del organismo, como tendones y hueso. De hecho, es el constituyente principal de la matriz ósea. Su alteración puede dar lugar a enfermedades como la osteogénesis imperfecta o la osteoporosis idiopática (41, 192).

COL2A1 (Colágeno tipo 2 α 1): Se localiza en el cromosoma 12 en la posición 12q13.11. Codifica las cadenas de proteínas α 1 del colágeno tipo II. Este gen expresado por los condrocitos, es constituyente esencial del cartílago (41, 193).

BGLAP (Proteína ósea (gla) γ -carboxiglutamato): Se localiza en el cromosoma 1 en posición 1q22. Es el responsable de la codificación de la osteocalcina. Se encuentra sobre todo en la matriz extracelular ósea y en su forma carboxilada presenta alta afinidad por la hidroxapatita e iones calcio. Se secreta fundamentalmente durante la mineralización (194).

ALPL (Fosfatasa alcalina): Se localiza en el cromosoma 1 en posición 1p36.12. Es el responsable de la codificación de la proteína del mismo nombre, que consiste en una proteína de membrana glucosilada. Se expresa en condrocitos y osteoblastos. Degrada el pifosfato, un inhibidor de la mineralización de los tejidos (195).

RANKL (ligando de la superfamilia de factores de necrosis tumoral 11): Se localiza en el cromosoma 13 en posición 13q14. Es el ligando del receptor transmembrana RANK, mencionado en varias ocasiones a lo largo de este trabajo. Lo sintetizan los osteoblastos y, sobre todo, los osteocitos. La unión RANK-RANKL constituye los inductores más importantes de la diferenciación de los precursores osteoclastos (122, 127, 128).

OPG (Receptor de la superfamilia de factores de necrosis tumoral 11b y osteoprotegerina): Se localiza en el cromosoma 8 en posición 8q24. La proteína codificada se une competitivamente al RANKL impidiendo la formación del complejo RANK-RANKL; esto conduce a una disminución de la formación de osteoclastos (121, 127).

DKK1 (Inhibidor de la vía de señalización dckkopf 1): Se localiza en el cromosoma 10 en posición 10q11.2, expresándose mayoritariamente en osteoblastos y osteocitos. Este gen es responsable de la codificación de la proteína del mismo nombre que se une competitivamente al receptor de wnt impidiendo la unión de este último (130, 132, 196). Es por tanto un inhibidor muy potente de la vía Wnt, anteriormente descrita en este trabajo.

SOST (Esclerostina): Se localiza en el cromosoma 17, en posición 17q11.2. La proteína que codifica y que lleva su mismo nombre tiene como misión inhibir la vía Wnt- β -catenina. La producen los osteocitos (196).

COL10A1 (α 1 colágeno tipo 10): Se localiza en el cromosoma 6 en posición 6q21-q22. Esta proteína aparece en los condroblastos hipertrofiados, que aparecen en la osificación endocondral (197).

3.9. Metodología del estudio estadístico.

Para el análisis estadístico de todos los datos recogidos, utilizamos el programa SPSS ®.

Cuando las variables presentaban una distribución normal se analizaron con el test de la T de Student para muestras independientes. Para ello comprobamos previamente la normalidad de la variable con el estudio de bondad de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas utilizando el test de Levene. Si estas últimas no eran iguales optamos por el test de Wells.

Las variables que no seguían una distribución normal, se sometieron al análisis de las medias con el test paramétrico de Kruskal-Wallis siempre que se considerasen más de dos muestras y al test de la U de Mann Whitney cuando las comparaciones fueran entre dos medias.

El nivel de significación estadística empleado para todos los estudios fue del 5%, todos los análisis fueron de dos colas.

3.10. Consideraciones éticas del trabajo.

El modelo experimental se aprobó por el Comité de Ética en Investigación Animal de la Universidad de Cantabria el día 23 de Noviembre de 2009 y en el 2011. Este documento se puede consultar en el anexo 1.

Resultados.

Resultados.

Resultados.

Resultados.

4. Resultados.

En este apartado estudiaremos que influencia ha tenido el tratamiento del ranelato de estroncio sobre el modelo experimental de pseudoartrosis. Para ello, primero evaluaremos si el modelo experimental utilizado ha demostrado ser reproducible y efectivo comparando los resultados de los grupos A1 (fractura y suero) y los del A2 (osteotomía de sustracción y suero). Tras demostrar su validez, compararemos los grupos A1 y A2 con el grupo B (osteotomía de sustracción y tratamiento con ranelato de estroncio).

4.1. Evaluación y complicaciones del modelo experimental.

4.1.1. Estudio piloto para el establecimiento del modelo experimental.

Dado que para la realización del estudio era necesario el establecimiento de un modelo de pseudoartrosis que presentase un defecto óseo mantenido en el tiempo, se procedió al diseño del mismo. Realizamos un estudio piloto diseñando la vía de abordaje más conveniente y utilizando diferentes técnicas que sirvieran para mantener el gap.

Tras diseñar la vía de abordaje menos lesiva para el ejemplar, realizamos la cirugía del modelo de pseudoartrosis en 7 ratas. El único problema reseñable fue el exitus del primer animal debido al desajuste analgésico tras la cirugía. Una vez solucionado este problema los demás ejemplares sobrevivieron y deambularon sin más complicaciones.

Una vez establecimos el modelo y éste fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Animal de la Universidad de Cantabria (ver anexo 1), empleamos a los animales de este estudio para realizar estudios radiológicos, histológicos, biomecánicos y genéticos que se llevarían a cabo en el estudio definitivo; de esta manera la curva de aprendizaje se hace previamente evitando así posibles sesgos.

Aunque no se trata de una complicación del modelo de pseudoartrosis en sí mismo, merece la pena comentar que al realizar el estudio genético sobre los fémures de 5 de los ejemplares, no se pudo extraer ARN de buena calidad por problemas técnicos, por lo que se desestimaron los resultados. Debido a esto realizamos una segunda fase en la que incluimos 12 ejemplares más para este cometido.

4.1.2. Análisis de las complicaciones.

La cirugía realizada, es laboriosa y no exenta de complicaciones; debe realizarse meticulosamente y el defecto óseo debe ser estable; 7 animales fueron retirados del estudio por complicaciones mayores:

- Fracturas intraoperatorias que imposibilitaban el mantenimiento del *gap* (n=4).
- Extrusión del tornillo que hizo que el *gap* se colapsase (n=2).
- Exitus (n=1): Un ejemplar del grupo B falleció a las 11 semanas a causa de una lesión gástrica, demostrada en el análisis necrópsico. Esta lesión fue atribuida al sondaje para la administración del fármaco.

Estas complicaciones mayores hacen que el estudio comenzase con un total de 38 ejemplares. Aunque estos últimos ya no presentaron complicaciones mayores, si es cierto que durante la cirugía presentaron alguna que otra complicación menor relatadas en la tabla 4:

Ejemplar	Complicaciones
A1F2g-h	Sección parcial del tendón rotuliano (suturado)
A1F2h	Falsa vía en el punto de entrada (corregida)
A1F2b	Osteolisis metafisaria a las 12 semanas
A1F3g	Fisura cóndilo medial (no afectó al foco)
A1F3h	Fisura cóndilo lateral (no afectó al foco)
A1F4b	Fisura cóndilo medial (no afectó al foco)
A2F1g	Fisura cóndilo lateral (no afectó al foco)
A2F2b	Fisura cortical superior (no afectó al foco)
A2F4b	Fisura cortical superior (no afectó al foco)
F6A2F2gbis	Extrusión mínima del tornillo en el control rx de 12 semanas (se incluyó por mantener el <i>gap</i> y cumplimentación del periodo de seguimiento)
BF1h	Fisura cóndilo lateral (no afectó al foco)
BF2h	Fisura cóndilo medial (no afectó al foco)

Tabla 4: Relación de complicaciones menores que tuvieron lugar durante la cirugía de los animales y su posterior seguimiento.

Durante las 12 semanas de seguimiento de estos animales no registramos ningún tipo de infección, ni temprana, ni tardía. A excepción del exitus por el decúbito de la sonda, no registramos más problemas debidos a la administración del fármaco; por tanto podemos decir que, el ranelato de

estroncio en animales no ha presentado efectos secundarios. Establecer el modelo de pseudoartrosis es un proceso complejo y no exento de complicaciones; un 31% de las ratas a estudio sufrieron complicaciones menores. Aún así, todos los fueron capaces de iniciar la deambulaci3n y la carga inmediatamente despu3s de la cirug3a. Ello se tradujo en el aumento del peso progresivo a lo largo de las 12 semanas de tratamiento de todos los grupos.

4.1.3. Evaluaci3n del peso de los animales de experimentaci3n.

Una de las mejores formas de analizar el estado de salud en los animales de experimentaci3n es comprobar un aumento de peso progresivo durante el tiempo que dura el estudio. Por este motivo se procedi3 a la toma de peso semanal de nuestras ratas. Si analizamos con detenimiento las gr3ficas del anexo 2 objetivamos un aumento progresivo del peso.

En la tabla 5 presentada a continuaci3n se expone el peso medio y desviaci3n est3ndar preintervenci3n quir3rgica, a la semana de la cirug3a, a la 6^a semana y al final del estudio.

	PreIQ	Sem.1	Sem.6	Sem.12
A1	298 (21)	273 (18)	301 (23)	319 (25)
A2	306 (35)	283 (23)	315 (31)	335 (33)
B	306 (25)	283 (25)	312 (18)	324 (30)

Tabla 5: Peso medio y desviaci3n est3ndar (entre par3ntesis) por grupo de estudio preintervenci3n quir3rgica, a la primera semana, a mitad del tiempo de seguimiento y previo a la eutanasia.

Merece la pena destacar que en la primera semana se produjo un descenso medio del peso de 23 gramos. Si tenemos en cuenta que una cirug3a consistente en una osteotom3a con fresado endomedular y enclavado con un tornillo es una cirug3a muy agresiva, es comprensible que se produzca esta p3rdida de peso. No obstante, a partir de la segunda semana todos los animales comenzaron a ganar peso llegando a superar el peso inicial en 22,6 gramos al final del estudio. A continuaci3n se exponen estas ganancias de peso medio a lo largo de las 12 semanas en los tres grupos (Figura 33):

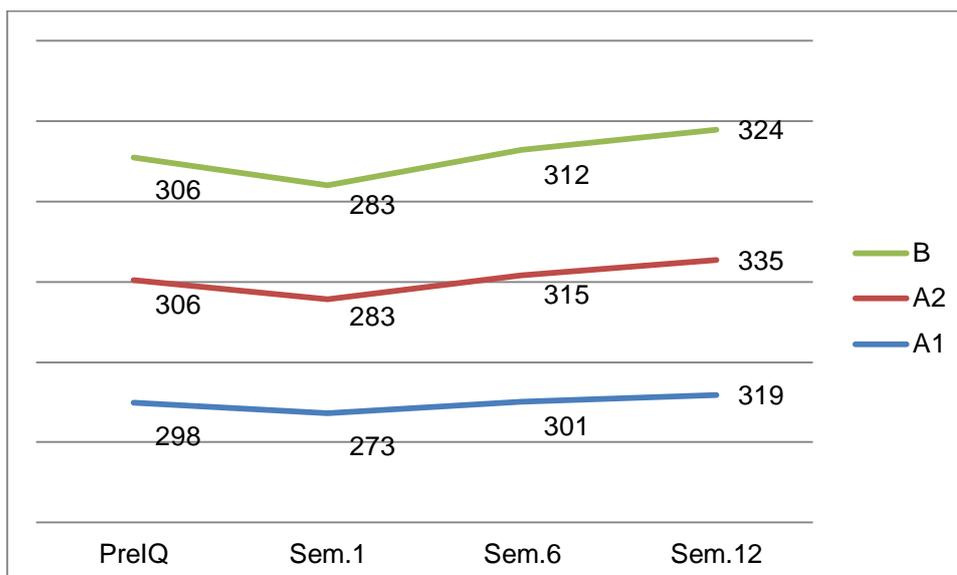


Figura 33: Evolución del peso medio de los tres grupos en estudio durante las 12 semanas de tratamiento.

4.2. Reproductibilidad del modelo de pseudoartrosis.

La dificultad más reseñable a la hora de hacer de nuestro modelo de pseudoartrosis un modelo reproducible es la capacidad de mantener el defecto óseo a lo largo del seguimiento. Tal y como se ha explicado en el apartado de material y métodos, realizábamos mediciones intraoperatorias para comprobar la homogeneidad del “gap” en los diferentes animales. En las tablas presentadas a continuación reflejamos las mediciones radiográficas realizadas del defecto óseo a los 7 días mediante autocad (Tablas 6, 7 y 8).

Animal	GAP
A1F1H	0,19
A1F1B	0,76
A1F2B	0,43
A1F2G	0,34
A1F2H	0
A1F3B	0
A1F3H	0,45
A1F4B	0,79
A1F4G	0,73
A1F4H	0,34

Tabla 6: Relación de ejemplares del grupo A1 (fractura y suero) y medida radiológica del gap correspondiente a la semana de la cirugía.

Animal	GAP
A2F1G	1,41
A2F1H	1,26
A2F1B	1,44
A2F2G-H	0,95
A2F2H	1,21
A2F2B	1,18
A2F3H	1,22
A2F3B	1,14
A2F4G	1,35
A2F4H	1,53

Tabla 7: Relación de ejemplares del grupo A2 (osteotomía y suero) y medida radiológica del gap correspondiente a la semana de la cirugía.

Animal	GAP
BF1g	1,02
BF1h	1,83
BF1b	1,96
BF2g-h	1,4
BF2h	1,86
BF2b	1,4
BF3h	1,63
BF3b	1,4
BF4g-h	1,18
BF4h	1,4
BF4b	1,46

Tabla 8: Relación de ejemplares del grupo B (osteotomía y Ranelato de Estroncio) y medida radiológica del gap correspondiente a la semana de la cirugía.

Llama la atención que aunque el *gap* medido en la cirugía era de 2mm (Figura 34), las mediciones hechas con el programa informático son menores; ésto es atribuido principalmente a que se realizan tras una semana de la cirugía y a que la medición del programa se realiza sólo en un plano.

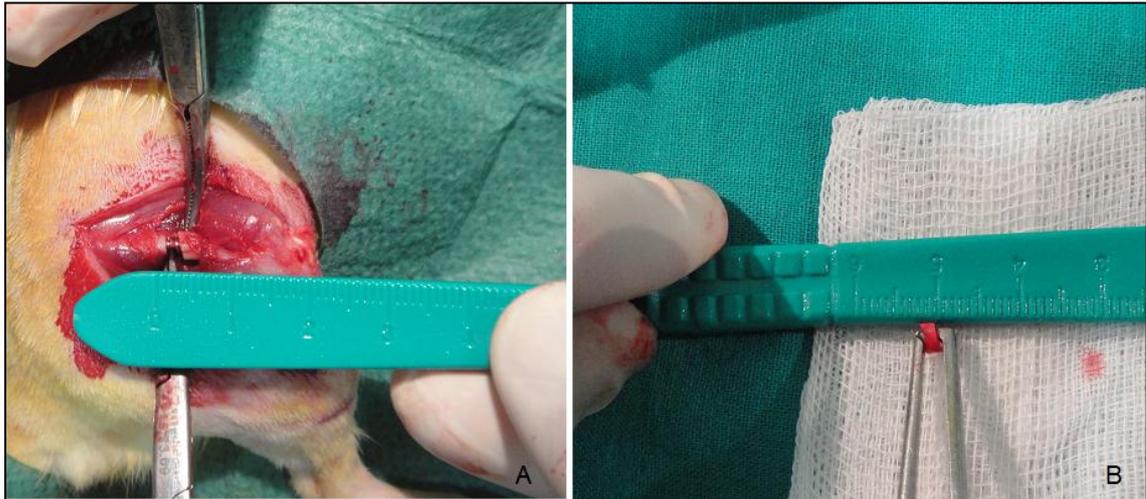


Figura 37 (A-B): Ejemplo de la medición clínica del defecto cilíndrico realizado.

Si observamos los datos reflejados en la figura 35, existe una diferencia notable del grupo A1 a los otros dos. Este hecho es de esperar dado que es el grupo de control de fractura. Si observamos las medias de los grupos A2 y B (Tabla 9) son similares.

Grupo	Media	Desviación típica
A1	0,40	0,29
A2	1,29	0,62
B	1,50	0,29

Tabla 9: Medias y desviaciones estándar del gap producido por grupos.

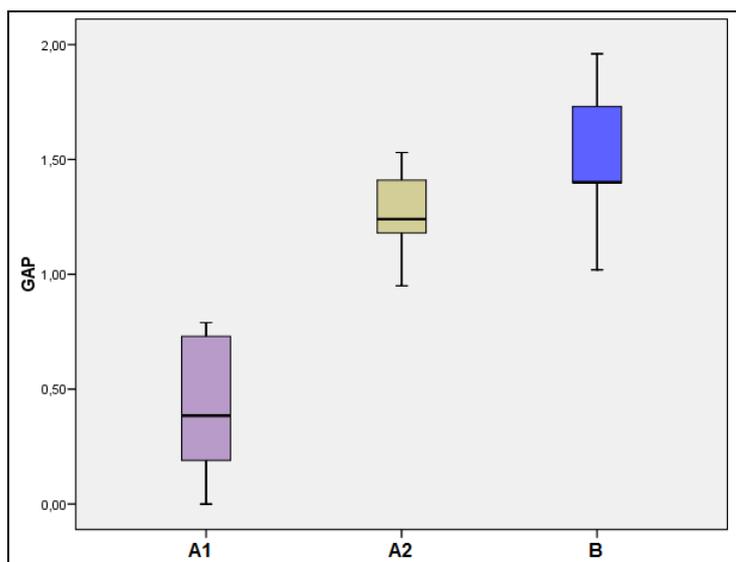


Figura 35: Representación gráfica de los datos obtenidos tras la medición del gap de fractura.

4.3. Resultados radiológicos.

Las ratas pertenecientes al estudio permanecieron estabuladas un total de 12 semanas, tiempo durante el cual se procedió a la realización de controles radiográficos. El primero se realizó a la semana de la cirugía, como se ha dicho, con el objetivo de asegurar que el implante endomedular presentara una implantación correcta. A la 6ª y 12ª semana se realizaron los controles radiográficos para evaluar la formación ósea.

Dado que las ratas pertenecientes a la segunda fase (estudio molecular) fueron sacrificadas a la 2ª semana, no fueron incluidas en este análisis radiográfico.

4.3.1. Puntuaciones radiográficas y la variabilidad interobservador.

Para valorar la consolidación en las radiografías, evaluamos el número de corticales que habían consolidado en cada control; por ello dos observadores, de forma independiente, analizaron las radiografías otorgando la correspondiente puntuación a cada ejemplar. A continuación se pueden observar los resultados obtenidos en las tablas 10, 11 y 12.

	Observador 1		Observador 2	
	6sem	12sem	6sem	12sem
A1F1g	1	3	1	2
A1F1h	4	5	3	5
A1F1b	1	2	2	4
A1F2g-h	1	4	0	3
A1F2h	0	4	0	4
A1F2b	2	2	1	2
A1F3g	1	3	1	4
A1F3h	0	2	0	2
A1F3b	2	3	2	4
A1F4g-h	2	3	2	3
A1F4h	2	4	2	4
A1F4b	1	4	2	4

Tabla 10: Puntuación otorgada por cada observador a los diferentes sujetos de experimentación del grupo A1.

	Observador 1		Observador 2	
	6sem	12sem	6sem	12sem
A2F1g	0	0	0	0
A2F1h	0	0	0	0
A2F1b	0	0	1	1
A2F2g-h	0	1	0	0
A2F2h	0	3	0	3
A2F2b	0	0	0	0
A2F3g	1	3	1	4
A2F3h	0	1	0	1
A2F3b	0	0	0	0
A2F4g-h	0	0	0	0
A2F4h	0	0	0	0
A2F4b	1	1	1	2
A2F5b-1	0	0	0	0
A2F5b-2	0	0	0	1
F6A2F2 gbis	0	0	0	0

Tabla 11: Puntuación otorgada por cada observador a los diferentes sujetos de experimentación del grupo A2.

	Observador 1		Observador 2	
	6sem	12sem	6sem	12sem
BF1g	1	1	1	2
BF1h	2	4	2	3
BF1b	2	4	2	4
BF2g-h	1	2	0	1
BF2h	0	2	0	2
BF2b	0	0	0	0
BF3h	0	1	0	0
BF3b	1	2	2	3
BF4g-h	0	1	0	2
BF4h	1	2	1	2
BF4b	1	1	2	2

Tabla 12: Puntuación otorgada por cada observador a los diferentes sujetos de experimentación del grupo B.

Para saber si las puntuaciones de los observadores son comparables entre sí hemos reagrupado el conjunto de puntuaciones y tal como se puede objetivar en las siguientes tablas (13-15) y sus correspondientes, las tendencias que siguen ambos observadores son muy similares.

	Observador 1				Observador 2			
	6sem		12sem		6sem		12sem	
	n	%	n	%	n	%	N	%
0	2	16.6	0	0	2	18.2	0	0
1	5	41.6	0	0	3	27.2	0	0
2	4	33.3	3	25	5	45.5	3	27.2
3	0	0	4	33.3	1	9	2	18.2
4	1	8.3	5	41.6	0	0	6	54.5

Tabla 13: Reagrupación de puntuaciones y porcentajes de cada observador para el grupo A1.

	Observador 1				Observador 2			
	6sem		12sem		6sem		12sem	
	n	%	n	%	n	%	N	%
0	13	86.6	10	66.6	11	78.5	9	64.28
1	2	13.3	3	20	3	21.4	3	21.4
2	0	0	0	0	0	0	1	7.14
3	0	0	2	13.3	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	1	7.14

Tabla 14: Reagrupación de puntuaciones y porcentajes de cada observador para el grupo A2.

	Observador 1				Observador 2			
	6sem		12sem		6sem		12sem	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
0	4	36.3	1	9.09	5	45.4	2	18.18
1	5	45.4	4	36.3	2	18.18	1	9.09
2	2	18.18	4	36.3	4	36.3	5	45.4
3	0	0	0	0	0	0	2	18.18
4	0	0	2	18.18	0	0	1	9.09

Tabla 15: Reagrupación de puntuaciones y porcentajes de cada observador para el grupo B.

Si analizamos estadísticamente la variabilidad interobservador mediante el coeficiente Kappa se obtienen las siguientes puntuaciones (Tablas 16 A-B):

	Valor
Medida de acuerdo Kappa 6 ^a semana	0.667
Medida de acuerdo Kappa 12 ^a semana	0.638

Tabla 16A: Resultados del Cálculo del coeficiente Kappa a la 6^a y 12^a semana.

Escala de interpretación de Fleiss para el Coeficiente Kappa	
<0	Acuerdo pobre
0-0.2	Una ligera coincidencia
0.21-0.4	Acuerdo justo
0.41-0.6	Acuerdo Moderado
0.61-0.8	Acuerdo satisfactorio
0.81-1	Acuerdo casi perfecto

Tabla 16B: Escala de interpretación de los valores obtenidos para el Coeficiente Kappa según Fleiss.

Siguiendo la escala de interpretación de Fleiss para los valores de Kappa (Tabla 16B), vemos como ambos resultados representan un acuerdo satisfactorio entre ambos observadores, haciendo que se pueda calcular el promedio de las puntuaciones otorgadas a cada radiografía.

4.4. Puntuaciones radiográficas y comparación de los resultados por grupos.

Como se comenta al final del apartado anterior, según la escala de Fleiss el acuerdo entre ambos observadores es satisfactorio. Por un lado, permite hallar el promedio de ambas puntuaciones obtenidas, facilitando su análisis y por otro lado indica la validez del estudio radiográfico pues dos observadores son capaces de otorgar puntuaciones comparables a las distintas radiografías sin tener conocimiento previo de cuáles son las puntuaciones otorgadas por el observador contrario.

En las siguientes tablas se expone el promedio de las puntuaciones otorgadas por ambos observadores (Tablas 17, 18 y 19):

Grupo A1	Rx 6sem	Rx 12sem	Complicación Rx
A1F1g	1	2.5	
A1F1h	3.5	5	
A1F1b	1.5	3	
A1F2g-h	0.5	3.5	
A1F2h	0	2	
A1F2b	1.5	2	Osteolisis metafisaria 12ª semana
A1F3g	1	3.5	Fisura cóndilo medial
A1F3h	0	2	Fisura lateral
A1F3b	2	3.5	
A1F4g-h	2	3	
A1F4h	2	4	
A1F4b	1.5	4	

Tabla 17: Puntuaciones radiográficas medias y complicaciones del grupo A1.

Grupo A2	Rx 6sem	Rx 12sem	Complicación Rx
A2F1g	0	0	Fractura cóndilo externo
A2F1h	0	0	
A2F1b	0.5	0.5	
A2F2g-h	0	0.5	
A2F2h	0	1.5	
A2F2b	0	0	Fisura cortical
A2F3g	1	3.5	
A2F3h	0	1	
A2F3b	0	0	
A2F4g-h	0	0	
A2F4h	0	0	
A2F4b	1	1.5	Fisura cortical
A2F5b-1	0	0	
A2F5b-2	0	0.5	
F6A2F2gbis	0	0	Extrusión tornillo 12 semana

Tabla 18: Puntuaciones radiográficas medias y complicaciones del grupo A2.

Grupo B	6sem	12sem	Complicación Rx
BF1g	1	1.5	
BF1h	2	3.5	Fisura cóndilo externo
BF1b	2	4	
BF2g-h	0.5	1.5	
BF2h	0	2	Fisura cóndilo externo
BF2b	0	0	
BF3h	0	0.5	
BF3b	1.5	2.5	
BF4g-h	0	1.5	
BF4h	1	2	
BF4b	1.5	1.5	

Tabla 19: Puntuaciones radiográficas medias y complicaciones del grupo B.

Para simplificar el análisis de estos datos reagrupamos las medias, según será un valor entre: 0-1, 1-2, 2-3 y 3-4. De este modo obtenemos los siguientes datos (Tablas 20, 21 y 22):

Grupo A1	0	1	2	3	4
6sem	3 (25%)	5 (41.6%)	3 (25%)	1 (8.3%)	0
12sem	0	0	4 (33.3%)	5 (41.6%)	3 (25%)

Tabla 20: Frecuencia de puntuaciones del grupo A1 a las 6 y 12 semanas de seguimiento.

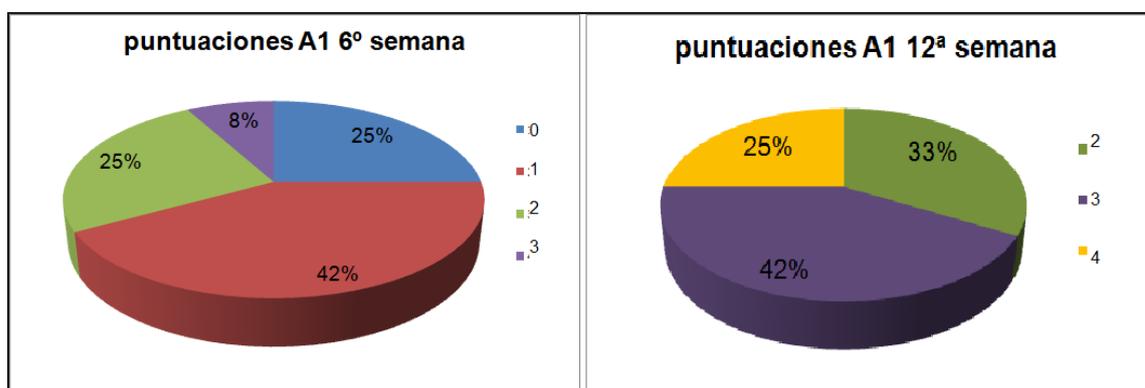


Figura 36: Representación gráfica de las puntuaciones radiográficas para el grupo A1.

Grupo A2	0	1	2	3	4
6sem	13 (86.6%)	2 (13.3%)	0	0	0
12sem	11 (73.3%)	3 (20%)	0	1 (6.6%)	0

Tabla 21: Frecuencia de puntuaciones del grupo A2 a las 6 y 12 semanas de seguimiento.

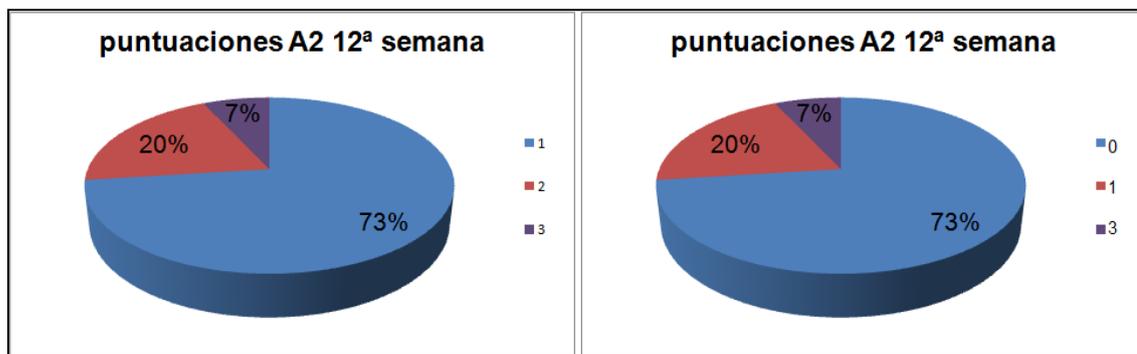


Figura 37: Representación gráfica de las puntuaciones radiográficas para el grupo A2.

Grupo B	0	1	2	3	4
6sem	5 (45.4%)	4 (36.3%)	2 (18.1%)	0	0
12sem	2 (18.1%)	4 (36.3%)	3 (27.2%)	1 (9.09%)	1 (9.09%)

Tabla 22: Frecuencia de puntuaciones del grupo B a las 6 y 12 semanas de seguimiento.

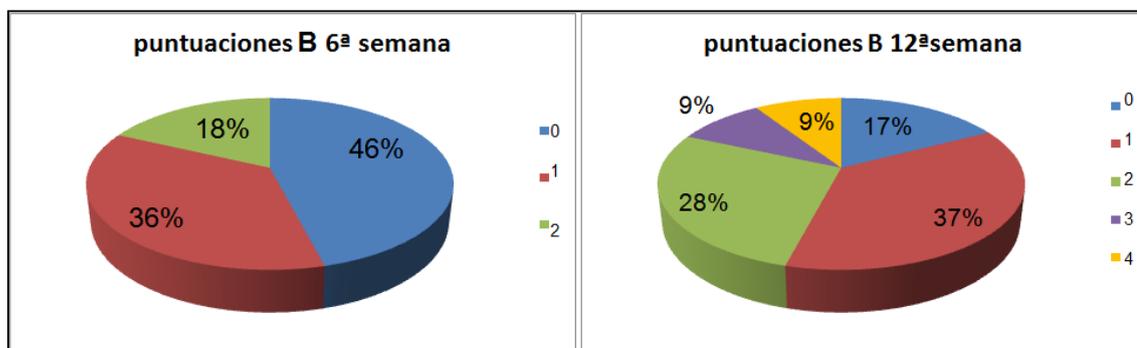


Figura 38: Representación gráfica de las puntuaciones radiográficas para el grupo B.

Si observamos las frecuencias del grupo A1 (grupo fractura y suero) podemos ver que a las 6 semanas de la cirugía un 66.6% de las puntuaciones se situaban entre 0 y 1. Sin embargo a las 12 semanas, el 100% de las puntuaciones estaban entre 2 y 4 considerándose consolidados un 66.6% de los animales (puntuaciones entre 3 y 4). Dado que el grupo A1 es el grupo control de fractura, es lógico que con el aumento del tiempo de evolución la consolidación aumente, más aun si tenemos en cuenta la gran facilidad que presentan los roedores para la consolidación.

En el caso del grupo A2 (grupo osteotomía y suero), la puntuación radiográfica a las 6 semanas es de 0 ó 1 en el 100% de los casos. A las 12 semanas sólo uno de los casos se clasifica como consolidado y el 93.3% restante permanece con una puntuación inferior a 1.

Como podemos observar en la figura 39, cuando comparamos los resultados del grupo A1 con los del grupo A2 se evidencian puntuaciones mucho más bajas para este último. Dado que este modelo estaba diseñado para reproducir una pseudoartrosis, la ausencia de signos radiográficos de consolidación sugiere la efectividad del modelo diseñado.

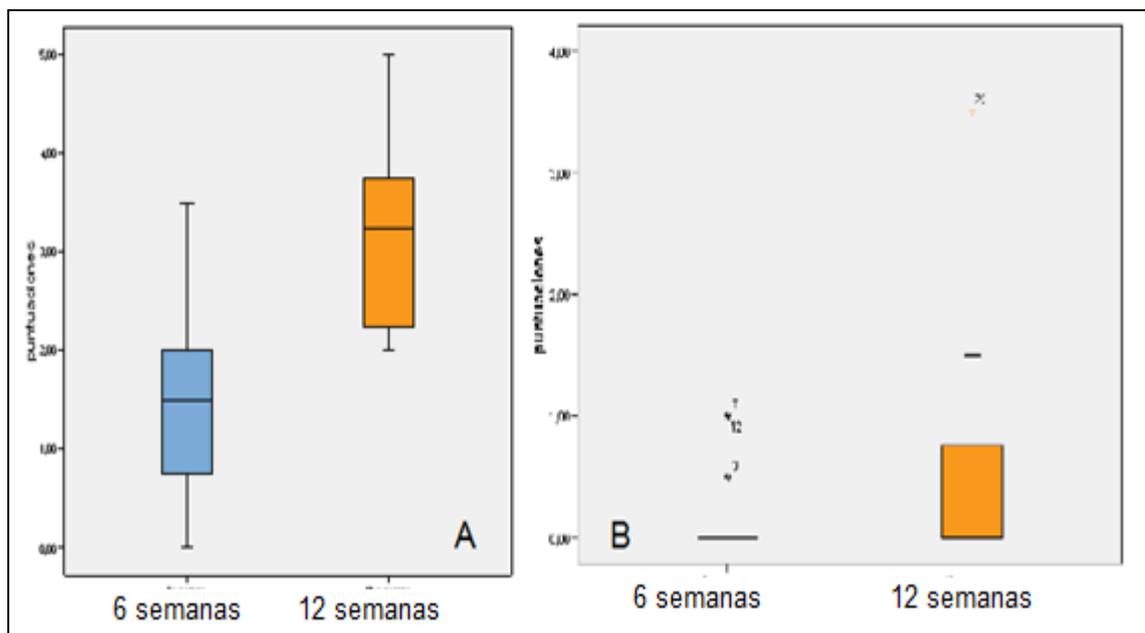


Figura 39: (A) Puntuaciones del grupo A1 a las 6 y a las 12 semanas. (B) Puntuaciones del grupo A2 a las 6 y a las 12 semanas.

Para el Grupo B o grupo tratamiento, la puntuación radiográfica entre 0 y 1 a las 6 semanas es de 81.7% mientras que a las 12 semanas esa tasa se había reducido hasta un 54.4%. Este descenso es muy llamativo, sobre todo a las 12 semanas de tratamiento. Si comparamos los resultados obtenidos en el grupo A2 y B (Figura 40) a las 6 y 12 semanas podemos ver que las puntuaciones asignadas son superiores en el grupo B o grupo osteotomía con administración de ranelato de Estroncio.

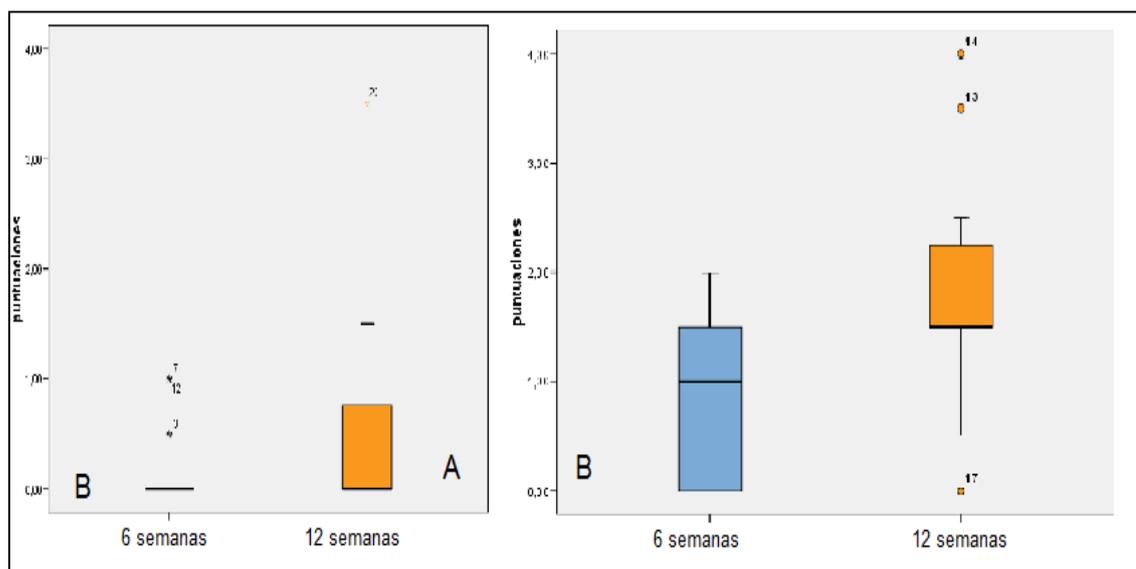


Figura 40:(A) Puntuaciones del grupo A2 a las 6 y a las 12 semanas. (B) Puntuaciones del grupo B a las 6 y a las 12 semanas.

Al analizar los valores medios y desviaciones típicas de los tres grupos a las 6 semanas de tratamiento (Tabla 23), se observa la superioridad de la puntuación radiológica de grupo A1 sobre los otros dos.

Grupo tratamiento	Media	Desviación típica
A1	1.5	0.92
A2	0.16	0.36
B	0.79	0.81

Tabla 23: Resultados de los valores radiológicos a las 6 semanas de tratamiento.

Si analizamos la diferencia de medias de las puntuaciones radiológicas obtenidas entre los distintos grupos de tratamiento a las 6 semanas son estadísticamente significativas (Tabla 24):

Comparativas	Resultado
A1-A2	$p= 0.001$
A2-B	$p= 0.047$

Tabla 24: Resultados estadísticos de la comparativa a las 6 semanas entre los grupos de tratamiento (dos a dos).

Las diferencia de medias de puntuación radiológica a las 6 semanas de tratamiento entre el grupo A1 y A2 son estadísticamente significativas; sin

embargo en el caso de la comparación entre el A2 y el grupo B (osteotomía y ranelato de estroncio) roza el límite de la significación estadística.

Analizando los resultados de los diferentes grupos a las 12 semanas (Tabla 25), vemos que la puntuación en la 6ª y en la 12ª semana del grupo A1 es superior respecto al grupo A2 y la variabilidad de ambos es muy similar. En cuanto al grupo B vemos un claro aumento en las puntuaciones.

Grupo tratamiento	Media	Desviación típica
A1	3.45	0.82
A2	0.70	1.13
B	1.87	1.11

Tabla 25: Resultados de los valores radiológicos a las 12 semanas de tratamiento.

A la 12ª semana la diferencia de medias para los resultados radiológicos de los dos grupos es estadísticamente significativa ($p= 0.001$); tras la realización del análisis estadístico entre los grupos, se obtienen los siguientes resultados (Tabla 26):

Comparativas	Resultado
A1-A2	$p= 0.001$
A2-B	$p= 0.006$

Tabla 26: Resultados estadísticos de la comparativa a las 12 semanas entre los grupos de tratamiento (dos a dos).

La comparación entre los resultados radiológicos de los grupos A1 y A2 (fractura a tratamiento con suero y osteotomía de sustracción a tratamiento con suero) y los grupos A2 y B (osteotomía a tratamiento con suero y osteotomía a tratamiento con ranelato de estroncio) a las 12 semanas, presentan unas diferencias estadísticamente significativas.

A continuación se presentan varias imágenes comparativas de los diferentes grupos (Figuras 41, 42 y 43):

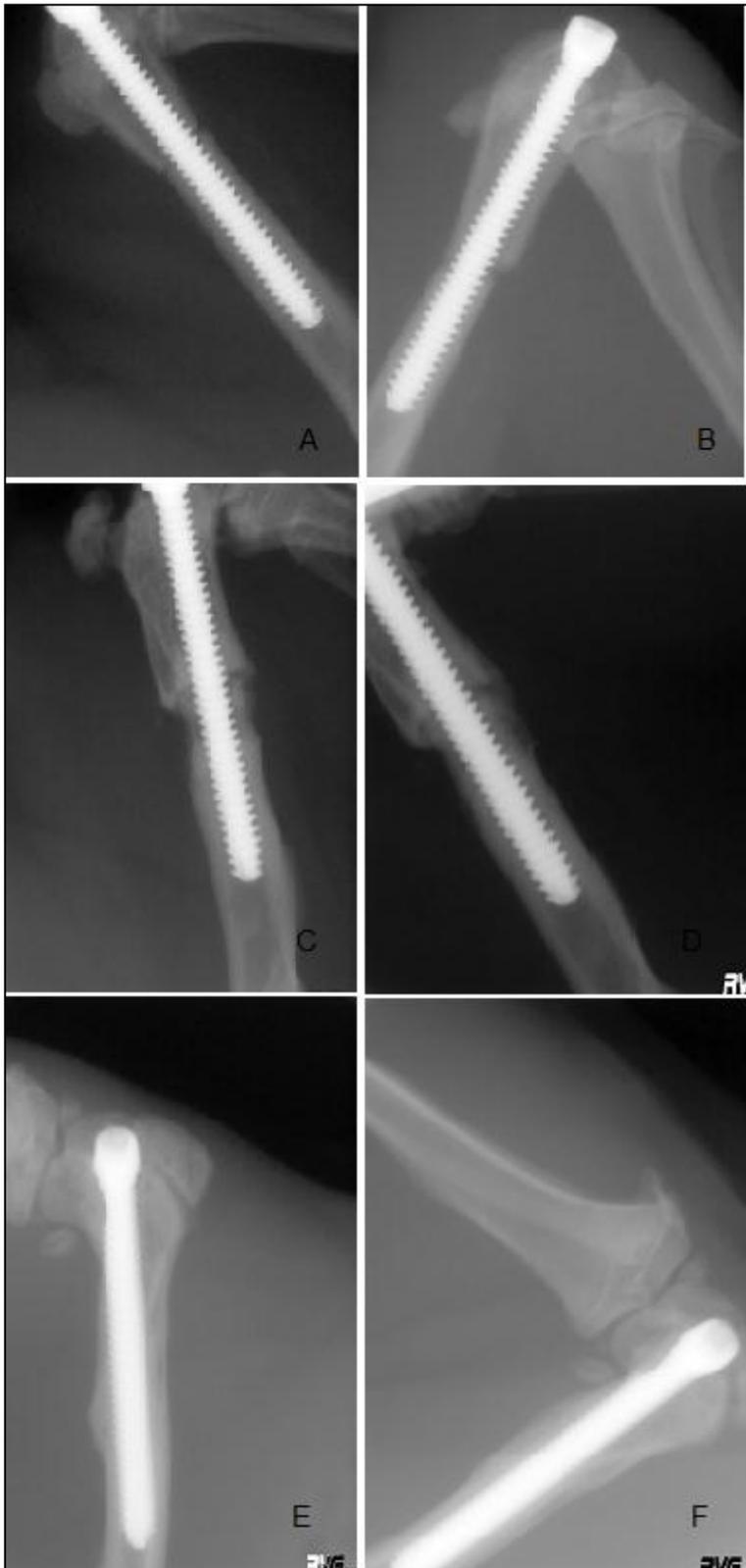


Figura 41: Radiografías de seguimiento de un ejemplar del grupo A1. (A-B) Controles radiográficos a la semana. Como se puede ver en este caso no hay gap dado que es el grupo A1 o grupo fractura. (C-D) Control radiográfico a las 6 semanas. (E-F) Control a las 12 semanas.

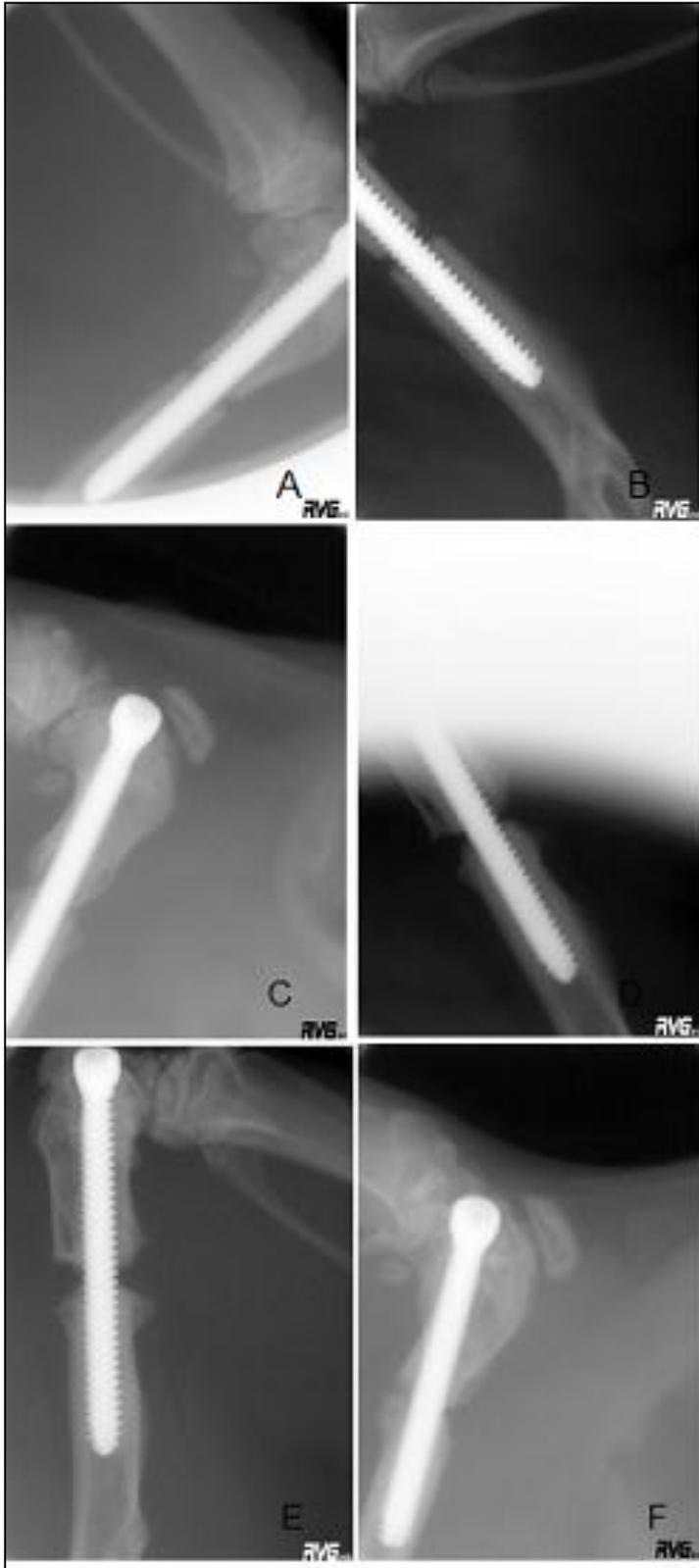


Figura 42: Radiografías de seguimiento de un ejemplar del grupo A2. (A-B) Controles radiográficos a la semana. (C-D) Control radiográfico a las 6 semanas. (E-F) Control a las 12 semanas.



Figura 43: Radiografías de seguimiento de un ejemplar del grupo B. (A-B) Controles radiográficos a la semana. (C-D) Control radiográfico a las 6 semanas. (E-F) Control a las 12 semanas. Como se puede ver en las imágenes el foco de pseudoartrosis se muestra consolidado.

4.5. Resultados histológicos.

Para la realización del estudio histológico, se sometieron al análisis a 18 animales; 6 pertenecientes al grupo A1 (fractura y suero), 6 al grupo A2 (osteotomía y suero) y 6 al grupo B (osteotomía y ranelato de estroncio).

A continuación se expone un ejemplo macro y microscópico de cada grupo (Figuras 44, 45 y 46):

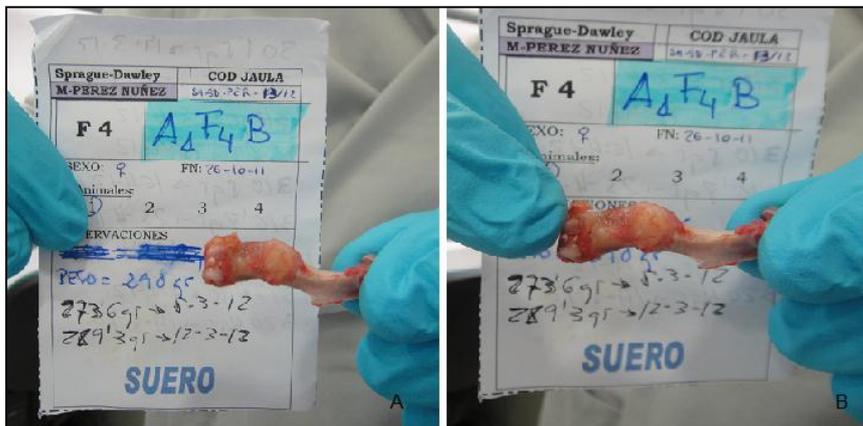


Figura 44 (A-B): Análisis macroscópico de una muestra obtenida de A1. (A) Se observa el aspecto de consolidación que presenta la muestra. (B) Se aprecia como al aplicarle una fuerza flexora a la muestra, ésta se mantiene en su posición, es decir el callo de fractura es estable.

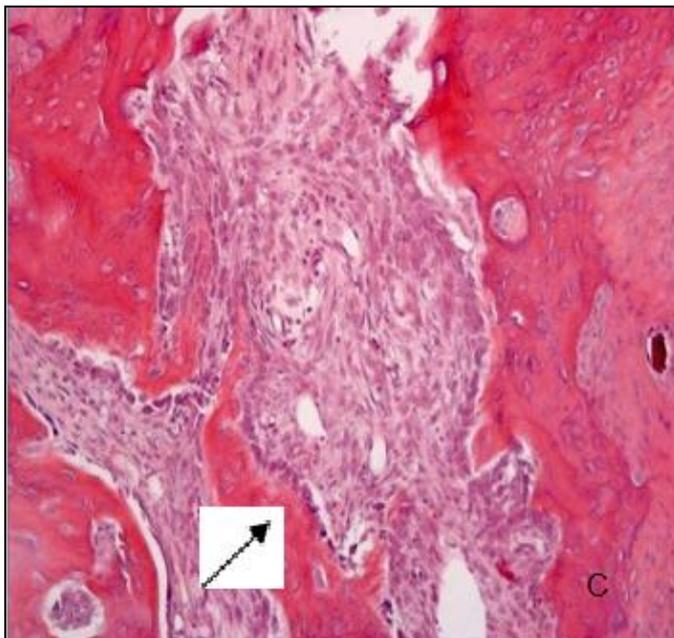


Figura 44(C): Muestra microscópica teñida con Hematoxilina-Eosina de un ejemplar A1. En la muestra se puede ver hueso maduro (flecha) clasificando la muestra como Allen 6, es decir una consolidación ósea completa.

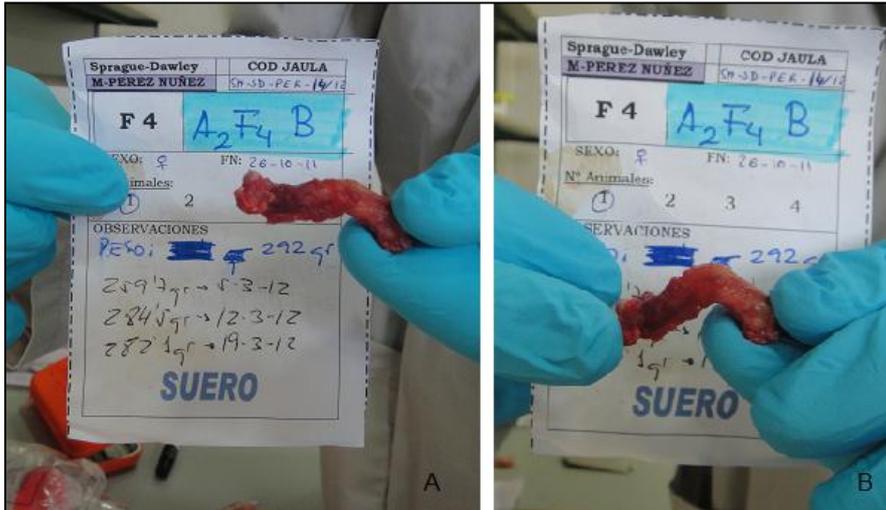


Figura 45(A-B): Análisis macroscópico de una muestra obtenida de A2. (A) Se observa el aspecto que presenta la muestra, con la simple acción de la gravedad ya se flexiona a través del foco de pseudoartrosis. (B) Se aprecia como al aplicarle ligera fuerza flexora a la muestra, ésta es incapaz de mantener la estabilidad, demostrando macroscópicamente una pseudoartrosis.

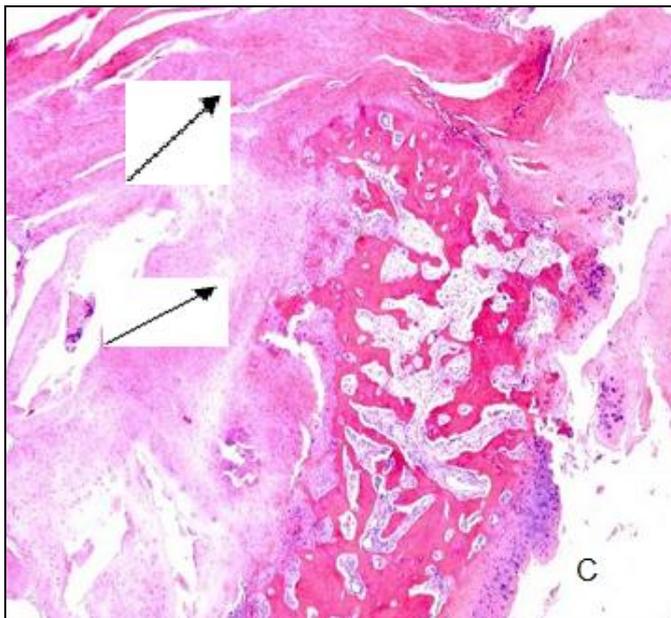


Figura 45(C): Imágenes microscópicas de una ejemplar A2 teñidas con Hematoxilina-Eosina. En ella se objetivan abundante fibrosis (flechas). Dados los hallazgos histológicos se clasifica la muestra como Allen 1.

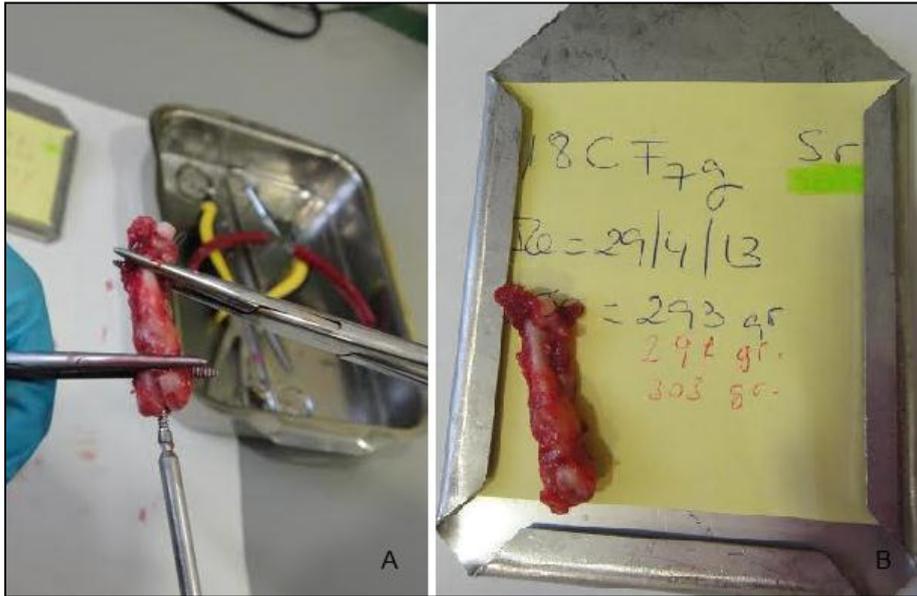


Figura 46(A-B): (A) Fémur extraído a un ejemplar a tratamiento con osteotomía y ranelato de estroncio. En la imagen se puede ver como se procede a la extracción del tornillo para permitir posteriormente el análisis de la muestra. (B) Imagen macroscópica de un fémur a tratamiento con ranelato de estroncio (BF2G). Se puede observar como presenta un callo óseo evidente.

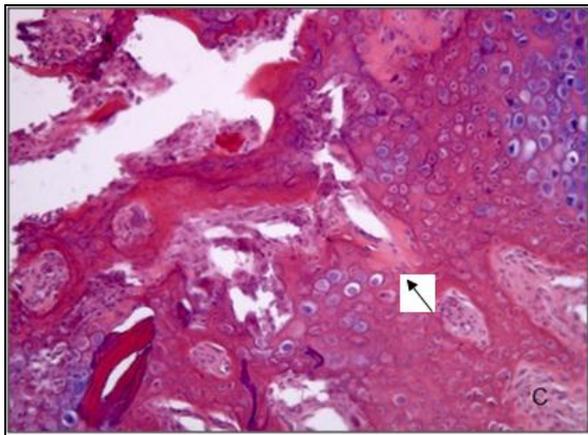


Figura 46(C): Muestra microscópica de un ejemplar a tratamiento con ranelato de estroncio teñida con Hematoxilina-Eosina. Se objetiva abundante tejido condroide y nuevo frente de formación de hueso nuevo inmaduro (flecha). La puntuación otorgada en la clasificación de Allen fue de 4.

En las siguientes tablas (Tablas 27, 28 y 29) se recogen el número de animales pertenecientes a cada grupo y su clasificación según la graduación histológica de Allen.

Grupo A1	AP Allen
A1F1h	6
A1F2g-h	4
A1F2h	5
A1F3h	4
A1F4g-h	4
A1F4h	4
Índice medio	4.50

Tabla 27

Grupo A2	AP Allen
A2F1h	1
A2F2g-h	2
A2F2h	2
A2F3h	2
A2F4g-h	2
A2F4h	1
Índice medio	1.67

Tabla 28

Grupo B	AP Allen
BF1h	4
BF2g-h	3
BF2h	3
BF3h	4
BF4g-h	2
BF4h	3
Índice medio	3.17

Tabla 29

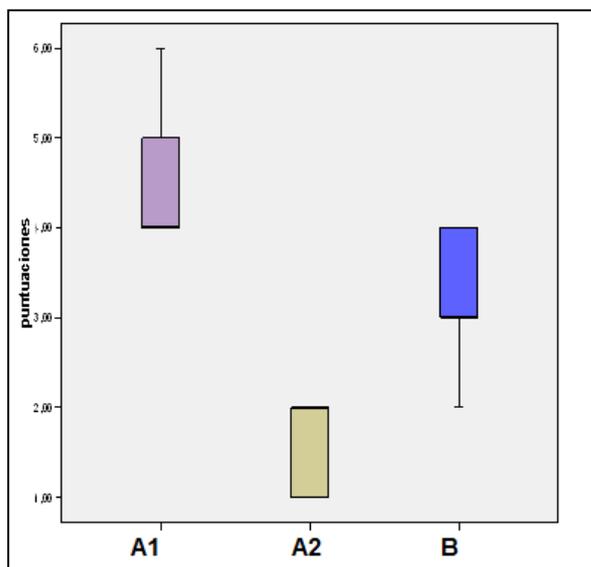


Figura 47: Representación gráfica de las puntuaciones obtenidas por cada subgrupo.

Si observamos la figura 47, los animales del grupo A1 obtuvieron unas calificaciones superiores que los de los demás grupos. De hecho, el único animal que consigue una consolidación completa de la fractura pertenece al grupo de tratamiento A1.

Además, existe una diferencia entre los resultados de los grupos A2 y B. El grupo de tratamiento con los resultados histológicos más bajos es el grupo A2.

Hallando las medias y desviaciones típicas de cada grupo de tratamiento se obtienen estos resultados (Tabla 30):

Grupo Tratamiento	Media	Desviación Típica
A1	4.50	0.894
A2	1.67	0.516
B	3.17	0.690

Tabla 30: Medias de puntuación de cada grupo de tratamiento.

Los animales pertenecientes al grupo A1 presentan puntuaciones más elevadas en comparación con los otros dos grupos. La diferencia reseñable es la falta de osteotomía de sustracción por lo que se demuestra que este hecho marca una diferencia importante en el estudio histológico.

Si analizamos la diferencia de medias de los resultados obtenidos entre los dos grupos de tratamiento, vemos que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A1 y A2 ($p=0,002$) y los grupos A2 y B ($p=0,005$). Dicho de otro modo existen diferencias tanto entre el grupo de fractura y el grupo de osteotomía y suero, como entre el grupo de osteotomía y suero y osteotomía y RE.

4.5.1. Resumen de los resultados histológicos.

- La diferencia de puntuaciones entre los tres grupos es estadísticamente significativa.
- El grupo A1 muestra una diferencia importante en el resultado histológico con respecto a los demás grupos (A2 y B); presenta puntuaciones superiores. La diferencia frente a A2 es estadísticamente significativa ($p=0,002$).
- Existe una diferencia estadísticamente significativa en la comparación de resultados entre los grupos A2 (osteotomía y suero) y B (osteotomía y ranelato de estroncio) ($p= 0,005$).

Por tanto las ratas con el modelo de pseudoartrosis y tratadas con ranelato de estroncio presentan unos resultados significativamente mejores respecto a los resultados histológicos, de los fémures de los animales que se trataron con la osteotomía de sustracción y suero.

4.6. Resultados Biomecánicos.

El trabajo realizado comprende los ensayos practicados sobre los fémures de 14 ratas. De cada animal se extrajeron ambos fémures; el fémur derecho o fémur intervenido (FD) y el izquierdo sin intervención (FI). De los fémures izquierdos se obtuvieron las dos epífisis (Epífisis superior o ES y Epífisis inferior EI) mientras que de los derechos sólo se obtuvieron los superiores. Esto es debido a que la epífisis inferior se altera con la introducción del tornillo por eso su utilización podría conducir a error.

Las ratas que se destinaron al estudio biomecánico se mantuvieron con vida durante las 12 semanas que duró el tratamiento.

4.6.1. Resultados del ensayo de ultramicroindentación.

Este estudio incluye información sobre las durezas del tejido cortical (C) y trabecular (T) tanto de epífisis superiores (ES) como de las inferiores (EI). Para ello se emplearon las epífisis superiores e inferiores de los dos fémures de las ratas a estudio (excluyendo del ensayo la EI del fémur intervenido).

Tal y como muestra la tabla 31, se han representado los valores de dureza obtenidos para cada serie y tipo de tejido analizando tanto los valores medios como las distribuciones de los datos obtenidos. Posteriormente se compararon los grupos mediante la t- de Student.

Resultados.

Grupo	Localización	Tejido	Nº ensayos	Dureza	Desv. Típ.	Coef. Variac.
A1	FI-ES	C	54	61	10	16
	FI-ES	T	51	56	5	9
	FI-EI	C	53	52	7	13
	FI-EI	T	51	50	7	14
	FD-ES	C	52	64	13	20
	FD-ES	T	53	57	8	14
A2	FI-ES	C	76	61	11	18
	FI-ES	T	83	54	7	13
	FI-EI	C	79	48	6	13
	FI-EI	T	82	50	7	14
	FD-ES	C	77	54	8	15
	FD-ES	T	79	51	7	14
B	FI-ES	C	56	59	9	15
	FI-ES	T	57	56	6	11
	FI-EI	C	58	53	6	11
	FI-EI	T	55	54	7	13
	FD-ES	C	57	68	9	13
	FD-ES	T	57	57	6	11

Tabla 31: Comparación entre los valores medios de dureza en tejido cortical y trabecular. (FI-ES): Fémur izquierdo-Epífisis superior, (FD-ES): Fémur derecho-Epífisis superior, (FI-EI): Fémur izquierdo-Epífisis inferior.

4.6.1.1. Comparación de la dureza del tejido trabecular y el cortical.

Si comparamos los valores de dureza de la zona cortical y trabecular (Tabla 31 y Figura 48) de cada grupo, la dureza del tejido cortical es superior a la del trabecular.

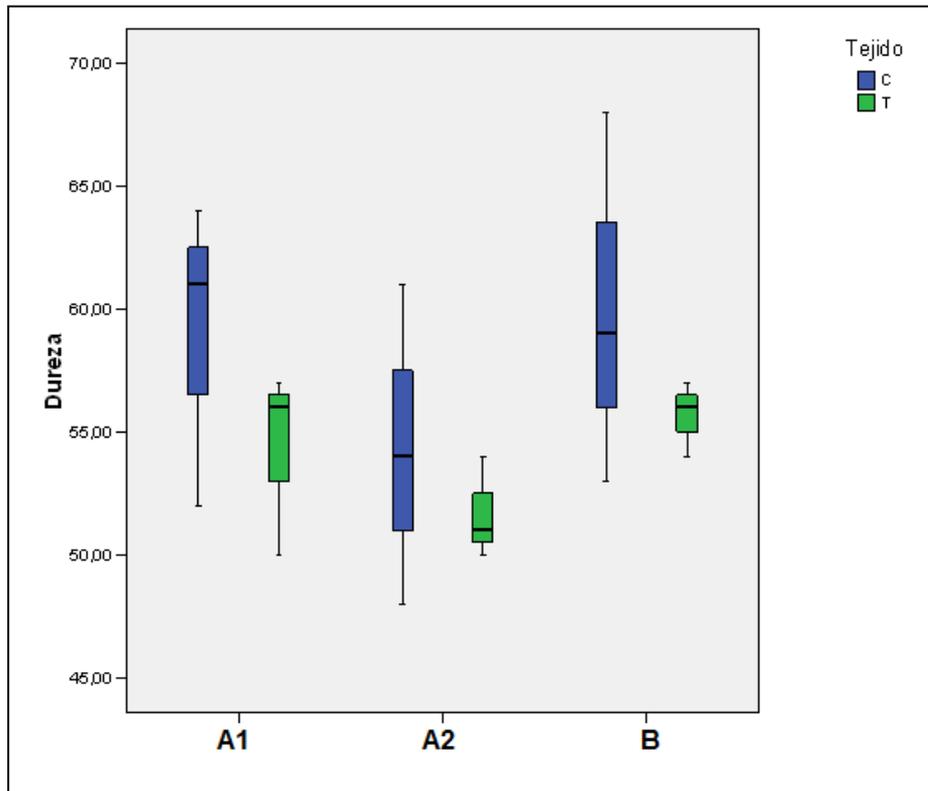


Figura 48: Gráfico comparativo de la dureza del tejido cortical (azul) y del trabecular (verde) según el tipo de tratamiento y tejido. Como se puede ver existe una mayor dureza en las muestras de tejido cortical que en las de tejido trabecular. Si observamos los diferentes grupos vemos que el grupo B se asemeja bastante al grupo control o A1 (Fractura + osteotomía).

Comparando los valores medios de ambos tipos de tejido (Tabla 32) queda patente esta diferencia.

Por otra parte, resulta destacable que para cada grupo estudiado, los FI-EI manifiestan los valores mínimos de diferencia de dureza entre hueso cortical y trabecular.

Grupo		HC	SD-C	HT	SD-T	T-C	T-C/SD	(T/C)x100
A1	FI-ES	61	10	56	5	-5	-0,67	92
	FI-EI	52	7	50	7	-2	-0,29	96
	FD-ES	64	13	57	8	7	-0,67	89
A2	FI-ES	61	11	54	7	-7	-0,78	89
	FI-EI	48	6	50	7	2	0,31	104
	FD-ES	54	8	51	7	-3	-0,4	94
B	FI-ES	59	9	56	6	-3	-0,4	95
	FI-EI	53	6	54	7	1	0,15	102
	FD-ES	68	9	57	6	-11	-1,47	84

Tabla 32: Comparación entre los valores medios de dureza en tejido cortical y trabecular. (FI-ES): Fémur izquierdo-Epífisis superior, (FD-ES): Fémur derecho-Epífisis superior, (FI-EI): Fémur izquierdo-Epífisis inferior, (HC): hueso cortical, (SD-C): desviación estándar hueso cortical, (HT): hueso trabecular, (SD-T): Desviación estándar hueso trabecular, (T-C/SD): Cociente diferencia de dureza entre desviación estándar, (T/C)x100: Cociente de dureza.

A fin de contrastar las premisas anteriores se han realizado los siguientes contrastes de hipótesis:

- Si se realiza la comparación entre la dureza en tejido cortical y trabecular considerando todos los datos experimentales agregados (es decir, sin diferenciar familias), observamos que la dureza cortical presenta una media de 57,39 (SD= 10,26) frente la dureza trabecular de media 53,31 (SD= 6,84). Así mismo, encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de los mismos ($p=0,05$).

A partir de estos datos se concluye que en el análisis de los resultados deberá discriminarse, en general, entre los valores obtenidos en hueso cortical y los que proceden de hueso trabecular.

- Si comparamos el hueso cortical y trabecular para los grupos FI-ES y FD-ES vemos que los resultados en este caso son concordantes, hallando diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos (cortical y trabecular) para las dos extremidades superiores (de fémur derecho e izquierdo) ($p=0,05$).

Después de lo anteriormente expuesto, podemos concluir que en el análisis de los resultados deberá discriminarse entre los valores de hueso cortical y hueso trabecular.

- Si comparamos el hueso cortical y trabecular para la localización FI-EI, se demuestra con nitidez que para esta localización, la diferencia entre los valores medios de dureza no es estadísticamente significativa. Además los datos obtenidos reflejan un comportamiento diferencial de este grupo respecto de las demás localizaciones analizadas, pues presentan valores muy similares entre ellos.

		Media	SD
FI-EI	Cortical	49,87	6,72
	Trabecular	50,41	6,57
FI-ES	Cortical	60,75	9,22
	Trabecular	55,50	6,09
FD-ES	Cortical	61,62	10,03
	Trabecular	53,84	6,86

Tabla 33: Valores medios de tejido trabecular y cortical respectivamente del grupo FI-EI, FI-ES y FD-ES. En esta tabla llama la atención como los valores del subgrupo cortical se diferencian de los del subgrupo trabecular en los grupos FI-ES y FD-ES mientras que son prácticamente iguales en el grupo FI-EI.

4.6.1.2. Comparación de la dureza de epífisis superiores e inferiores.

Los resultados del apartado anterior sugieren efectuar una comparación directa entre los valores de dureza obtenidos en FI-ES y FI-EI (considerando por separado cada grupo y cada tipo de tejido, bien cortical o bien trabecular). Este análisis únicamente puede realizarse sobre los fémures izquierdos ya que en el caso de los derechos (fémures problema o intervenidos) no tenemos posibilidad de analizar las epífisis inferiores.

Si observamos la tabla 34 se aprecian unas cifras de dureza mayores para las epífisis superiores que para las inferiores. Consecuentemente los resultados obtenidos de ambas epífisis se analizarán de forma separada.

Resultados.

Resultados.

Grupo			N	H	SD	CV	EI-ES	EI-ES /SD	(EI/ES) x100
A1	FI-ES	C	54	61	10	16	-9	-1,1	85
	FI-EI	T	53	52	7	13			
	FI-ES	C	51	56	5	9	-6	-1	89
	FI-EI	T	51	50	7	14			
A2	FI-ES	C	76	61	11	18	-13	-1,5	79
	FI-EI	T	79	48	6	13			
	FI-ES	C	83	54	7	13	-4	-0,6	93
	FI-EI	T	82	50	7	14			
B	FI-ES	C	56	59	9	15	-6	-0,8	90
	FI-EI	T	58	53	6	11			
	FI-ES	C	57	56	6	11	-2	-0,3	96
	FI-EI	T	55	54	7	13			

Tabla 34: Comparación de valores medios de dureza en ES y EI (tanto en tejido cortical como trabecular).(FI-ES): Fémur izquierdo-Epífisis superior, (FI-EI): Fémur izquierdo-Epífisis inferior, (N): número total de muestra (H):Dato de dureza del hueso, (SD): desviación estándar, (CV): Coeficiente de variación, (EI-ES): Diferencia entre epífisis superiores e inferiores, (EI-ES/SD): Cociente diferencia de dureza entre desviación estándar, (EI/ES)x100: Cociente de dureza.

Dado que no tenemos un grupo de control sin intervenciones quirúrgicas, no podemos descartar que la fractura/ osteotomía sobre el fémur derecho no haya inducido modificaciones sobre las propiedades mecánicas de ambos fémures (bien por alteraciones de la carga sobre el fémur operado o sobrecarga en la contralateral). Por este motivo admitimos que si los resultados comparativos entre ambos fémures (FI-ES y FD-ES) de la misma familia son equivalentes, es debido a que no ha existido ninguna alteración de este tipo.

Con el propósito de establecer este dilema presentamos a continuación la tabla 35 que expone los resultados experimentales por grupos.

			N	H	SD	CV	FI-FD	FI-FD/SD	(FI/FD) x100
A1	FI-ES	C	54	61	10	16	-3	-0,3	95
	FD-ES	C	52	64	13	20			
	FI-ES	T	51	56	5	9	-1	-0,2	98
	FD-ES	T	53	57	8	14			
A2	FI-ES	C	76	61	11	18	7	0,7	113
	FD-ES	C	77	54	8	15			
	FI-ES	T	83	54	7	13	3	0,4	106
	FD-ES	T	79	51	7	14			
B	FI-ES	C	56	59	9	15	-9	0,1	87
	FD-ES	C	57	68	9	13			
	FI-ES	T	57	56	6	11	-1	-0,2	98
	FD-ES	T	57	57	6	11			

Tabla 35: Comparación entre los valores medios de dureza en fémur derecho e izquierdo (FI-FD), tanto en tejido trabecular como en el cortical.(FI-ES): Fémur izquierdo-Epífisis superior, (FD-ES): Fémur derecho-Epífisis superior, (N): número total de muestra (H): Dato de dureza del hueso, (SD): desviación estándar, (CV): Coeficiente de variación, (FI-FD): Diferencia entre epífisis superiores e inferiores, (FI-FD/SD): Cociente diferencia de dureza entre desviación estándar, (FI/FD)x100: Cociente de dureza.

Cuando se comparan los valores medios del grupo A1 (fractura y suero), se observa una pequeñísima modificación de la dureza: el fracturado es ligeramente más duro que el contralateral, tanto en tejido cortical como en trabecular. Según esto, podemos decir que tomando como referencia el fémur izquierdo, puede asumirse que el proceso de fractura no afecta sustancialmente a las propiedades mecánicas de los tejidos de FD-ES (en relación al FI). Se concluye entonces que la fractura no ha supuesto variación significativa de la dureza de ninguno de los dos fémures.

Como conclusión podemos decir que los resultados obtenidos permiten afirmar que la osteotomía de sustracción no altera las propiedades de FI-ES; sin embargo disminuye la dureza de FD-ES.

4.6.1.3. Comportamiento de la dureza del hueso tras la administración de Ranelato de Estroncio (grupo B).

Tras la realización de los estudios correspondientes sobre epífisis superiores de fémures izquierdos (FI-ES) de los ejemplares tratados con ranelato de estroncio, podemos concluir que este tratamiento no parece haber afectado a la dureza ni del tejido trabecular ni del cortical.

Los contrastes de hipótesis practicados no detectan diferencias significativas ni en el hueso cortical ni en el trabecular al comparar las epífisis superiores de los fémures izquierdos de los grupos A1 y B (Figuras 49 y 50).

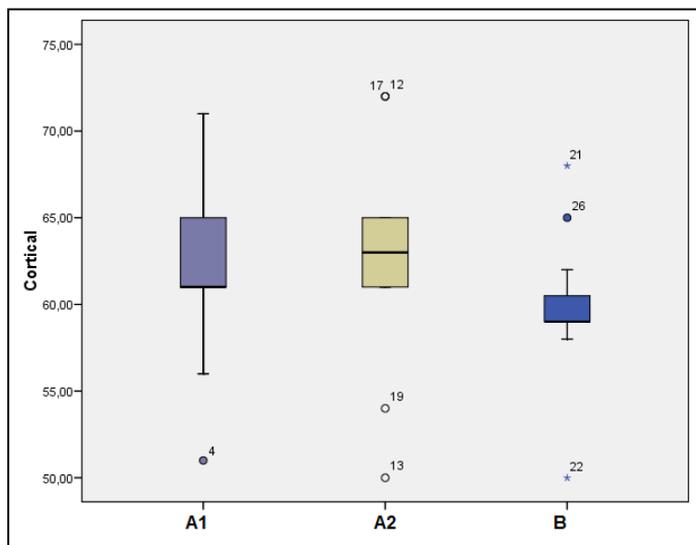


Figura 49: Comparación entre la dureza cortical de los FI-ES de los grupos A1, A2 y B.

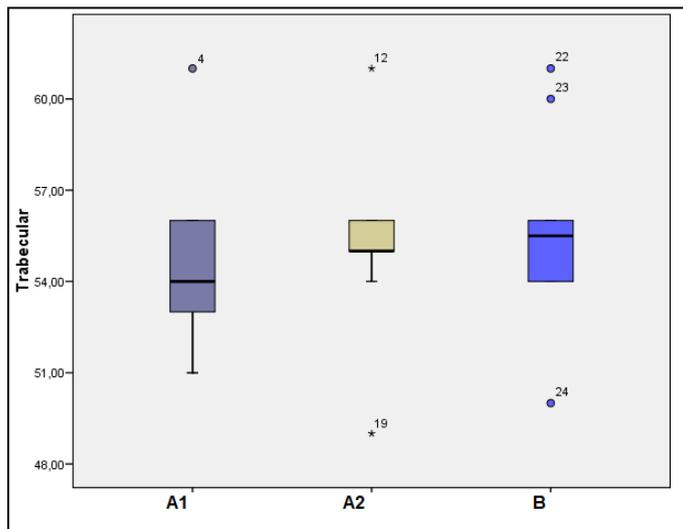


Figura 50: Comparación entre la dureza trabecular de los FI-ES de los grupos A1, A2 y B.

Si observamos los resultados obtenidos en los ensayos de los FI-EI (anexo 3), vemos que existe un leve efecto endurecedor para ambos tipos de tejido (cortical y trabecular). Ésto se confirmó mediante el contraste de hipótesis donde se confirmó que los valores superiores del grupo a tratamiento con RE eran significativos.

En el caso de los fémures derechos se aprecia un aumento importante de la dureza respecto a los resultados de FD-ES del grupo A2 (14 unidades más en el tejido cortical y 5 en el trabecular). Además esta dureza se incrementa hasta el punto de alcanzar los valores de dureza original del hueso (antes de la osteotomía).

4.6.2. Resultados del ensayo de flexión en cuatro puntos.

4.6.2.1. Resultados obtenidos sobre fémures izquierdos.

Presentamos los resultados de la fuerza máxima (F_{\max}) y de la energía absorbida hasta carga máxima (E_{\max}) registrados en los ensayos de flexión en cuatro puntos (EF4P) sobre fémures izquierdos (Tabla 36). Dado que con cada ensayo la muestra se destruye, sólo hay un ensayo por fémur; de ahí el bajo número de ensayos (12 fémures= 12 ensayos). A partir de estos valores obtenemos los siguientes resultados:

Grupo	Casos	Fuerza	Energía
A1	1	242	94,2
	2	205,2	47,1
	3	211,8	201,4
	4	237	94
A2	1	238,1	103,3
	2	216	61,3
	3	196,3	211,7
	4	233	85
B	1	199,4	81,3
	2	240,8	87,6
	3	301,8	328,4
	4	266	70

Tabla 36: Resultados obtenidos (F_{\max} y E_{\max}) en los ensayos de flexión en 4 puntos sobre los fémures izquierdos.

Por los datos representados en la tabla 36, podemos afirmar que:

1. No se observaron diferencias reseñables entre los valores de los grupos A1 (fractura + suero) y A2 (osteotomía + suero) (Figuras 51 y 52). Estos datos concuerdan con los obtenidos en el ensayo de ultramicroindentación donde se concluyó que el proceso de osteotomía no había alterado la dureza de los fémures izquierdos.
2. El grupo B (osteotomía + ranelato de estroncio) presenta valores medios, en cuanto a resistencia se refiere, superiores a los de los grupos referencia (A1 y A2) (Figuras 51 y 52).

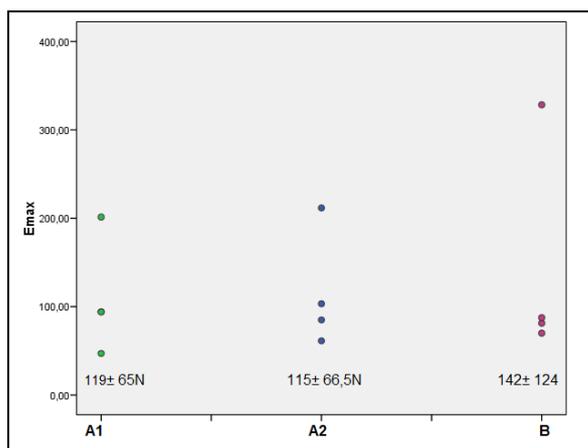


Figura 51: Valores de E_{\max} registrados para los fémures izquierdos en los ensayos de flexión en cuatro puntos. Como ya se ha mencionado los valores del grupo B son levemente superiores.

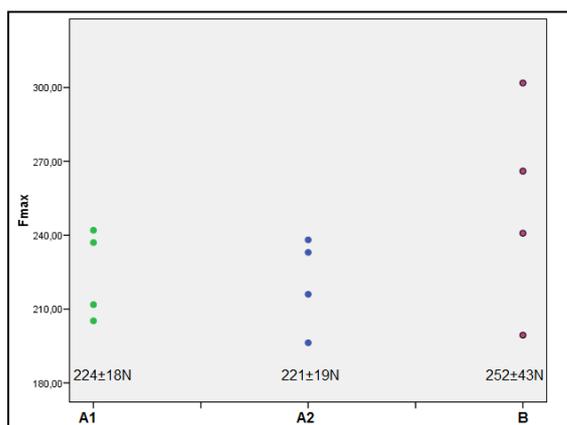


Figura 52: Valores de F_{máx}. registrados para los fémures izquierdos en los ensayos de flexión en cuatro puntos, siendo los del grupo B superiores a los del resto de grupos.

4.6.2.1. Resultados obtenidos sobre fémures derechos.

En primer lugar presentamos los resultados de la fuerza máxima (F_{máx}) y de la energía absorbida hasta carga máxima (E_{máx}) registrados en los ensayos de flexión en cuatro puntos (EF4P) sobre fémures derechos (Tabla 37).

Grupo	Casos	Fuerza	Energía	Gap
A1	1	20,4	10,5	0,76
	2	30	8,4	0,43
	3	30,3	9,4	0
	4	9	4,82	0,79
A2	1	29,1	17,1	0,44
	2	1,6	0,4	1,18
	3	20	11,2	1,15
	4	29,3	11,5	0,25
B	1	16,9	2,19	1,96
	2	68	15,4	1,43
	3	123,4	26	1,14
	4	35,6	11,9	1,46

Tabla 37: Resultados obtenidos (F_{máx} y E_{máx}) en los ensayos en flexión de 4 puntos sobre los fémures derechos y mediciones del Gap de cada ejemplar a ensayo.

Como ya hemos comentado en el apartado anterior, el número de ensayos es limitado dado que con cada ensayo se destruye la muestra; por tanto solamente contamos con 4 ensayos (4 ejemplares) por grupo. No obstante nos permiten extraer los siguientes patrones de comportamiento:

1. Los resultados demuestran una alta variabilidad, tanto para $F_{\text{máx}}$. como para $E_{\text{máx}}$.
2. No se observan diferencias reseñables entre los valores medios de los grupos A1 y A2.
3. El grupo B presenta resultados superiores en cuanto a resistencia se refiere; si bien es cierto que la dispersión de los valores es claramente superior al del resto de los grupos (Figuras 53 y 54).

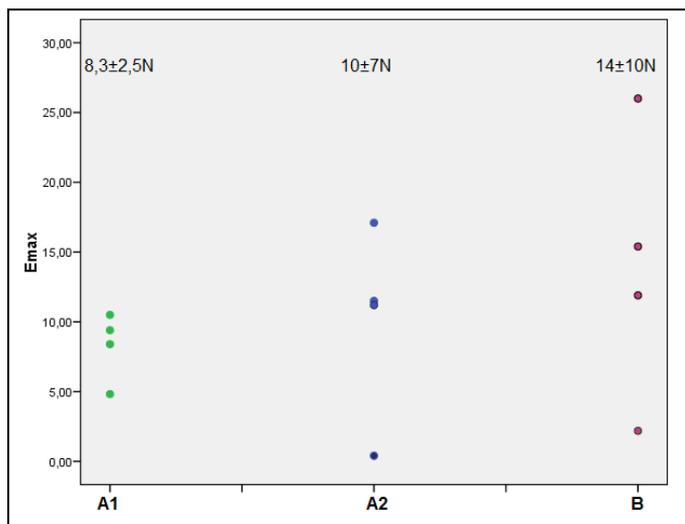


Figura 53: Valores de $E_{\text{máx}}$ registrados para los fémures derechos en los ensayos de flexión en cuatro puntos. Como ya se ha mencionado los valores del grupo B son superiores; si bien es cierto que la dispersión también los es.

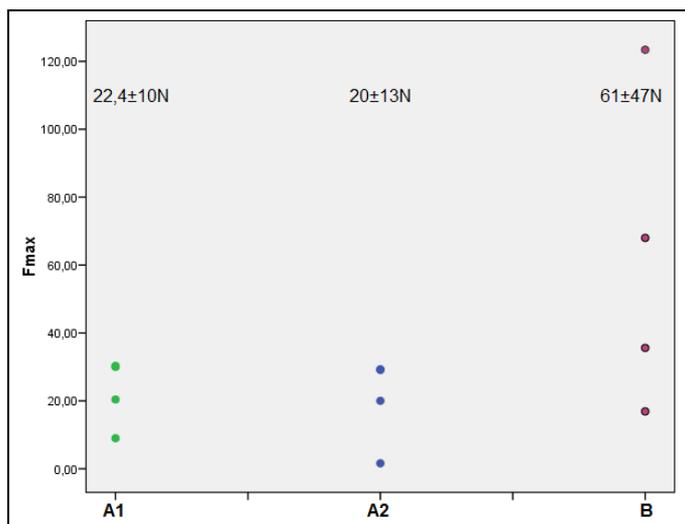


Figura 54: Valores de $F_{\text{máx}}$ registrados para los fémures derechos en los ensayos de flexión en cuatro puntos.

Si consideramos las dimensiones del gap y la influencia de esta dimensión en los resultados obtenemos las siguientes conclusiones:

1. Los valores del gap en el grupo A1 (fractura y suero) son inferiores al resto, tal como era de esperar. Da la impresión de que la anchura del gap en el grupo A1 influye tímidamente sobre los valores de resistencia de la unión.
2. Se observa una mejora sustancial en el comportamiento del grupo B (osteotomía y ranelato de estroncio).

Resumen de los resultados biomecánicos.

Ultramicroindentación.

1. Los resultados experimentales demuestran que la dureza del tejido cortical es superior a la del trabecular. Además encontramos que el hueso procedente de las epífisis superiores, tanto el cortical como el trabecular, es más duro que el de las epífisis inferiores.
2. El proceso de fractura no ha supuesto variación significativa sobre las propiedades del tejido óseo en las epífisis superiores de los fémures.
3. La osteotomía no ha afectado a las propiedades de los tejidos de los fémures izquierdos. Sin embargo se ha constatado una disminución de la dureza, tanto de hueso cortical como de trabecular de las epífisis superiores de los fémures derechos.
4. No se ha encontrado ninguna influencia significativa del ranelato de estroncio sobre la dureza del tejido de las epífisis superiores de fémures izquierdos. Sin embargo, no puede descartarse que un leve efecto endurecedor haya tenido efecto sobre las epífisis inferiores de dichos fémures. El resultado más reseñable consiste en el endurecimiento experimentado, tanto por el tejido cortical como por el trabecular, de las epífisis superiores de fémures derechos, llegando a superar los valores originales.

Ensayos de flexión en cuatro puntos.

En general disponemos de pocos resultados experimentales, por eso las conclusiones no deben ser tomadas como definitivas.

1. En relación a los ensayos realizados sobre los fémures izquierdos podemos establecer que los grupos A1 y A2 presentan respuestas muy similares, concordando este hecho con las conclusiones de los ensayos de ultramicroindentación. Si comparamos estos resultados con los del grupo B observamos una respuesta mecánica mejorada.

2. En el caso de los ensayos sobre los fémures derechos analizamos los resultados teniendo en consideración el gap presentado. En estos ensayos encontramos nuevamente concordancia entre los grupos A1-A2 y una respuesta mecánicamente superior en el grupo B.

4.7. Resultados de la expresión génica.

En las tablas presentadas a continuación (Tablas 38 y 39) se expresan los resultados obtenidos por PCR cuantitativa en todos los genes estudiados, junto a sus medias y desviaciones típicas.

Los valores obtenidos de PCRq obtenidos presentan una alta variabilidad entre los diferentes animales. Este resultado suele ser habitual en este tipo de estudios.

Al realizar la comparación entre los grupos A2 (osteotomía y suero) y B (osteotomía y ranelato de estroncio) se observó una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de *dkk1*, un inhibidor de la vía *wnt*, cuya producción era algo menor en el grupo tratado con ranelato de estroncio ($p=0,03$). De todas maneras, hay que tener en cuenta que el número de ratas en cada grupo limitaba la potencia del estudio.

Casos	runx2	wnt5a	sox9	col1a1	col2a1	bglap
1A2F7G	4,18	1,18	2,39	535,8	14,14	18,53
4A2F7G	6,64	0,87	2,88	403,34	2,59	16,36
7A2F7G	9,26	2,47	3,6	1042,6	11,62	55,13
10A2F7G	0,25	0,78	3,57	578,21	2,05	80,6
13A2F7G	8,5	0,7	20,37	841,43	26,2	44,7
16A2F7G	14,29	1,42	8,62	1297,3	41,35	87,24
3BF7G	10,5	0,84	3,1	666,96	4,12	153,88
6BF7G	5,7	0,66	1,6	489,38	2,6	73,98
9BF7G	0,84	1,02	3,19	423,13	1,41	48,49
12BF7G	6,16	1,41	6,2	753,41	9,53	35,63
15BF7G	9,2	1,59	8,36	1258,9	14,74	80,53
18BF7G	4,97	0,98	5,12	621,28	3,65	40,8

Tabla 38: Relación de ejemplares incluidos en el estudio y las cifras obtenidas para cada gen específico durante el estudio (expresión relativa frente a normalizador).

Resultados.

Casos	alpl	rankl	Opg	dkk1	sost	col10a1
1A2F7G	12,87	0,28	0,79	0,33	0,06	1,12
4A2F7G	11,61	0,09	0,13	0,05	0,11	0,14
7A2F7G	13,84	0,96	0,67	0,79	0,22	0,77
10A2F7G	11,74	0,59	0,76	0,73	0,05	0,1
13A2F7G	13,46	0,47	1,06	0,64	0,04	0,45
16A2F7G	36,45	0,49	0,94	1,06	0,38	1,77
3BF7G	12,99	0,35	0,35	1,15	0,35	0,16
6BF7G	5,58	0,28	1,31	0,26	0,25	31,88
9BF7G	7,78	0,36	0,5	0,47	0,16	0,02
12BF7G	13,99	0,4	0,81	0,53	0,08	0,54
15BF7G	20,9	0,35	0,59	0,57	0,19	0,86
18BF7G	10,95	0,23	0,39	0,21	0,13	0,13

Tabla 39: Relación de ejemplares incluidos en el estudio y las cifras obtenidas para cada gen específico durante el estudio (expresión relativa frente a normalizador).

Discusión.

Discusión.

Discusión.

Discusión.

5. Discusión.

En los siguientes apartados se analizan los resultados obtenidos con el modelo experimental de pseudoartrosis atrófica comparándolo con el resto de modelos publicados hasta la fecha. Además se valorará la importancia del defecto crítico y la dimensión óptima en modelos murinos.

Por otro lado, se discute la influencia del ranelato de estroncio en la consolidación del modelo de pseudoartrosis comparándolo con resultados obtenidos en publicaciones previas al estudio.

Por último, en este estudio se revisa toda la bibliografía hasta la fecha valorando: la efectividad en humanos, su posible utilidad, así como las contraindicaciones que puede presentar el uso de este fármaco.

5.1. Modelo de pseudoartrosis atrófica y comparación con los modelos existentes.

Aunque el hueso presenta una capacidad de consolidación muy alta en condiciones normales, ésta puede estar limitada debido a las circunstancias de la fractura (factores ambientales, genéticos, etc). Con esta premisa, se han propuesto diversos estudios en los que se intenta emular experimentalmente situaciones en las que existe una pseudoartrosis atrófica (198).

5.1.1. Selección del animal de experimentación.

Lo primero a tener en cuenta a la hora de la creación del modelo experimental es la capacidad de extrapolar resultados desde ese modelo al ser humano; dicho de otro modo, la validez de cualquier información sacada del animal dependerá de la pertinencia del animal seleccionado (172, 173).

No existen unas normas preestablecidas; la base lógica que hay detrás de la extrapolación de resultados de una especie animal a otra está basada en la homología, semejanza evolutiva, estructuras morfológicas y procesos fisiológicos entre las diferentes especies animales y los humanos (171).

Por lo dicho anteriormente, parece lógico pensar que el mejor modelo para extrapolar los datos y que estos tengan validez serían mamíferos grandes. Sin embargo, tras el análisis realizado por Martini et al (199) se comprobó que el 36% de los estudios realizados al respecto eligen ratas, el 26% ratones y un

13% conejos mientras que los mamíferos superiores como perros o primates solo suponen un 14%. A priori, un primate sería el modelo ideal pues, genética y fisiológicamente es más parecido al hombre. Sin embargo, si tenemos en cuenta los trabajos de Mills (175) y Montero (171) entendemos que se escojan los mamíferos inferiores; son válidos válidos si se cumplen ciertas condiciones; su coste es menor y su manejo por parte de investigadores y técnicos es más sencillo. El uso de mamíferos superiores supone afrontar unos costes y complicaciones muy difíciles de asumir para la mayoría de los proyectos de investigación (171).

El inconveniente de utilizar animales de experimentación radica en que, aunque el esqueleto de otros mamíferos se parezca al del ser humano, la homeostasis del tejido óseo no tiene porqué ser idéntica. Por ejemplo, el perro tiene un tejido óseo muy parecido al humano en cuanto a composición, sin embargo presenta una combinación de hueso laminar y plexiforme y el remodelado difiere un tanto, además de presentar un comportamiento biomecánico totalmente diferente (200).

Las ratas tienen hueso laminar muy parecido al humano, con un tejido esponjoso muy similar. Sin embargo sus corticales se presentan mucho más adelgazadas. En el caso de los ratones, la falta de canales de Havers hace que durante muchos años se haya cuestionado la validez de este tipo de modelos experimentales (176). No obstante, el hecho de ser el animal de experimentación por excelencia en cuanto a costes, previsibilidad y aprendizaje técnico se refiere, junto con la presencia de un sistema de canales parecidos a los de Havers, hacen que estas dudas se disipen (172).

Si tenemos en cuenta el tamaño de ambos roedores (ratones y ratas), en seguida nos damos cuenta de la diferencia de tamaño existente entre los huesos de ambos animales. El uso de ratones, para estos modelos experimentales quirúrgicos, requiere de equipos de medición más precisos y algunas intervenciones son prácticamente imposibles, dado el tamaño de los huesos. Por tanto se prefiere escoger la rata, pues su estructura ósea es de mayor tamaño, con lo que se reducen este tipo de dificultades (172, 175).

En los últimos años se ha desarrollado una batería de instrumental que facilita esta tarea (176).

5.1.2. Selección de la región a intervenir y tipo de osteotomía a realizar.

En la bibliografía actual llama la atención que siempre se escogen las extremidades inferiores para realizar la cirugía. Esto es debido en primer lugar al discretamente mayor tamaño de las mismas, así como la certeza de la

carga, pues aunque los roedores realizan la deambulación a cuatro patas, sus patas delanteras se elevan en muchas situaciones en las que el roedor explora el terreno en el que se encuentra y esa situación es difícil de controlar (171).

Una vez decidimos emplear la extremidad inferior, se presentan nuevos dilemas. En el caso de la tibia, la cobertura cutánea es mucho más limitada, tiene una configuración triangular del eje trasverso y curvada de su eje longitudinal, lo que dificulta la implantación de material de osteosíntesis; además, la estabilidad de la fractura puede estar a merced del peroné (176, 201). Por otro lado, el fémur es de mayor tamaño, tiene una configuración diafisaria tubular más similar a la del ser humano y una buena cobertura de partes blandas (176). Por ello nos inclinamos por el fémur a la hora de realizar nuestro modelo.

Si bien es cierto que numerosos autores como Einhorn et al (201) utilizan la tibia, lo hacen porque en sus estudios no se incluyen sistemas de osteosíntesis endomedulares como es nuestro caso y se realizan fracturas cerradas evitando el riesgo de fracaso de partes blandas. Además el sistema de producción de la fractura cerrada que utilizan simula relativamente bien lo que ocurre de forma natural, es decir una fuerza que actúa sobre el hueso hasta que vence su resistencia provocando su fractura (179).

Dado que el fémur humano es un hueso que admite la implantación de sistemas endomedulares como método estabilizador de las fracturas, la posibilidad de realizar la misma intervención en el fémur de la rata hace que la analogía entre nuestro modelo experimental y el ser humano sea mayor. Además, en el caso de escoger el fémur de la rata, la cirugía abierta es mandatoria, por lo que perdemos la estabilidad de las partes blandas y nos permite lesionar el periostio y el hematoma fracturario haciendo que nuestro modelo de pseudoartrosis atrófica sea más parecido a lo que ocurre en el ser humano cuando tiene un proceso como el que intentamos reproducir.

Como ya se ha mencionado, autores como Einhorn y Bonnarens (201) o Cebesoy (159) utilizan métodos cerrados en tibia (guillotinas de tres apoyos) para realizar las fracturas; posteriormente utilizan la fijación externa como elemento estabilizador.

Park et al (202) realizó un estudio en el que se compara la producción de la fractura cerrada en un modelo experimental en conejo con las osteotomías abiertas, encontrando un menor hematoma fracturario y mayor daño perióstico en el caso de las osteotomías realizadas de forma abierta.

Según lo expuesto anteriormente, podemos afirmar que la utilización de métodos cerrados sería más aconsejable para el estudio de la fractura, dado que no lesionamos las partes blandas, ni alteramos el proceso de consolidación. En nuestro caso el problema a estudio es la pseudoartrosis atrófica, lo que lleva implícito una alteración del componente biológico; algo no alcanzable si hubiéramos realizado la fractura de forma cerrada.

Como ventaja añadida, si realizamos la osteotomía de forma abierta podremos situarla siempre en la misma localización, lo que disminuirá la variabilidad entre todos los ejemplares.

Una de las preocupaciones más extendidas en la bibliografía es el instrumental con qué realizar la osteotomía (203). Si bien es cierto que en nuestro caso utilizamos la sierra oscilante aplicando suero salino fisiológico para evitar el sobrecalentamiento del hueso, tal como aconsejan autores como Harrison, Chen o Schoen (204-206), también podríamos haber utilizado sierras manuales aunque desestimamos esta opción por suponer una pérdida de precisión.

5.1.3. Método de fijación del defecto.

Una vez seleccionado el animal idóneo para el estudio, la región anatómica y la técnica con la que vamos a realizar la osteotomía debemos aplicar un método de estabilización que permita mantener la estabilidad del foco creado artificialmente. En este sentido, la industria ha experimentado grandes avances personalizando sistemas de fijación para cada animal y para cada tipo de defecto creado (175, 176). En la actualidad principalmente se utilizan sistemas endomedulares, placas y fijaciones externas.

La primera fijación empleada para estos modelos fue con agujas Kirschner endomedulares; éstas son capaces de aportar una estabilidad relativa, si se emplean como enclavados intramedulares. Es un método sencillo y barato. No obstante, es un sistema incapaz de mantener un defecto óseo sin que éste se colapse y de bloquear rotacionalmente el foco (207, 208). Autores como Hietaniemi y Kokubu (179, 209) publicaron modelos experimentales con agujas endomedulares. Ambos propusieron modelos de pseudoartrosis basados en la inestabilidad del foco de fractura, por lo que la utilización de agujas Kirschner era un método válido.

En nuestro caso, el modelo a desarrollar es una pseudoartrosis atrófica en la que, tanto la estabilidad mecánica como el mantenimiento del defecto óseo, deben estar asegurados para evitar sesgos a la hora de interpretar los resultados. Por este motivo, desestimamos esa opción como método de fijación. Esta decisión se tomó tras la revisión del trabajo de Harrison et al (204)

en el que comparaba diferentes métodos de fijación para obtener un modelo de pseudoartrosis. En este estudio se realizaba una osteotomía de resección de 5mm que se fijaba en uno de los grupos con agujas de Kirschner y en el otro con agujas de Kirschner y un espaciador de cemento. Los resultados confirman la inestabilidad e ineficacia de estos sistemas para conseguir un modelo de pseudoartrosis reproducible.

Por todo lo anteriormente expuesto, este sistema de fijación no se recomienda para modelos experimentales con resecciones de tejido óseo, debido a la inestabilidad y el colapso del defecto óseo que se producen (176, 204, 210).

Existen numerosos dispositivos endomedulares que permiten una estabilización de la fractura con un abordaje mínimo y la carga precoz sobre esa extremidad. Estos dispositivos están creados específicamente para ser bloqueados a través de agujas modificadas (80, 176, 208). Si no se bloquean, permiten la inestabilidad rotacional como ocurre con las agujas de Kirschner.

La evolución de estos sistemas lleva a la creación de dispositivos muy especializados para pequeños roedores como el LockingMouseNail ®; éste presenta agujeros especiales para permitir varios bloqueos otorgando mucha mayor estabilidad al sistema de fijación, además de asegurar el mantenimiento del gap deseado. Como contrapartida presenta un elevado coste que supone este sistema (207).

El inconveniente más reseñable de los implantes endomedulares, además de la inestabilidad rotacional ya solventada con estos nuevos sistemas, es la afectación de la circulación endostal, lo que puede interferir con la actividad celular del foco de fractura (176).

Además de sistemas endomedulares, la industria ha desarrollado todo tipo de placas bloqueadas diseñadas específicamente para cada animal de experimentación. Estas placas preservan el periostio con un diseño de bajo contacto placa-hueso (176), otros modelos como el de Boerckel et al (211), están diseñados específicamente para el estudio del efecto que ejerce la carga sobre la consolidación. Esta propiedad tan característica se consigue gracias a la introducción de segmentos elastoméricos en la placa.

El uso de la placa estaría indicado, sobre todo ante la intención de estudiar la consolidación directa o en modelos de pseudoartrosis con grandes defectos óseos, ya que mantienen con gran precisión dicho defecto (175).

A pesar de todos los avances en la técnica de fijación con placa para animales de experimentación, es necesaria una vía de abordaje bastante agresiva para su colocación, lo que conlleva una alteración del hematoma de fractura,

pudiendo hacer que no sea el modelo de síntesis más adecuado (175). Además para realizar estudios biomecánicos, como en nuestro caso, es preciso retirar la placa y eso implica dejar zonas de debilidad cortical donde se alojaban los tornillos (212).

Los sistemas de fijación externa se han usado con mucha frecuencia en los animales de experimentación (201, 203, 213).

El fijador externo consiste en unas agujas que se fijan al hueso, siempre a distancia del foco de fractura, unidas mediante un marco externo que puede ser simple o circular (176). Pueden dar una estabilidad capaz de mantener un defecto óseo de forma prolongada, además de evitar que algún material de osteosíntesis altere la fisiología de la consolidación al no entrar en contacto con el foco de fractura (214). Con los sistemas actuales, se puede graduar el nivel de estabilidad de relativa a rígida, según nos interese.

Harrison et al (204) presentaron un estudio en 2003, en el que diseñaron un modelo experimental de pseudoartrosis con fijador externo. En él comparaban los resultados obtenidos mediante el análisis radiológico, histológico y biomecánico. A uno de los grupos se le practicó una osteotomía de sustracción de 0,5mm y al otro de 3mm. Pudieron mantener el defecto óseo creado sin complicaciones mayores. Tras 5 semanas, se comprobó radiográfica, histológica y biomecánicamente la consolidación del grupo con la osteotomía de 0,5mm, mientras que los mismos análisis revelaron una pseudoartrosis atrófica en el caso del grupo con la osteotomía de 3mm.

Tanto el uso de placas como de fijadores externos presentan varios inconvenientes, como unos costes elevados, la dificultad para realizar un montaje efectivo así como la debilidad cortical en la zona donde estaban los pines del fijador o los tornillos de la placa (175, 176, 198, 215).

En nuestro modelo, decidimos utilizar como sistema de fijación uno endomedular por diversos motivos. Obviamente, los costes más bajos, así como una sistemática conocida para el equipo fueron unas de las razones. No obstante, los motivos principales fueron el hecho de que un sistema endomedular podría evitar perforaciones en las corticales que alterarían los resultados biomecánicos y la analogía con el sistema utilizado habitualmente en humanos. Dicho de otro modo, cuando tenemos algún tipo de alteración de la consolidación en fémures humanos suele ser en pacientes enclavados, en parte porque es el sistema más utilizado. Por ese motivo, la similitud de la síntesis permite extrapolar los resultados de manera más sencilla.

Otro motivo para elegir el enclavado como método de síntesis fue que para la realización del estudio biomecánico se debe retirar el implante y la cirugía de extracción del tornillo es mucho menos agresiva para el animal.

Para evitar problemas de colapso del defecto óseo o alteraciones rotacionales, utilizamos un tornillo cuya rosca se encastraba en las corticales proximales. Esto hace las veces de bloqueo sin perforar las corticales (Figura 55).



Figura 55: Ejemplo representativo de la estabilización intramedular realizada en nuestro estudio. Merece la pena destacar que se eligió un tamaño de tornillo suficiente para que las espiras se encastrasen en las corticales proximales impidiendo que se produjera ningún tipo de inestabilidad rotacional.

Dadas las dificultades técnicas que conlleva realizar una síntesis endomedular en animales de tan pequeño tamaño y que esta síntesis sea efectiva, numerosas publicaciones describen vías de abordaje para estos animales (210). En nuestro caso, poder realizar un miniabordaje en la rodilla para introducir el tornillo de forma retrógrada fue capital para conseguir la correcta colocación del tornillo.

5.1.4. Creación de una pseudoartrosis atrófica: Modelos y posibilidades.

Entendiendo la pseudoartrosis atrófica como un fallo permanente en la consolidación de una fractura, establecemos que para poder denominarse así en un animal de experimentación, la consolidación debe permanecer estancada durante un periodo prolongado de tiempo, virtualmente durante toda la vida del animal. En estudios previos como los realizados por García (173) y Histing (176, 216), se toma como punto de referencia entre las 12 y las 15 semanas.

En la literatura se distinguen básicamente dos métodos para generar una pseudoartrosis experimental: uno es la creación de un defecto óseo crítico (entre 3 y 8mm) y el otro es la creación de un defecto óseo menor de 3mm al que se le suma un efecto agresor sobre el periostio y demás partes blandas circundantes (Tablas 40 y 41).

Discusión.

Autor	Tipo de fijación	Tipo de defecto	Tiempo de seguimiento	Tasa de pseudoartrosis radiológica
Creación de un defecto óseo				
Hsu e al.(217)	Placa de polietileno	6 mm osteotomía	8 semanas	100%
Pek et al.(218)	Placa metálica	5 mm osteotomía	5 meses	100%
Zhang et al.(219)	Placa radioluciente	7 mm osteotomía	12 semanas	100%
Einhorn et al.(220)	Fijador externo	6 mm osteotomía	12 semanas	100%
Hunt et al.(221)	Miniplaca AO 1.5 mm.	4 mm osteotomía	8 semanas	100%
Burastero et al.(222)	Placa PMMA	6 mm osteotomía	16 semanas	100%
Harrison et al.(204)	Fijado externo	3 mm osteotomía	5 semanas	100%
Montijo et al. (210)	AOlockingnail	5 mm osteotomía	8 semanas	90%
Schwarz et al. (223)	Fijador externo	5 mm osteotomía	6 semanas	100%
Poser et al. (198)	Fijador externo	5 mm osteotomía	12 semanas	96%

Tabla 40: Bibliografía actual referente a la creación de un modelo de pseudoartrosis atrófica a través de un defecto óseo crítico.

Discusión.

Autor	Tipo de fijación	Tipo de defecto	Tiempo de seguimiento	Tasa de pseudoartrosis radiológica
Creación de un defecto óseo				
Hietaniemi et al. (206)	Pin intramedular	0 mm + cauterización periostio y fresado endostal	57 semanas	100%
Hak et al. (9)	Pin intramedular	Fractura cerrada y cauterización periostio	6 semanas	100%
Schoen et al. (203)	Pin intramedular	5 mm. osteotomía + irrigación de foco	12 semanas	100%
Dickson et al. (224)	Fijador externo	Osteotomía, irrigación del foco y fresado	14 semanas	87,50%
Kaspar et al. (225)	Fijador externo	0,5 mm. eliminación foco fractura y cauterizado periostio	8 semanas	100%
Nuestra serie	Tornillo intramedular	2 mm. lavado foco, desperiostización y fresado endomedular	12 semanas	93,3%

Tabla 41: Bibliografía actual referente a la creación de un modelo de pseudoartrosis atrófica a través de un modelo combinado consistente en una osteotomía y la lesión de partes blandas (periostio y/o hematoma de fractura).

El defecto óseo crítico, puede definirse como la mínima resección ósea realizada tras la osteotomía que evita que el hueso del animal consolide durante todo su periodo de vida (198, 224). De forma genérica la bibliografía actual considera que el defecto debe ser de 1,5-3 veces el diámetro del hueso del animal oscilando, en el caso de la rata, en torno a los 5-8 mm (225).

En el caso de la osteotomía con un defecto óseo menor y un gesto agresor sobre el proceso de consolidación, se han publicado todo tipo de técnicas: lesión del periostio, fresado endomedular, interposición de partes blandas o de cemento, irrigación continua del foco de fractura, etc.

La interposición de tejidos blandos fue la primera técnica empleada en modelos de pseudoartrosis. Este modelo es capaz de crear una pseudoartrosis de manera efectiva. Sin embargo, la interposición de partes blandas de forma permanente no presenta similitud alguna con la situación clínica; es inexistente. En otros casos, como el publicado por Skaliczki (226) se interpone cemento acrílico entre los fragmentos. Esta situación es más comparable con la clínica real y además obtiene unos resultados del 100%

Skaliczki (226) publicó un estudio en 2013, en el que trataba de averiguar la efectividad del injerto óseo recubierto de albúmina. El grupo control lo consigue mediante la realización de una osteotomía de sustracción de 2 mm. a la que interpone cemento óseo durante las 4 primeras semanas para evitar la consolidación. Posteriormente realizan el diagnóstico de certeza mediante pruebas de imagen con TC3D (scanner tridimensional). Si bien es cierto que en todos los casos consigue una pseudoartrosis, con ese defecto de sustracción, no debemos olvidar la interposición del cemento, lo que hace de este método una técnica combinada.

Thormann (227) operó 45 hembras de rata Sprague-Dawley. Realizó una osteotomía en cuña de 4mm de máxima separación. Para la estabilización usó una placa bloqueada e interpuso cemento con ranelato de estroncio para valorar la efectividad del mismo. Nuevamente, este fue un método combinado de osteotomía y separación del foco. Aunque la resección era de 4mm en la zona de mayor separación, en la zona de menor separación esta era de 0,5mm.

La alteración del periostio mediante electrocauterio es otro procedimiento utilizado a menudo (228, 229). Es una técnica muy efectiva para impedir la consolidación de la fractura. De hecho autores como Kaspar (228), obtienen una tasa de pseudoartrosis en su modelo del 100%. Aunque sea una técnica muy efectiva, por eliminar el gran potencial consolidatorio del periostio,

nosotros creemos que, al no ser una práctica habitual durante las intervenciones en humanos, no debería utilizarse.

Chaubey y Poser (198, 230) proponen la desperiostización de los márgenes de la fractura como método agresor del foco, consiguiendo resultados satisfactorios; así mismo supone un método menos agresivo y más similar a lo que ocurre en las cirugías en seres humanos.

Tras la revisión de varios estudios (175, 176, 216), establecimos 2 mm. como la distancia más efectiva para reseca en las técnicas mixtas. Como la interposición de cemento y la cauterización perióstica no son técnicas habituales en la práctica clínica, decidimos emplear la eliminación del foco de fractura con la irrigación continua de suero salino fisiológico durante la cirugía, así como la desperiostización de los bordes fracturarios, pues según la bibliografía actual es tanto o más efectiva que las técnicas anteriormente descritas (175, 216, 230).

En definitiva, en la literatura existen ejemplos de los dos tipos de modelos, prefiriendo uno u otro modelo en función del tipo de efecto que se quiera conseguir (216). Dicho de otro modo, en el caso de establecer una pseudoartrosis atrófica con un gran defecto óseo estaría indicado el modelo del defecto óseo crítico (entre 3 y 8 mm.) (216). Si lo que se precisa simular, es una situación postquirúrgica que conduce a una pseudoartrosis, estaría indicado un modelo combinado de defecto de menor tamaño y lesión variable del foco de fractura, como ocurre en una cirugía (181).

Dado que simulan efectos diferentes, ambos modelos no son comparables entre sí. En nuestro caso optamos por un modelo combinado debido a que la intención de este estudio no es otra que valorar si un tratamiento farmacológico puede ayudar a la consolidación de una pseudoartrosis postquirúrgica.

Como se puede ver en la tabla, la mayoría de los estudios se prolongan entre las 4 y 16 semanas. La razón de mantener el tratamiento más allá del mes tiene relación con la evaluación de los efectos del tratamiento a largo plazo (9, 210). En nuestro caso, no sólo debíamos comprobar los posibles efectos adversos del ranelato de estroncio, sino que al tratarse de una pseudoartrosis la literatura aconseja unos tiempos de tratamiento más prolongados (176, 216).

Para el diagnóstico de pseudoartrosis, así como para valorar la efectividad de los tratamientos es importante realizar los estudios adecuados para demostrar la efectividad del tratamiento.

La primera prueba a realizar son los controles radiográficos, es la primera prueba de elección en la clínica práctica y por tanto, es uno de los estudios

más habituales en los estudios experimentales. Se realizan sobre todo si hay implantes, para asegurarse de su correcta colocación, así como para valorar durante todo el proceso la evolución de la pseudoartrosis.

Cuando se trata de roedores se presenta una dificultad añadida, la realización de radiografías válidas y evaluables. Lo ideal es obtener dos proyecciones que nos permitan evaluar las 4 corticales del hueso. Mediante anestesia general pudimos realizar los controles establecidos.

Existen dudas sobre cuando se deben realizar los controles radiográficos. En la bibliografía suelen realizar controles radiográficos al principio y al final del estudio (198, 230, 231) . Aun así, existen excepciones como Cebesoy (159) que realizan controles semanales. En nuestro estudio decidimos realizar un control a la semana, para asegurarnos de que el implante cumplía sus dos funciones: dar estabilidad mecánica y evitar el colapso del defecto óseo creado. Así mismo, dado que tenemos un grupo control de fractura (A1), realizamos un control a la mitad del tiempo de duración del estudio (6 semanas) a todos los grupos. Por último realizamos, un último control radiográfico a las 12 semanas de tratamiento (fin del estudio), que es el más interesante desde el punto de vista de los objetivos principales del estudio.

Llama la atención en la bibliografía actual la falta de especificación en cuanto al número de observadores que evalúan las radiografías, así como su capacidad de acuerdo, identificada mediante el índice de Kappa (232). Así mismo, no hay consenso en cuanto al tipo de escala de valoración de la consolidación utilizar haciendo que los estudios sean poco comparables.

La escala que utiliza Oakes et al (232) otorga puntos en función de qué porcentaje del hueso esté consolidado (0: 0%, 1: 0% - 25%,2: 26% - 50%, 3: 51% - 75%, 4: 76% - 99%, 5: 100). Sin embargo, Zhao et al (203) gradúan de 0 a 6 la densidad y homogeneidad del material que rellena el defecto (1: material radiodenso en el defecto óseo, 2: material radiodenso pero que no cubre completamente el defecto, 3: relleno del defecto con material no homogéneo, 4: relleno con material homogéneo, pero siguiéndose visibles los bordes óseos, 5: una de las dos corticales ha sido sustituida por hueso nuevo, 6: hueso nuevo cubriendo todo el defecto). Otros autores simplemente describen los hallazgos, sin utilizar escala alguna, lo que dificulta notablemente la comparación de resultados (179, 204, 209, 228).

A diferencia de todos los autores anteriormente mencionados, en el presente estudio se decidió comparar el número de corticales que consolidan en cada proyección. Ésta es la escala más utilizada por los cirujanos traumatólogos en la práctica clínica, para decidir si una fractura está consolidada y dado que los

observadores pertenecían a este campo no suponía ningún problema para los mismos.

Aunque radiográficamente podamos diagnosticar de pseudoartrosis a los animales de experimentación, la prueba de certeza nos la dará el análisis histológico. Las tinciones más habituales son hematoxilina-eosina, que valora la cantidad de osteoide neoformado y el tricómico de Masson para valorar la fibrosis existente (188, 230).

La mayoría de los autores se limitan a describir los hallazgos encontrados (198, 204, 229), no obstante esto hace que sea muy difícil comparar los resultados y obtener conclusiones. Una de las escalas existentes es la valoración semicuantitativa publicada por Allen (188, 209). Sin embargo, al no realizar este autor ningún análisis estadístico con sus resultados no es posible una comparación con los obtenidos en el presente estudio.

En la actualidad, cada vez son más autores los que incluyen en sus estudios los ensayos biomecánicos como método de estudio. Brüel et al (147) somete las muestras obtenidas a ensayos de flexión en 3 puntos así como de nanoindentación. En el presente trabajo se decidió emplear 4 puntos de flexión en vez de 3 con un objetivo claro; eliminar las fuerzas de cizalla producidas en el punto central donde se aplica la fuerza, ya que estas fuerzas adicionales pueden enmascarar los resultados (Figura 56).

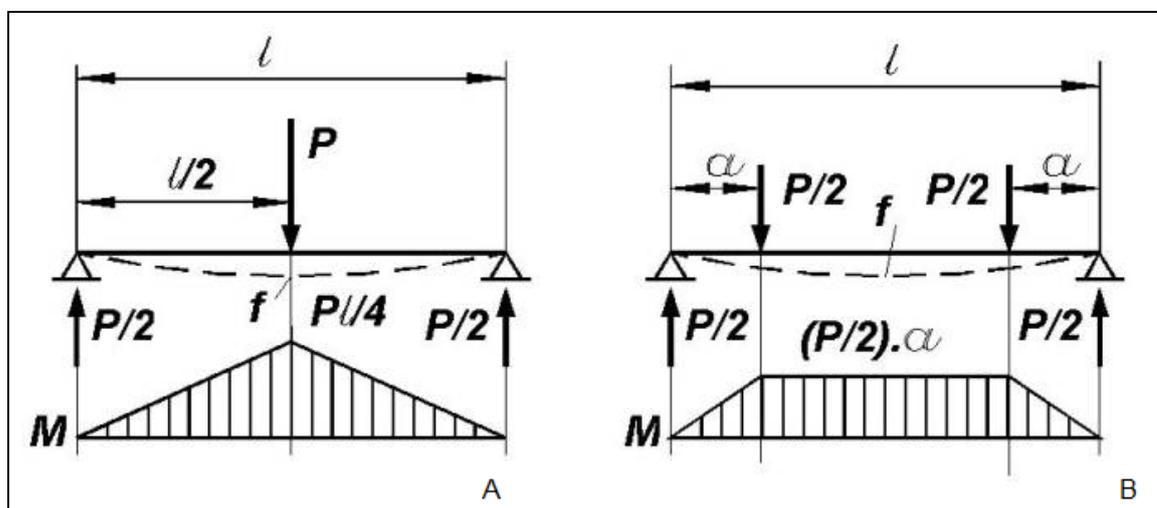


Figura 56: (A) Gráfico representativo del ensayo de flexión en tres puntos. (B) Gráfico representativo del ensayo de flexión en cuatro puntos. Como se puede ver la fuerza se reparte de forma homogénea a lo largo de la probeta del ensayo de 4 puntos eliminando la fuerza de cizalla que se encuentra en el ensayo de tres puntos. Aunque éste último es menos exacto, su mayor sencillez de realización hace que sea el esquema más propagado. Imágenes tomadas de Podskrebko. Resistencia de Materiales: Manual de Laboratorio, Minsk, Amalfeya, 2001; 272.

Al utilizar 4 puntos de apoyo se consigue que la fuerza se aplique de forma casi constante a lo largo de toda la probeta, eliminando ese posible factor de confusión (183).

Cattani-Lorente (155) demuestra con estudios de flexión en 4 puntos y de microindentación cómo la administración in vitro del RE es capaz de mejorar las características biomecánicas en el hueso osteoporótico. Es por estos resultados, por los que el presente estudio decide emplear ambas técnicas, ya que son las que menores sesgos ocasionan aportando una información muy valiosa sobre las propiedades biomecánicas de las muestras estudiadas.

5.2. Efecto del ranelato sobre la consolidación de fracturas y pseudoartrosis experimentales.

El ranelato de estroncio es un fármaco conocido por su utilización en pacientes osteoporóticos; en numerosos estudios ha demostrado reducir las fracturas vertebrales, no vertebrales y de cadera en mujeres osteoporóticas (158, 233).

Este fármaco ha demostrado un aumento de la resistencia del tejido y de la masa ósea, así como una disminución del número de osteoclastos en estudios experimentales en roedores (148, 153, 234). En relación con los osteoblastos, el RE estimula la proliferación y diferenciación celular mediada por la vía Wnt- β -catenina y eleva los niveles de fosfatasa alcalina, sintetizada por los osteoblastos y esencial en el proceso de formación ósea (235).

Además, algunos autores como Ammann (153) han señalado que el RE sólo estimula la actividad osteoblástica en el remodelado óseo, sino que también podría favorecer la formación de tejido óseo “de novo” (150, 152, 153, 236).

El interés que despierta la posibilidad de que la administración de un fármaco favorezca la consolidación de las fracturas ha llevado a la realización de numerosos estudios experimentales para valorar hasta qué punto esto es cierto. Se han publicado diversos estudios experimentales que valoran el efecto del ranelato de estroncio sobre la consolidación de las fracturas osteoporóticas y no osteoporóticas. Estos estudios se comentan en la sección siguiente. Hasta la fecha, solamente se han publicado casos clínicos de pseudoartrosis tratadas exitosamente con el ranelato de estroncio.

5.2.1. Efecto del ranelato de estroncio en la consolidación de fracturas y pseudoartrosis en modelos experimentales osteoporóticos.

Algunas publicaciones, basadas en la opinión de pacientes con fracturas osteoporóticas o de los médicos que las han manejado, sugieren que el tratamiento previo con RE podría acortar el periodo de convalecencia y acortar la consolidación (237). La evidencia aportada por estas observaciones no controladas es limitada. Sin embargo, justifican el interés en abordar esta cuestión experimentalmente.

La consolidación de las fracturas se ve claramente alterada en animales de experimentación ovariectomizados (147, 238). Frente a ellos, varios estudios han demostrado que el tratamiento con ranelato de estroncio tiene efectos favorables sobre el volumen, la microarquitectura y las propiedades biomecánicas del callo de fractura (160, 161, 239).

Li (160) en un modelo de osteotomía de tibia proximal estabilizada con un sistema endomedular en ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas, encontró que el ranelato de estroncio, a dosis de 450mg/kg/día, aumentaba la densidad mineral ósea un 28% a las 4 semanas ($p=0.01$) y un 16% más a las 8 semanas de tratamiento ($p=0.05$).

En el análisis histológico a las 4 semanas se hallaban signos claros de osificación endocondral en el grupo de tratamiento. El tejido presentaba mayor cantidad y mayor densidad trabecular que el grupo placebo. A las 8 semanas, el grupo tratado presentaba signos más avanzados de remodelado del callo de fractura, con una mayor cantidad de hueso laminar en el foco de fractura.

Estos hallazgos histológicos concuerdan con los obtenidos a partir del estudio con microTC, que mostró la unión a las 8 semanas con una mayor tasa de mineralización en el grupo tratamiento. Así mismo, el ensayo de flexión en tres puntos reveló un aumento de todos los parámetros biomecánicos en el grupo que recibió RE, presentando a las 8 semanas un aumento de un 61% en resistencia, así como una capacidad aumentada en 2,8 veces para la absorción de fuerzas sin sufrir deformación (160).

Ozturan (161) presentó en 2011 un estudio en el que, por vía anterolateral, realizaba una osteotomía en la tibia de 40 ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas, a las que se les fijaba la fractura de forma endomedular con una aguja de Kirschner. Era un estudio comparativo en el que a un grupo se le administra RE, a dosis de 450mg/kg/día y al otro se le administra un placebo. A la 6ª semana se procedía a la eutanasia de los animales y el análisis radiológico, histológico y biomecánico de las tibias. En el análisis radiológico, la

puntuación obtenida de los animales tratados con ranelato de estroncio fue significativamente superior que la del grupo control ($2,7\pm 0,6$ vs $2,2\pm 0,7$; $p=0,001$). El análisis biomecánico (ensayo de flexión en tres puntos) demostró un aumento del 56% de resistencia comparado con el grupo control ($p=0,006$), así como un incremento significativo de la dureza ($p=0,001$). El análisis histológico confirmó que en el grupo tratado con RE aparecía una mayor cantidad de hueso nuevo en el foco de fractura ($p=0,038$) (161).

Se ha publicado un estudio comparativo que valora la efectividad del RE y de teriparatida (239). En él, se procede a la ovariectomía de 60 ratas Sprague-Dawley y se les provoca una fractura diafisaria cerrada. Tras 4 semanas de tratamiento se procede al estudio de las muestras mediante microCT y ensayos biomecánicos demostrando que, aunque tanto el RE como la teriparatida aumentaban el volumen del callo de fractura (46% RE vs 32% teriparatida), solamente el RE lo hacía de forma estadísticamente significativa ($p=0,01$). Así mismo, en este estudio experimental llevado a cabo por el equipo de Habermann (239) se demostró que el callo producido en el grupo tratado con RE presentaba unas propiedades biomecánicas más favorables, con un aumento de la resistencia a la torsión (44% de aumento de resistencia $p=0,05$).

Todos los datos preclínicos publicados hasta la fecha apoyan la idea de que el RE, puede ser una solución viable para mejorar la capacidad de consolidación de las fracturas en el paciente osteoporótico (137).

Teniendo en cuenta que la osteoporosis no es la única situación en la que la capacidad de consolidación puede verse alterada, merece la pena estudiar si en otras situaciones similares, el RE representa una solución al problema.

Thormann et al (227) crearon un modelo de pseudoartrosis con un defecto crítico de 4mm estabilizado con una placa. Incluyeron 45 ratas Sprague-Dawley a las que dividieron en tres grupos: al primero se le introduce en el defecto cemento con RE; al segundo, cemento con fosfato tricálcico, y al tercer grupo nada. Los análisis histológicos e inmuno-histoquímicos a las 6 semanas revelaron un aumento estadísticamente significativo de la formación ósea en el grupo con ranelato de estroncio

Zacchetti et al (240) desarrollaron un estudio en ratas Sprague-Dawley de 6 meses de vida, lo que supone una edad avanzada para una rata, en el que valoraron la capacidad de RE para acelerar el relleno de un defecto 10mm^3 de volumen en la metáfisis tibial.

Las ratas fueron divididas en dos grupos: al primero se le administró RE (625mg/kg/día.) y al otro un placebo. Tras 4, 8 y 12 semanas se examinaron los

defectos mediante microCT y ensayos biomecánicos de nanoindentación. No sólo se encontró una mejora significativa de la calidad ósea cortical y esponjosa, sino que además, tras 4 semanas de tratamiento, los parámetros de formación ósea en el defecto creado tendieron ya a ser mayores en el grupo tratado, si bien la diferencia con el grupo control no era estadísticamente significativa. En los controles realizados a las 8 y 12 semanas esa diferencia se hizo mucho más llamativa, alcanzando la significación estadística (240% $p = <0,01$ y 168% $p = <0,01$, respectivamente). Estos resultados demuestran por tanto que el ranelato de estroncio es capaz de acelerar la consolidación y el relleno de defectos óseos creados.

Además de lo anteriormente expuesto, los estudios preclínicos también estudian la capacidad del ranelato de estroncio para mejorar la osteointegración de los implantes (155, 241, 242). Estudios realizados por Li et al (241) demuestran que tras 8 semanas de tratamiento no sólo se mejora la resistencia al desanclaje en un 34% ($p=0,05$), sino que el tejido óseo periimplante mejora sus propiedades biomecánicas (elasticidad y fuerza) de forma significativa ($p=0.05$).

Si tenemos en cuenta que la estabilidad mecánica es una condición imprescindible para la consolidación de la fractura (76), cualquier medida que mejore la resistencia y estabilidad del implante resulta interesante.

5.2.2. Efecto del ranelato de estroncio en la consolidación de fracturas y pseudoartrosis en modelos experimentales no osteoporóticos.

Boyd et al (231) analizó el efecto del RE a la hora de aumentar los parámetros biomecánicos del tejido óseo en animales no osteoporóticos. En él 24 ratas Fischer de 6 semanas se dividieron en dos grupos; al primero se le administró RE (a dosis 900mg/Kg/día) durante 104 semanas y al segundo grupo se le empleó como control con la administración de placebo. Tras el tratamiento se sacrificó a los animales y se realizó una densitometría así como un microTC y análisis de elementos finitos. Nota general: lo habitual es comentar los estudios redactando en pasado, no en presente.

Entre los resultados destaca un aumento de la estructura trabecular (40% $p < 0,01$) así como un aumento de la densidad mineral ósea (34% vs 27%). Analizando el contenido total de RE en el volumen óseo total de la muestra (Estroncio $R^2=0.013$, $p=0.74$, $N=11$ y $DMOR^2= 0.153$, $p=0.23$, $N=11$ respectivamente) se descarta que este aumento diagnosticado mediante densitometría no sea un artefacto por la presencia del mineral estroncio en hueso (155, 231).

En cuanto al análisis elementos finitos, se detectó un aumento de los parámetros de fuerza (22% $p < 0,01$) así como un aumento en la capacidad de resistencia a la carga del 29% ($p < 0,01$) en comparación con el grupo control (231). Todos estos resultados son similares a los publicados previamente, instando a los investigadores a estudiar el papel de este tratamiento como acelerador de la consolidación.

En este sentido Cebesoy (159) realizó el primer estudio experimental sobre fracturas en animales no osteoporóticos. En él incluyó 42 ratas Wistar a las que realizó fracturas cerradas en la tibia, inmovilizándolas después con una férula externa. Se dividieron los animales en dos grupos. A uno de los grupos se le administró un placebo; al otro, una dosis de 450mg/Kg/día de RE. A la 2ª, 3ª y 4ª semana se procedió a la eutanasia de 7 animales por grupo para realizar el estudio radiográfico e histológico. Las radiografías mostraban un aumento de la consolidación en las ratas con tratamiento; no obstante la diferencia a las 2, 3 y 4 semanas no fue estadísticamente significativa ($p = 0,52$, $p = 0,19$ y $p = 0,74$ respectivamente). Los hallazgos histológicos no mostraron mejores resultados, pues aunque se refiere cierta progresión en la formación del callo de fractura; nuevamente las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas ($p = 1$, $p = 0,52$ y $p = 1$, respectivamente).

En base a los resultados radiográficos e histológicos obtenidos en el estudio de Cebesoy, se puede concluir que la administración del ranelato de estroncio, no presenta un efecto beneficioso en la consolidación. No obstante en este estudio no se realizó ninguna densitometría ni ensayo biomecánico que valorasen el aumento de la resistencia y de la fuerza en el callo de fractura.

Si bien este es un estudio sobre fracturas cerradas, que a priori debería facilitar la consolidación de las fracturas, lo cierto es que 4 semanas es tiempo insuficiente para la consolidación de las mismas (216). Además el hecho de que el método de fijación sea tan precario hace que nos planteemos si la inestabilidad mecánica en el foco de fractura podría ser la causa de los unos resultados tan pobres (181, 216).

Brüel et al (147) presentaron un estudio en 2011, con 84 ejemplares de ratas Wistar a los que se provoca una fractura cerrada en la tibia, estabilizada con un clavo endomedular, solucionando así el problema de la inestabilidad mecánica del estudio de Cebesoy (159). Dividieron la muestra en 4 grupos: el primer grupo se mantuvo con vida 3 semanas y recibió RE; el segundo grupo se mantuvo con vida 3 semanas y recibió un placebo; el tercer grupo se mantuvo con vida durante 8 semanas en tratamiento con RE; y el último grupo se mantuvo con vida 8 semanas y recibió un placebo. Posteriormente se procedió a la realización de densitometría, análisis biomecánico

(nanoindentación y ensayos de flexión en tres puntos) y examen macro y microscópico del callo de fractura. Tras 3 semanas de tratamiento, se encontró un aumento del volumen del callo de fractura del 33% ($188 \pm 39 \text{mm}^3$ vs $142 \pm 42 \text{mm}^3$ $p=0,01$) en el grupo tratado. A las 8 semanas esa diferencia no era estadísticamente significativa. En cuanto a los ensayos biomecánicos, el tratamiento con RE no influyó de manera significativa en los parámetros de dureza y elasticidad.

Aunque en el estudio de Brüel (147) se encontró un aumento del volumen del callo de fractura, no pudo demostrarse efecto alguno sobre el remodelado óseo. Es decir el RE se incorpora en el callo, pero no encuentran una mejoría en cuanto a las propiedades biomecánicas del mismo. Se detectó un descenso del 50% del módulo de Young tras 3 semanas de tratamiento, indicando que la rigidez del callo se reduce con el tratamiento del RE. A las 8 semanas el descenso en los valores de elasticidad había desaparecido llegando a los niveles del grupo control (147). Esto debe ser interpretado con cautela, pues aunque en los estudios expuestos en el apartado anterior (161, 239) el tratamiento con ranelato de estroncio mejoraba los parámetros de fuerza y elasticidad, este hueso era osteoporótico y por tanto con parámetros alterados. En los animales ovariectomizados está ampliamente demostrada la pérdida de resistencia del tejido óseo (238), por tanto al tratarse de animales no osteoporóticos ese aumento de resistencia, puede no ser efectivo porque sus valores de base son superiores.

En cualquier caso, hay que tener claro que cuando se calcula el módulo de Young el material estudiado debe ser homogéneo, premisa que en este caso no se cumple pues el callo de fractura está formado por tejido fibroso, cartilago y tejido óseo neoformado (243).

Por todo lo anteriormente expuesto, Brüel sugiere que el ranelato de estroncio puede mejorar las propiedades biomecánicas del tejido óseo en casos de alteraciones de la consolidación como en osteoporosis o pseudoartrosis (147). No obstante, hasta la realización de nuestro estudio, no se ha publicado ningún estudio referente a la efectividad del ranelato de estroncio en casos de pseudoartrosis.

5.3. Influencia del tratamiento con Ranelato de Estroncio en el modelo experimental.

El proceso de consolidación de una fractura es un proceso biológico muy complejo (37). Aunque la mayoría de las fracturas consolidan satisfactoriamente, un pequeño porcentaje evolucionará a la pseudoartrosis; en muchos casos obligará al paciente a someterse a nuevos procedimientos quirúrgicos. Se han realizado numerosos esfuerzos encaminados a desarrollar métodos menos agresivos para el tratamiento de las pseudoartrosis (9).

Hasta la fecha todos los estudios publicados sobre el ranelato de estroncio eran bien sobre animales normales o bien sobre animales osteoporóticos, pero centrados en la consolidación “habitual” de fracturas. No se ha publicado ningún estudio experimental sobre el efecto de este fármaco en otras alteraciones de la consolidación, como las pseudoartrosis atróficas. El presente estudio es el único que estudia este fenómeno.

Es cierto que los animales empleados en el presente estudio no presentan osteoporosis, pero al realizar todo tipo de agresiones sobre el foco de osteotomía creado (defecto óseo, desperiostización e irrigación del foco) creamos una situación de alteración de consolidación que se tradujo en una pseudoartrosis atrófica.

Dado que la consolidación de las fracturas sigue el mismo proceso que la remodelación continua propia del tejido óseo, determinados tratamientos utilizados para el control del turn-over óseo deberían ser considerados como una terapia potencial en los casos en que la consolidación de la fractura se ve alterada (244). La posibilidad de favorecer farmacológicamente la consolidación de las fracturas ha llevado a la publicación de muchos estudios experimentales sobre la utilidad del ranelato de estroncio en la consolidación de fracturas osteoporóticas y no osteoporóticas además de la fijación de los implantes que prevengan fracasos consolidatorios (241); no obstante, como acabamos de mencionar, no se ha estudiado la posible influencia del RE en la consolidación de pseudoartrosis atróficas ya establecidas.

Aunque en todos los estudios realizados con RE se estudió la misma molécula y el efecto que puede tener, existen variaciones en cuanto a dosis y duración del tratamiento (Tabla 42).

Como se puede ver en la tabla 42 no hay consenso en cuanto a la dosis a administrar. Se han utilizado dosis entre 225 y 900 mg/Kg/día para alcanzar niveles efectivos del fármaco (153). Destacan dos dosis; la de Cebesoy, Yalin y Ozturan (159, 161, 245) consistente en 450-500 mg/Kg/día. y la de autores

como Habermann, Boyd y Brüel (147, 231, 239) que emplean una dosis de 900mg/Kg/día. En el primer caso, los autores defienden utilizar esta dosis por ser la necesaria para conseguir unos niveles equivalentes a los presentados por los pacientes en tratamiento con este fármaco.

Discusión.

Autor	Dosis	Duración del tratamiento	Vía de administración del fármaco.
Yalin et al (245)	500 mg/Kg/día	17 semanas	Administración oral
Ozturan et al (161)	450 mg/Kg/día	6 semanas	Mezclado con la comida
Brüel et al (147)	900 mg/Kg/día	8 semanas	Mezclado con la comida
Li et al (160)	625 mg/Kg/día	8 semanas	Mezclado con la comida
Wu et al (246)	308 mg/kg/día	16 semanas	Administración oral
Boyd et al (231)	900 mg/Kg/día	104 semanas	Mezclado con la comida
Cebesoy et al (159)	450 mg/Kg/día	4 semanas	Mezclado con la comida
Habermann et al (239)	900 mg/Kg/día	4 semanas	Administración oral
Zacchetti et al (240)	625 mg/Kg/día	12 semanas	---
Serie del estudio	900 mg/Kg/día	12 semanas	Adminsitación oral (vía nasogástrica)

Tabla 42: Revisión bibliográfica de la duración, dosis y vía de administración del RE en los diferentes estudios actuales con dicho fármaco.

Sin embargo, dado que eran estudios experimentales, los demás autores aumentaron la dosis hasta conseguir el doble de los niveles terapéuticos necesarios y asegurar así la detección de los efectos biológicos que pudieran producirse. En nuestro caso también decidimos emplear la dosis de 900 mg/Kg/día con este mismo objetivo.

Además de la dosis establecida, la duración del tratamiento también fue variable, oscilando entre las 4 semanas y 16 semanas como norma general (153). En todos los casos publicados se investiga la efectividad del fármaco en fracturas no en pseudoartrosis, por tanto un tratamiento de 4-6 semanas parece adecuado. En el presente trabajo se investigó el efecto sobre una pseudoartrosis y dado que el tiempo hasta la confirmación de la pseudoartrosis en roedores es de 12 semanas aproximadamente, parecía adecuado prolongar el tratamiento hasta ese momento.

Merece la pena destacar que aunque en todos los estudios experimentales la administración era por vía oral, bien administrado sólo o bien mezclado con la comida. Durante la realización del estudio, fue realmente complicado que los animales tomaran el fármaco así que tuvimos que recurrir a la administración con sonda nasogástrica. Solamente el estudio de Wu (246) menciona cierto grado de complejidad al hacer que los animales ingirieran el fármaco. Otros autores (147, 159, 161, 231, 241) mezclaron el fármaco con la comida que compartían varias ratas, lo que hace muy difícil valorar si todos los animales adquieren la misma cantidad de fármaco. En algunos casos, como en los trabajos de Li et al o Brüel et al (147, 160), en que no encontraban un efecto estadísticamente significativo en sus resultados la causa pudo haber sido la administración errática del fármaco.

5.3.1. Influencia del ranelato de estroncio en el estudio radiológico.

Los resultados de las pruebas de imagen realizadas en los diferentes estudios publicados deben interpretarse con cautela pues como ya hemos dicho las dosis, los tiempos de duración del tratamiento, el tipo de patología a tratar son diferentes. Este trabajo es el primero en abordar un modelo de pseudoartrosis tratado con RE por tanto lo compararemos con los modelos de fracturas teniendo en cuenta en todo momento este hecho.

Si analizamos la literatura existente vemos que en primer lugar el método de imagen utilizado para el seguimiento es diferente, algunos emplean μ TC mientras que otros el análisis radiográfico. Dado que el seguimiento habitual de las fracturas, en la clínica práctica, se realiza con pruebas radiográficas se decidió emplear las mismas como método de seguimiento. Esto sumado al

hecho de que la utilización de un μ TC3D hubiera incrementado en gran medida el coste del estudio.

Brüel et al (147) analiza el callo de fractura formado en ratas no osteoporóticas mediante el seguimiento radiográfico. A las tres semanas encontró un aumento del volumen del callo del 33% en las ratas tratadas con RE, tras 8 semanas encontró una disminución del callo haciendo que no se encontraran beneficios estadísticamente significativos de este tratamiento. El hecho de que el fármaco se administrase mezclado con la comida hacia muy difícil cuantificar los niveles del fármaco en cada animal, por tanto es difícil saber hasta qué punto estos resultados son válidos.

Cebesoy et al (159) evalúa el volumen de callo de fractura formado tras 4 semanas de tratamiento con ranelato de estroncio a dosis de 450 mg/Kg/día. mezclado con la comida. Tras el análisis radiográfico no encontró aumento significativo del volumen del callo. Nuevamente la dosis que recibe cada animal de experimentación queda en entredicho tras administrarlo mezclado con la comida así mismo la duración del tratamiento era más baja de lo recomendado (216).

Ozturan et al (161) analiza la madurez del callo de fractura radiográficamente a través de la escala de madurez del callo de Goldberg (I: pseudoartrosis, II: En proceso de consolidación, III: consolidación completa). Tras esta evaluación encontró una mayor madurez del callo en el grupo tratado con ranelato de estroncio ($p=0.001$).

Li et al (160) utiliza al igual que Ozturan la escala de Goldberg para la valoración de la madurez del callo de fractura en las radiografías. Encontró tras 8 semanas de seguimiento la madurez absoluta en los callos de fractura del grupo de RE. Posteriormente se analizó mediante TC3D cada callo de fractura encontrando un mayor nivel de maduración del callo de fractura en el grupo del ranelato de estroncio.

En nuestro estudio, valoramos la consolidación radiográfica de la fractura en función del número de corticales que se mostraban consolidadas en las dos proyecciones obtenidas. El tratamiento con ranelato de estroncio consiguió un callo de fractura completamente consolidado en el 46% de los casos tras 12 semanas en el estudio con radiología simple.

5.3.2. Influencia del ranelato de estroncio en el estudio histológico.

En la clínica práctica, el análisis del tejido del foco de pseudoartrosis no sirve como método diagnóstico sino como prueba de comprobación (9). Esto es debido a que sólo se obtienen muestras cuando la pseudoartrosis está diagnosticada y se procede a la cirugía de rescate. Sin embargo en los estudios experimentales el análisis histológico nos dará un diagnóstico de certeza acerca del tipo de tejido que encontramos en el foco de fractura o pseudoartrosis.

Aunque en la literatura actual no existen modelos de pseudoartrosis tratados con RE, en los modelos experimentales de fractura, Cebesoy et al (159) analiza la formación de callo óseo a las 2, 3 y 4 semanas post-fractura en dos grupos de ratas, uno tratado con RE y el otro con placebo. Encuentra progresión de consolidación en ambos grupos, sin hallar evidencias estadísticamente significativas entre ellos. En este estudio emplearon tinciones de hematoxilina-eosina clasificando las muestras según el grado de consolidación (1: tejido fibroso, 2: predominancia de tejido fibroso con alguna célula cartilaginosa, 3: tejido fibroso y cartilaginoso en la misma proporción, 4: totalidad de la muestra compuesta por tejido cartilaginoso, 5: predominancia de cartílago con la aparición de espículas de hueso neoformado, 6: misma proporción de tejido cartilaginoso y óseo, 7: predominancia de tejido óseo con alguna célula cartilaginosa, 8: totalidad de la muestra compuesta por hueso neoformado, 9: hueso neoformado con pequeñas partes de hueso maduro, 10: hueso maduro). Dicha escala, es comparable a la escala de Allen (185), utilizada en nuestro estudio.

Ozturan et al (161) analiza histológicamente sus resultados en ratas osteoporóticas con la misma sistemática y clasificación de Cebesoy, hallando en las muestras de ratas tratadas con ranelato de estroncio más hueso neoformado que en el grupo control ($P=0.038$).

En el trabajo de Li et al (160) el grupo tratado con RE presenta mayor número y densidad trabecular que en el grupo no tratado, siendo la cantidad de hueso neoformado mayor a las 8 semanas en el grupo tratado con ranelato de estroncio.

En nuestro estudio podemos ver en el análisis macroscópico de las muestras como la diferencia entre unos grupos y otros es evidente. Por un lado el grupo de fractura (A1) y el de osteotomía de sustracción (OS), tratadas con RE (B), muestran un callo de fractura mecánicamente estable a las fuerzas aplicadas

en flexión, mientras que las muestras del grupo de osteotomía y suero (A2) claudican a nivel del foco, al aplicar dicha fuerza.

En nuestro trabajo, utilizando la escala de Allen, el grupo tratado con RE, presenta mayor cantidad de hueso neoformado y menos cantidad de tejido fibroso a las 12 semanas de tratamiento, esta diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.005$), estos resultados son similares a los obtenidos por Li y Ozturan.

5.3.3. Influencia del ranelato de estroncio en el estudio biomecánico.

En el trabajo que nos ocupa realizamos dos tipos de ensayos: El de ultramicroindentación y el ensayo de flexión en cuatro puntos.

En el caso de la ultramicroindentación, nuestros resultados demostraron una diferencia estadísticamente significativa para las durezas del tejido cortical y trabecular siendo superior en el tejido cortical. Además de esto las epífisis superiores mostraban unos valores de dureza superiores a los de las epífisis inferiores. Aunque no se demostró una diferencia estadísticamente significativa para los valores de dureza entre el grupo tratado con ranelato de estroncio (B) y el grupo no tratado con el fármaco (A2) si se observó una leve tendencia endurecedora sobre las epífisis inferiores, así como el aumento del endurecimiento experimentado en el fémur contralateral de los animales tratados con RE (B).

Estos datos concuerdan con los del estudio realizado por Cattani-Lorente (155) en los que estudió el efecto endurecedor que el RE ejerce sobre las vértebras de ratas ovariectomizadas. En él se encontraron los mismos efectos endurecedores para el tejido cortical y el trabecular que en nuestro estudio.

Ozturan et al (161) emplean el ensayo de flexión en tres puntos sobre 40 ejemplares encontrando que el grupo tratado con RE presentaba un aumento del 56% de la resistencia mecánica en comparación con el grupo control con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.006$). En el presente estudio se emplea el ensayo de flexión en cuatro puntos, en vez del de tres porque la fuerza se reparte de forma homogénea a lo largo de la probeta en el ensayo de flexión de cuatro puntos, eliminando la fuerza de cizalla que se encuentra en el ensayo de tres puntos. Aunque encontramos una mejora sustancial en el comportamiento del grupo tratado con RE no fue posible encontrar una diferencia estadísticamente significativa debido al tamaño de muestra más limitado (4 ejemplares por grupo). Aun así los datos presentan al ranelato de estroncio como un fármaco capaz de mejorar la respuesta mecánica de los callos óseos.

Los resultados presentados con anterioridad contrastan con los de Brüel et al (147). Éste último estudio emplea el ensayo de flexión en tres puntos y la nanoindentación con indentador de tipo Berkovich. En el ensayo de flexión en tres puntos, no encontró diferencias estadísticamente significativas para la fuerza máxima o el stress de flexión máximo, ni a las 3 ni a las 8 semanas de tratamiento. Además en los ensayos de nanoindentación apoyan esta falta de diferencias entre ambos grupos.

5.3.4. Influencia del ranelato de estroncio sobre la expresión de genes relacionados con la consolidación de las fracturas.

Raouf y Seth (247) identificaron en su estudio un total de 252 genes expresados en la proliferación y la mineralización de hueso.

No existen estudios experimentales en ratas que analicen el efecto que presenta el RE a nivel molecular en pseudoartrosis. En el presente estudio analizamos la expresión de los genes *runx2*, *wnt5a*, *sox9*, *col1a1*, *col2a1*, *bglap*, *alpl*, *rankl*, *opg*, *dkk1*, *sost* y *col10a1* encontrando únicamente un descenso estadísticamente significativo de *dkk1* ($p=0.03$). Este dato debe valorarse con precaución pues el número de ratas empleadas es limitado. En todo caso, este resultado apoyaría una mayor actividad de la vía Wnt en los animales tratados con ranelato, lo que tendría un efecto favorecedor de la osteogénesis. El resto de genes analizados presentan una gran variabilidad, como es típico en los estudios de expresión genética (74, 167).

5.4. Posible efecto beneficioso del ranelato de estroncio en el tratamiento de fracturas y pseudoartrosis en humanos.

En un estudio realizado por el equipo de Kurdy en el año 2000 (248) constata una disminución de fosfatasa alcalina en pacientes con fracturas de tibia con problemas de consolidación. Dados los efectos del ranelato de estroncio sobre la expresión de esta enzima en modelos experimentales, también por este motivo parecería atractivo su uso en los problemas de consolidación

En esta línea, Fernández et al (149) realizaron un estudio in vitro células UMR106 (una línea derivada de osteoblastos de rata), utilizadas previamente para las determinaciones de ALP en estudios similares (249). En dicho estudio demostraron una estimulación directa de la actividad de la ALP por parte de la molécula de estroncio.

En este estudio se comparó la efectividad del RE frente al estroncio aislado, de tal modo que únicamente se encontró un efecto dosis dependiente para el RE.

Con niveles de 0,1 mM de estroncio detectan un aumento de la actividad de ALP del 30%; este incremento es del 60% si la concentración de estroncio alcanza los 0,5mM Para decidir las dosis del fármaco se utilizaron investigaciones previas de Yamaguchi y Weitzmann (250), Fernández (149) y Barbara (251).

Parece pues, razonable el estudio de esta molécula como posible solución a los fracasos de la consolidación, dada la disminución conocida de la ALP en los fracasos de la consolidación, un fármaco capaz de elevarla (como consecuencia del aumento de la actividad osteoblástica) puede ser beneficioso. Los efectos favorables del fármaco en modelos de consolidación de fracturas en condiciones estándar apoyan también esta idea

Desafortunadamente, el hecho de que el RE sea un fármaco autorizado únicamente para el tratamiento de la osteoporosis, así como los efectos adversos publicados recientemente y que comentaremos en un apartado posterior, hacen que de momento estos estudios no se lleven a cabo.

Así, pues, a pesar de los resultados preclínicos prometedores que hemos comentado en secciones anteriores, no existen estudios clínicos controlados que valoren la efectividad del RE en el tratamiento de fracturas y pseudoartrosis en pacientes. Sólo hay algunas publicaciones de casos clínicos aislados informando del éxito del tratamiento con RE(237, 252-254).

Como se puede ver en la tabla 43, los casos en los que los autores emplean el ranelato de estroncio son muy heterogéneos en cuanto al tipo de fractura que ocasiona la pseudoartrosis, el tiempo de evolución o el tipo y la duración del tratamiento farmacológico.

Llama la atención el sexo de los pacientes ya que todos fueron mujeres. Dado que están más afectadas por la patología osteoporótica es razonable pensar que presentaran más fracturas por fragilidad ósea.

Alegre et al y Salvin et al (252, 254) presentan tres casos de pseudoartrosis en mujeres osteoporóticas, que sólo tras el tratamiento con RE comenzaron a consolidar. Aunque es un hecho que llama la atención, no hay consenso en cuanto a en qué momento se decide administrar el fármaco o cuánto tiempo debe mantenerse. Los autores mencionados con anterioridad mantuvieron el tratamiento entre 3 y 7 meses y solamente empezaron a administrarlo una vez se diagnosticó a cada paciente de presentar una pseudoartrosis.

Alegre et al (252) incluyen además un par de casos más discutibles; una fractura diafisaria de antebrazo en una paciente joven sin factores de riesgo conocidos, que tras el tratamiento quirúrgico, inició el tratamiento farmacológico y una pseudoartrosis de tibia en una paciente sin osteoporosis. Lo cierto, es

que no existe ninguna evidencia clínica o preclínica (147) sobre la efectividad de este tratamiento en fracturas de pacientes sin factores de riesgo, por tanto, se debería evitar la administración del fármaco en ese tipo de pacientes. No obstante, el segundo caso es una pseudoartrosis de tibia ya diagnosticada, caso en el cual podría plantearse un uso compasivo del fármaco de cara a evitar una nueva intervención quirúrgica. Es importante tener en cuenta, que la ficha técnica del ranelato de estroncio no incluye esta opción terapéutica por tanto el uso en pacientes no osteoporóticos debería limitarse al uso compasivo.

Otro caso muy diferente es el tratamiento con RE en pacientes osteoporóticos que sufren una fractura. En este sentido, Tarantino et al y Liu et al (237, 253) presentan varios casos solucionados exitosamente tras la administración del fármaco. Ésta indicación es poco valorable, pues aunque en este tipo de pacientes existe una disminución de la capacidad de consolidación, no podemos saber hasta qué punto la consolidación se ha producido gracias al ranelato de estroncio o si el proceso normal de consolidación ha seguido su curso natural. Sería interesante plantear un estudio con un grupo control para establecer la eficacia del fármaco.

A continuación, se expone una tabla (Tabla 43) con la serie de casos clínicos tratados con ranelato de estroncio en pseudoartrosis.

Discusión.

Autor	Nº	S	A	Patología	Factores de riesgo	Tratamiento Quirúrgico	Dosificación	Tiempo hasta consolidación	Comentarios
Alegre et al (249)	4	F	52	Pseudoartrosis osteotomía	Osteoporosis	Osteotomía de trocánter mayor	2g/día 6 meses después	3 meses	Consolidación
		F	63	Pseudoartrosis en fractura tibia diafisaria	Osteoporosis	RAFI placa, Fijador externo + injerto	2 g/día 20 meses después	6 meses	Consolidación Fracaso del mat. Osteosíntesis por pseudoartrosis
		F	25	Fractura diáfisis radial	-----	RAFI placa	2 g/día 4 semanas después	6 semanas	Consolidación
		F	47	Pseudoartrosis en fractura abierta tibia	Fractura abierta	Fijador externo, enclavado	2g/día 18 meses después	5 meses	Consolidación
Tarantino et al. (250)	2	F	57	Fractura radio distal	Osteoporosis	Conservador	2g/día 2 meses después	1 mes	Tratamiento en base a diagnóstico de osteoporosis
		F	59	Fractura 5 metatarsiano	Osteoporosis	Conservador	2g/día 1 mes después	1 mes	Tratamiento en base a diagnóstico de osteoporosis
Salvin et al (251)	1	F	60	Pseudoartrosis en fractura diáfisis femoral periimplante	Artritis Reumatoide, tratamiento con corticoides y osteoporosis	RAFI placa	2g/día 15 meses después	7 meses	consolidación y deambulacion sin dolor
Liu et al (234)	1	F	62	Fractura interprotésica femoral	Artritis Reumatoide, tratamiento con corticoides y osteoporosis	Conservador	2g/día postinmovilización	2 meses	Altísimo riesgo de refractura por efecto punta.

Tabla 43: Bibliografía actual referente a la administración de Ranelato de estroncio en humanos para el tratamiento de fracturas y pseudoartrosis. (N= Número de sujetos, S= Sexo de los pacientes, A= Edad en el momento del diagnóstico de la patología a tratar).

5.5. Efectos adversos del Ranelato de Estroncio.

Como se ha comentado a lo largo del presente trabajo, el RE es un fármaco utilizado en el tratamiento de la osteoporosis. Su eficacia en la prevención de fracturas osteoporóticas, tanto vertebrales como no vertebrales, ha quedado ampliamente demostrada en los estudios SOTI y TROPOS (157, 158). Además de esto, se ha demostrado que dicha efectividad se mantiene más allá de los 10 años (233). Este fármaco se registró en Europa en el 2004 y desde entonces numerosos estudios se sucedieron en aras de ampliar sus indicaciones terapéuticas; incluyendo la osteoporosis del varón (255).

Todos los estudios farmacológicos en Europa son revisados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), de cara a evaluar la seguridad postcomercialización. En esas revisiones, además del mayor riesgo de enfermedad tromboembólica previamente identificado, se descubrió que el uso del ranelato de estroncio podría suponer un mayor riesgo de infarto de miocardio, aunque sin aumento de la mortalidad (256). Se ha descrito en algunos estudios, un aumento del riesgo (1,3-1,9%) de sufrir eventos miocárdicos en pacientes a tratamiento con RE (256, 257). Retirando de los estudios aquellos pacientes con algún factor de riesgo cardiovascular, este riesgo disminuía, no volviendo a presentarse en estudios observacionales posteriores (256, 257). Así, en el estudio realizado por Audran et al (258), tras la revisión de un estudio de cohortes prospectivo con 12046 pacientes, no se encontró asociación estadísticamente significativa, si no se incluían en el estudio pacientes con factores de riesgo cardiovascular.

Taubel et al (259) analizaron los efectos del RE a dosis supra-terapéuticas (4g/día) en 96 pacientes sin factores de riesgo cardiaco conocidos. Tras 15 días de administración del fármaco a la dosis mencionada, no aparecieron alteraciones en el intervalo QT de los pacientes. Es importante destacar que el tratamiento solamente se mantuvo durante 15 días, tiempo necesario para poder detectar el efecto de un fármaco sobre la repolarización cardíaca, sin otras posibles iatrogenias (259)

Tras la alerta, se decidió limitar el uso del ranelato de estroncio a pacientes con osteoporosis severa, que no pueden tomar otro fármaco, siempre y cuando no presenten hipertensión mal controlada, episodios isquémicos cardiacos conocidos, enfermedad cerebro-vascular o arterial periférica y se realice una revisión del riesgo cardiovascular cada 6-12 semanas para detectar nuevas complicaciones (257).

Si bien es cierto que en el caso del tratamiento de la osteoporosis estas indicaciones son válidas, en el caso de plantearse la aplicación de este tratamiento a las fracturas y pseudoartrosis estas indicaciones no están tan claras.

Si analizamos las complicaciones quirúrgicas de los pacientes mayores en fracturas que deben ser operadas (como las fracturas femorales) un 36% de estos pacientes sufrirán alguna complicación cardíaca con una tasa de mortalidad tras este evento que oscila entre el 25 y el 65% (260). Además debemos tener en cuenta que las complicaciones generales hacen que la mortalidad a 30 días sea del 5%, ascendiendo hasta casi un 20% al año, siendo un 70% de estas muertes por complicaciones cardiorrespiratorias (261). Todos estos datos hacen que nos planteemos una indicación personalizada y la valoración de la utilización de este fármaco como alternativa a la cirugía, pues el riesgo que supone la cirugía es claramente mayor.

Además de lo anteriormente expuesto, el último estudio realizado por Fernández et al (149) no sólo determina la efectividad del fármaco para aumentar la actividad de la ALP, con las consecuencias favorecedoras de la consolidación, sino que además encuentra que si se administra Zn^{2+} el efecto es sinérgico. Tanto es así, que la presencia de Zn^{2+} tras la administración de 0,05 mM de estroncio aumenta la actividad de la ALP específica del hueso en un 267% respecto al control ($p < 0,001$) (149).

Según estudios realizados con anterioridad por Marie (149, 236) niveles de 0,1mM de RE en pacientes osteoporóticas a tratamiento durante largo tiempo con este fármaco consiguen un incremento óptimo de la actividad y función osteoblástica. Estos datos coinciden con los estudios experimentales presentados por Fernández (149) y explicados con anterioridad.

Si los estudios in vitro de Fernández et al (149) demuestran ser extrapolables a la clínica práctica, con la mitad de dosis de fármaco obtendríamos los mismos resultados con efectos secundarios menores, limitando las complicaciones tras administración del ranelato de estroncio.

Conclusiones.

6. Conclusiones.

1. Hemos establecido un modelo experimental de pseudoartrosis de fémur basado en la creación de un defecto óseo de 2 mm, condesperiestización de los bordes fracturarios y estabilización mecánica mediante un tornillo endomedular.

2. El tornillo endomedular empleado en este modelo ha demostrado la capacidad de contrarrestar las fuerzas de rotación y compresión que atraviesan el foco de pseudoartrosis, al menos durante las 12 semanas que duró el estudio.

3. Desde el punto de vista histológico y radiológico, las diferencias entre el grupo control y el grupo osteotomía de sustracción presentaron diferencias estadísticamente significativas, demostrando la eficacia del método como un nuevo modelo experimental de retraso de la consolidación.

4. Desde el punto de vista radiológico, el tratamiento con ranelato de estroncio influyó significativamente en la consolidación ósea mejorando los índices tanto a las seis como a las doce semanas de tratamiento.

5. El tratamiento con ranelato de estroncio también se asoció a una mejoría de la consolidación desde el punto de vista histológico.

6. Los resultados de los estudios biomecánicos demostraron que el tratamiento indujo un aumento de la dureza en los ensayos de microindentación y una tendencia a mejorar la resistencia en los ensayos de flexión.

7. El tratamiento con ranelato se asoció a una menor expresión de DKK1, un inhibidor de la vía Wnt.

8. El tratamiento fue bien tolerado y no provocó efectos secundarios evidentes en los animales.

9. Globalmente, los resultados de este estudio sugieren que el ranelato de estroncio podría ser un tratamiento útil en la pseudoartrosis. Su efectividad real debería ser analizada en ensayos clínicos controlados.

7. Anexo 1: Autorización del Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria.



Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria
Facultad de Medicina
Cardenal Herrera Oria s/n
39011 Santander

INFORME DEL COMITÉ DE BIOÉTICA

Nº de registro: 2009/18

Datos de la solicitud

Investigador principal: M^a ISABEL PÉREZ NÚÑEZ, Profesora Asociada en el Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria.

Título del proyecto de investigación: "ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EFECTIVIDAD DE LA PTH Y EL RANELATO DE ESTRONCIO EN LA FORMACIÓN ÓSEA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE PSEUDOARTROSIS." presentado al IFIMAV (convocatoria de la Fundación Marqués de Valdecilla, BOC núm.23, de 5 de noviembre 2009).

Duración y lugar de realización del proyecto: desde abril del 2010 a abril del 2013. Servicio de Estabulación y Experimentación Animal de la Universidad de Cantabria, Facultad de Medicina.

Informe:

El Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria, reunido el día 23 de noviembre de 2009, una vez analizada toda la documentación aportada por el investigador principal en la solicitud de referencia, manifiesta que todos los procedimientos de experimentación animal a realizar dentro del proyecto de investigación se ajustan a los principios de Bioética y Bienestar Animal de la legislación vigente (Real Decreto 1201/2005). Por ello, y en virtud de lo dispuesto en el reglamento interno del Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria, el citado Comité ha resuelto emitir el **INFORME FAVORABLE** para la realización del procedimiento de experimentación animal reseñado en el proyecto de referencia.

En Santander, a 23 de noviembre de 2009

Presidente del Comité de Bioética

Prof. Miguel Lafarga Coscojuela

Secretario del Comité

Prof. Álvaro Díaz Martínez



INFORME DEL COMITÉ DE BIOÉTICA

Nº de registro: 2011/15

Investigador principal: M^a ISABEL PÉREZ NÚÑEZ, Profesora Asociada en el Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria.

Título del proyecto de investigación: "ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EFECTIVIDAD DE LA PTH Y EL RANELATO DE ESTRONCIO EN LA FORMACIÓN ÓSEA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE PSEUDOARTROSIS" presentado a la VIII Convocatoria de Ayudas a la Investigación Médica de la Fundación Mutua Madrileña (febrero 2011).

Duración y lugar de realización del proyecto: durante los años 2011 a 2013. Servicio de Estabulación y Experimentación Animal de la Universidad de Cantabria, Facultad de Medicina.

Informe:

El Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria, reunido el día 8 de febrero de 2011, una vez analizada toda la documentación aportada por el investigador principal en la solicitud de referencia, manifiesta que todos los procedimientos de experimentación a realizar dentro del proyecto de investigación se ajustan a establecido en el Real Decreto sobre los principios de Bioética y Bienestar Animal de la legislación vigente (Real Decreto 1201/2005). Por ello, y en virtud de lo dispuesto en el reglamento interno del Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria, el citado Comité ha resuelto emitir el **INFORME FAVORABLE** para la realización del procedimiento de experimentación animal reseñado en el proyecto de referencia.

En Santander, a 8 de febrero de 2011

Presidente del Comité de Bioética

Prof. Juan M. García Lobo

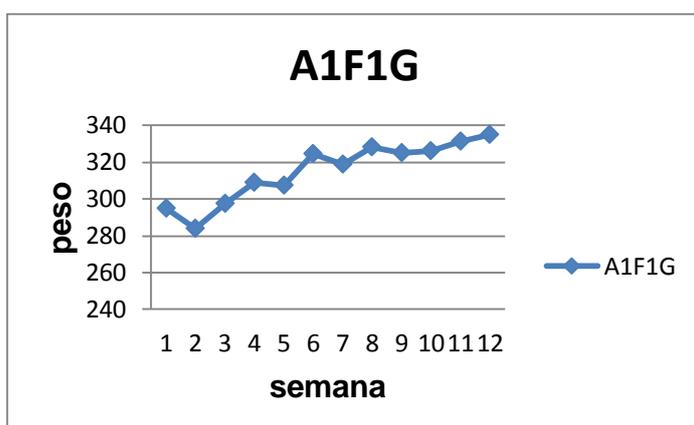
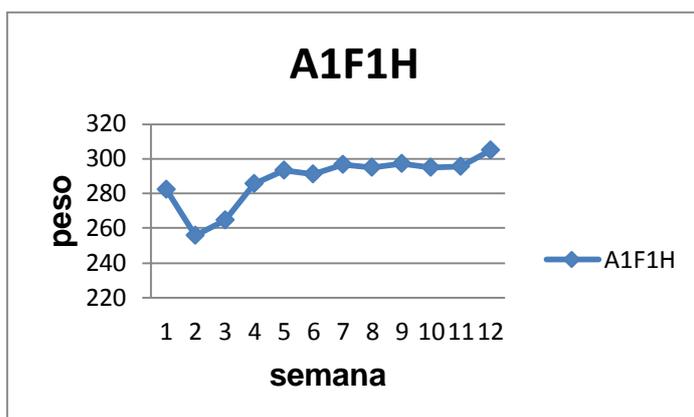
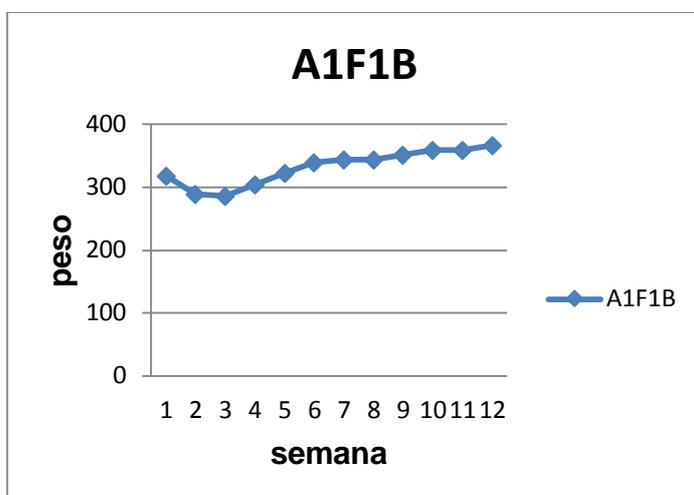


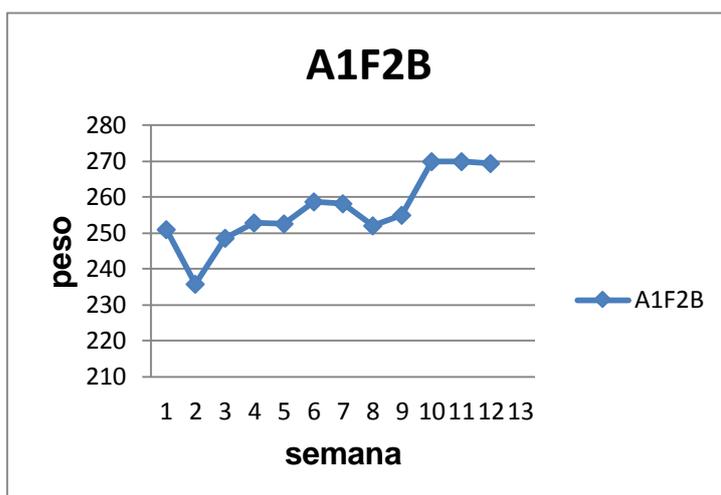
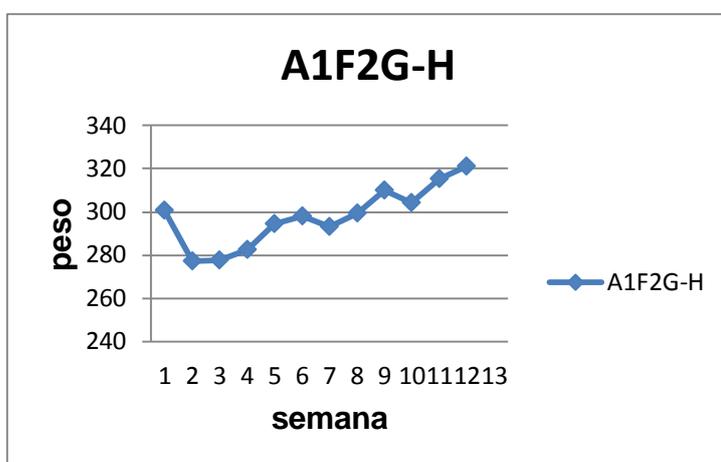
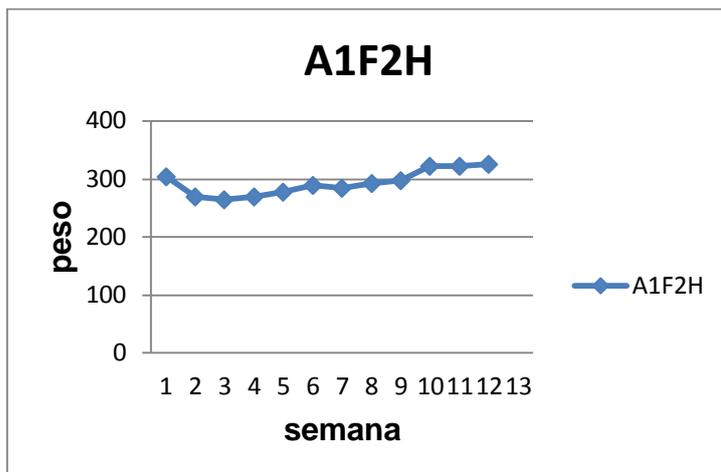
Secretario del Comité

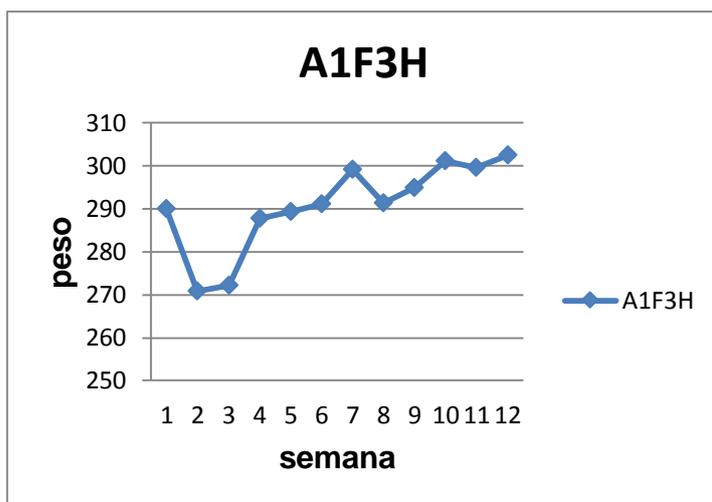
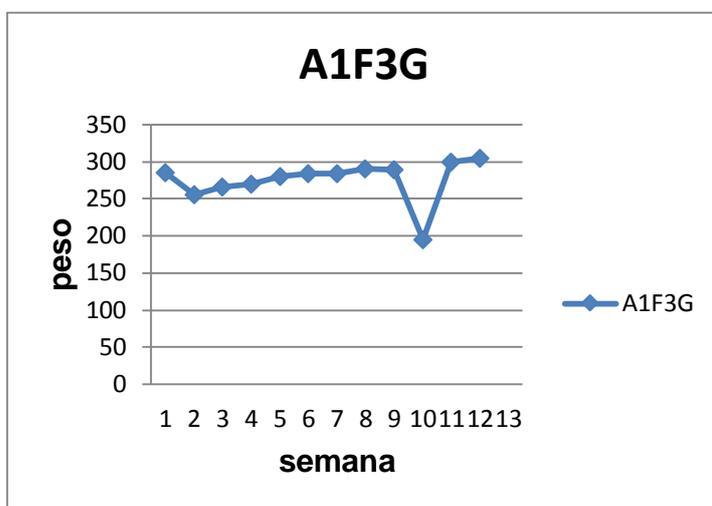
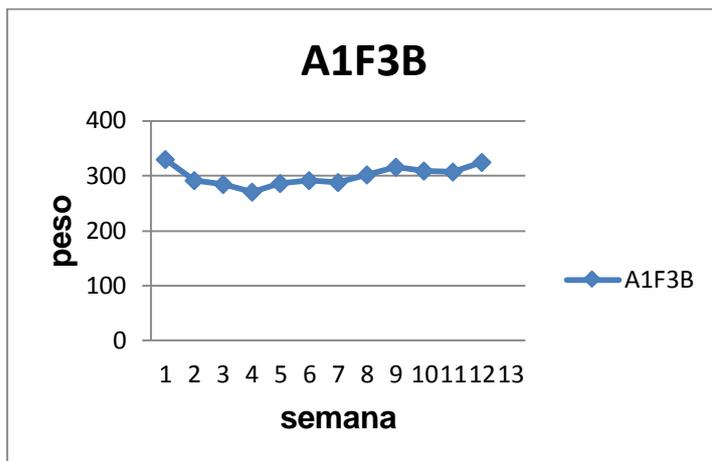
Prof. Álvaro Díaz Martínez

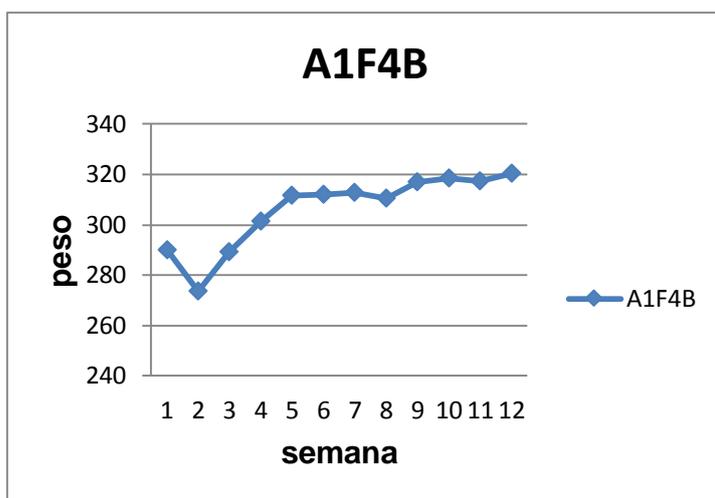
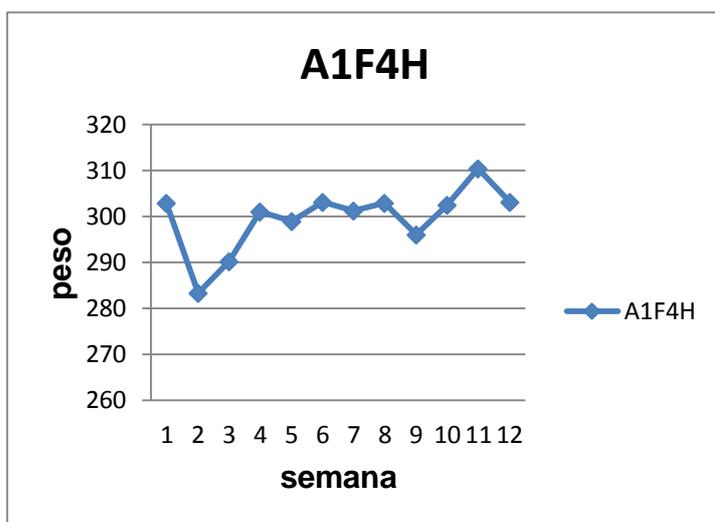
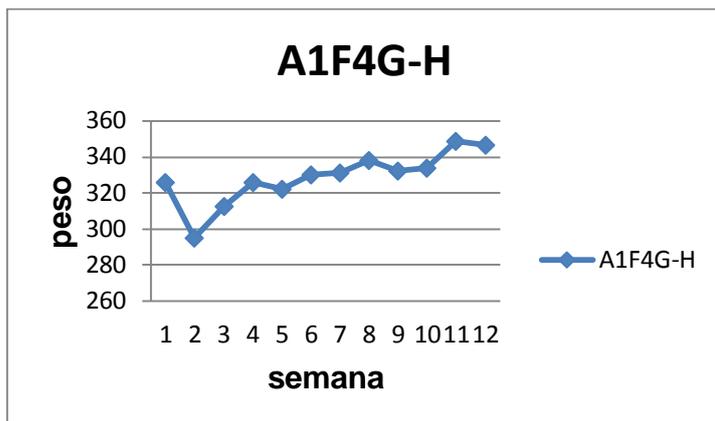
Anexo 2.

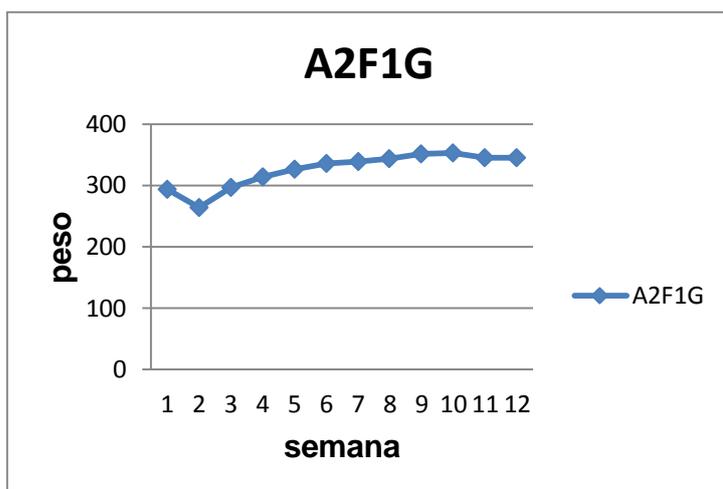
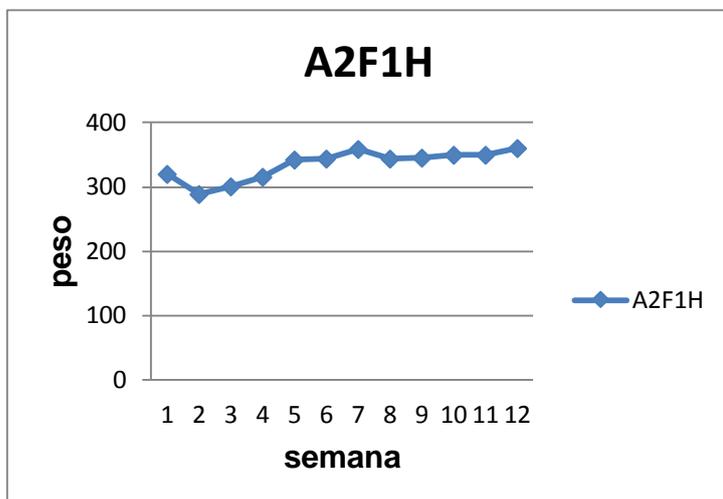
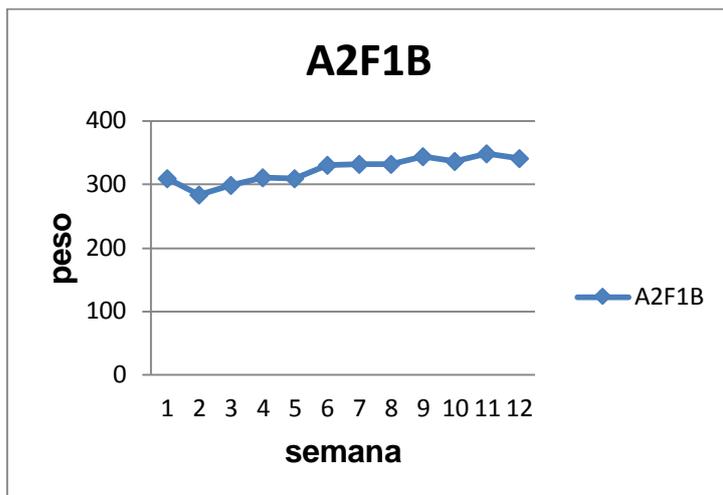
8. Anexo 2: Gráficas del peso de los animales incluidos en el estudio.

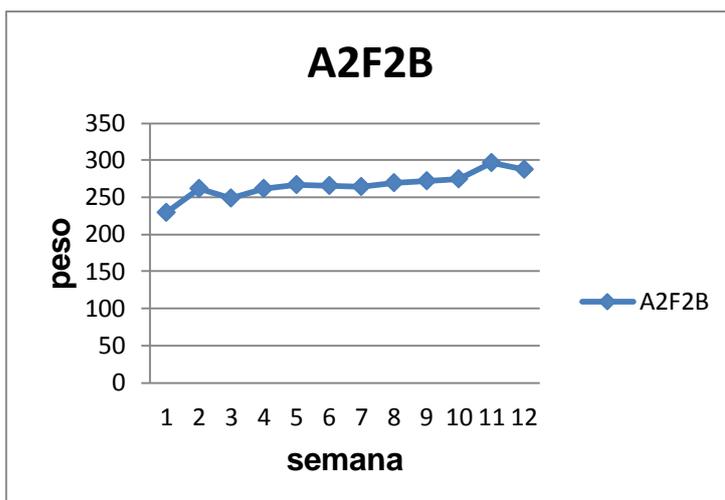
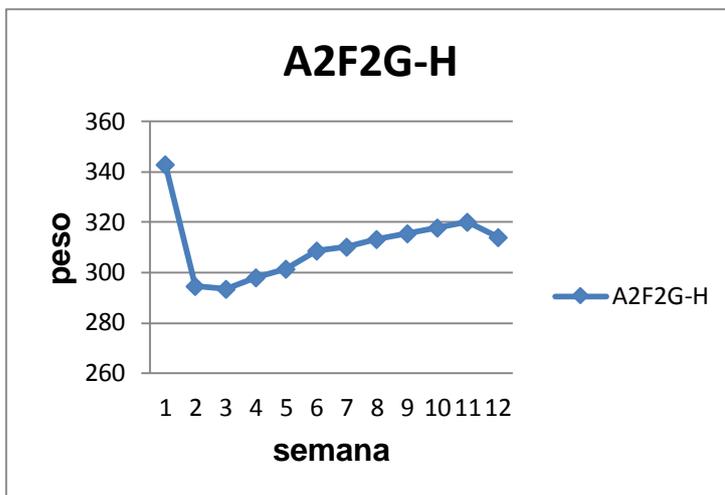
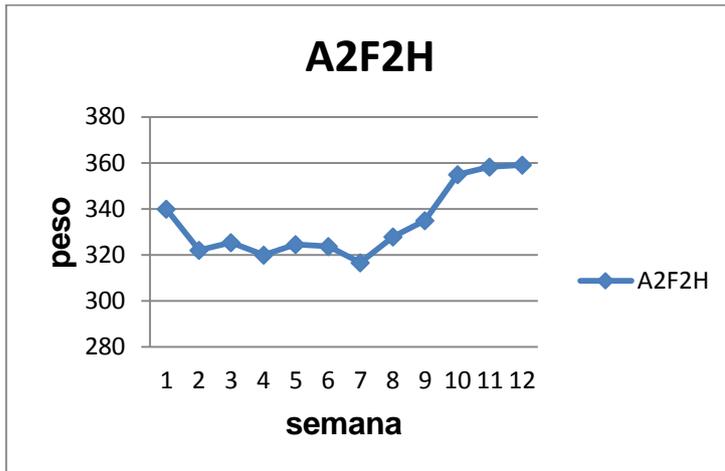


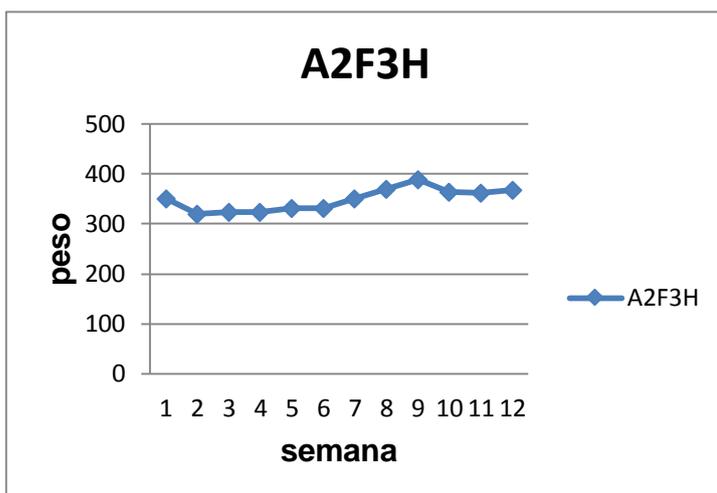
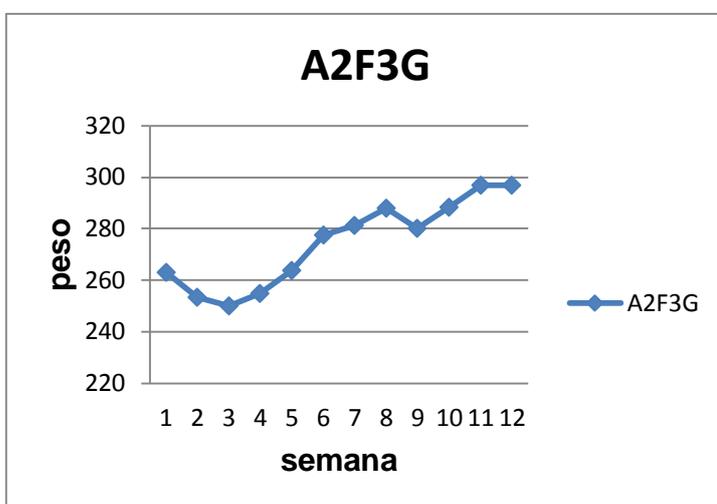
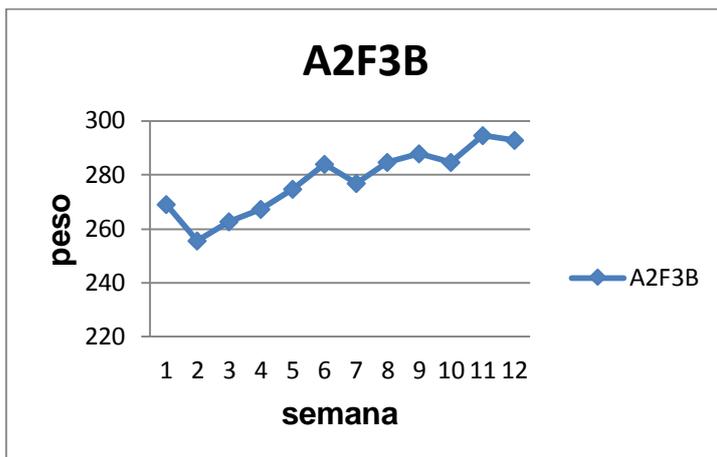


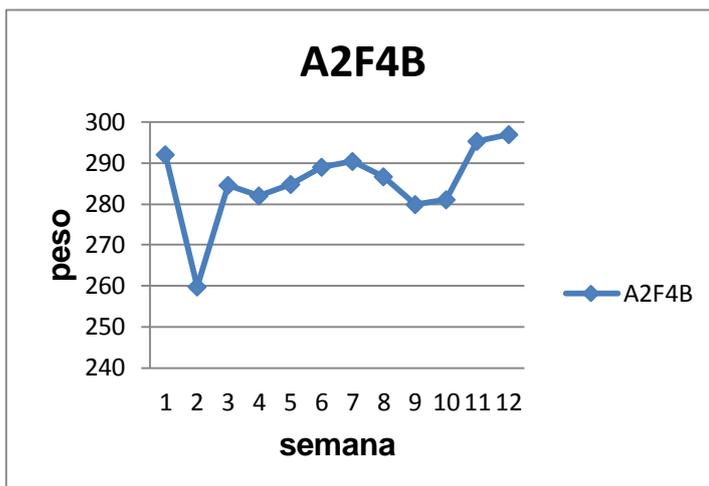
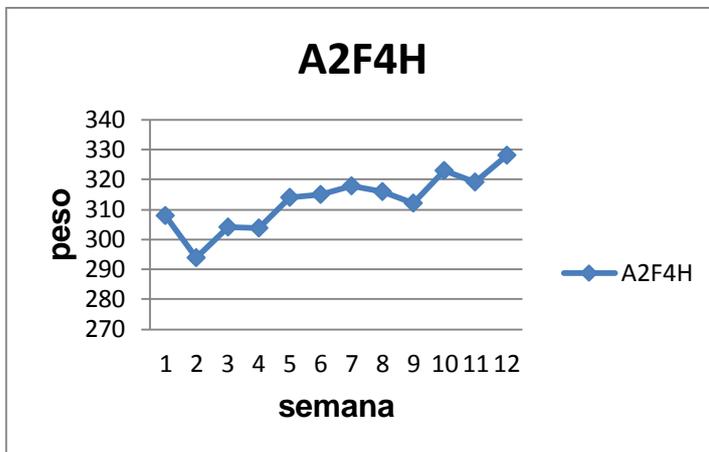
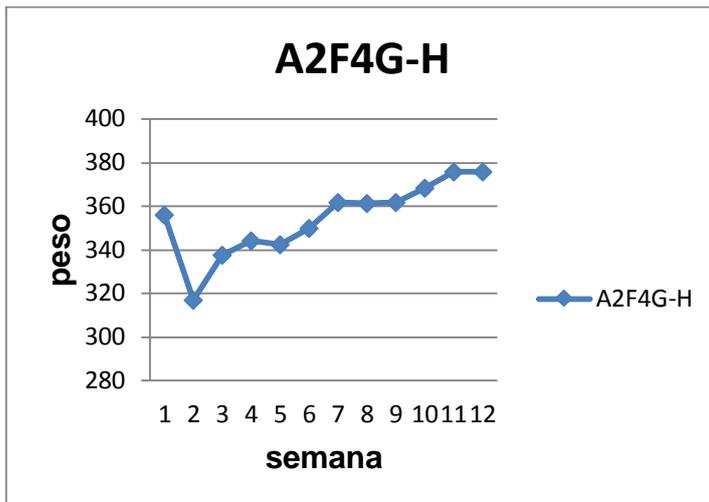


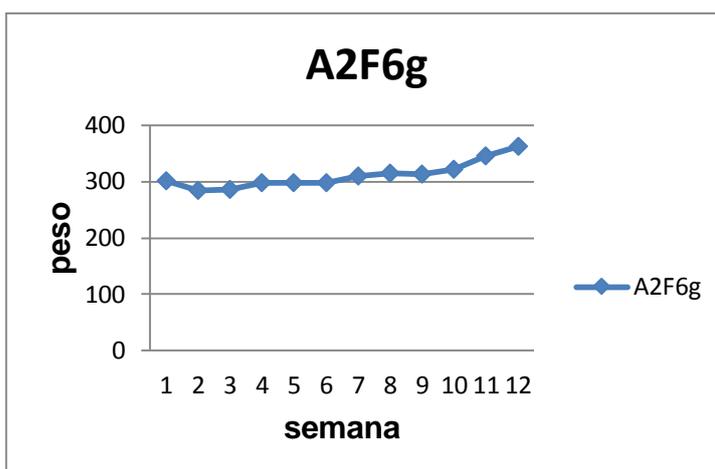
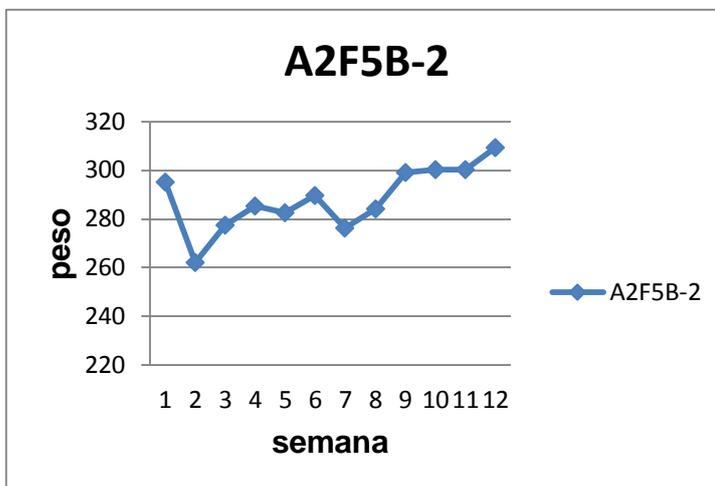
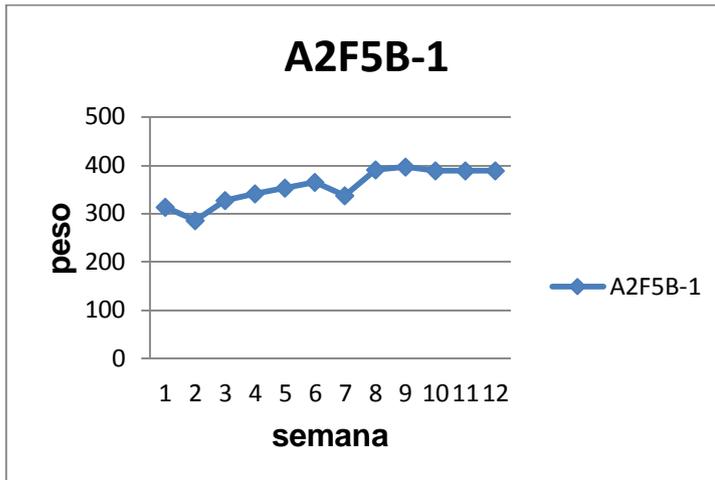


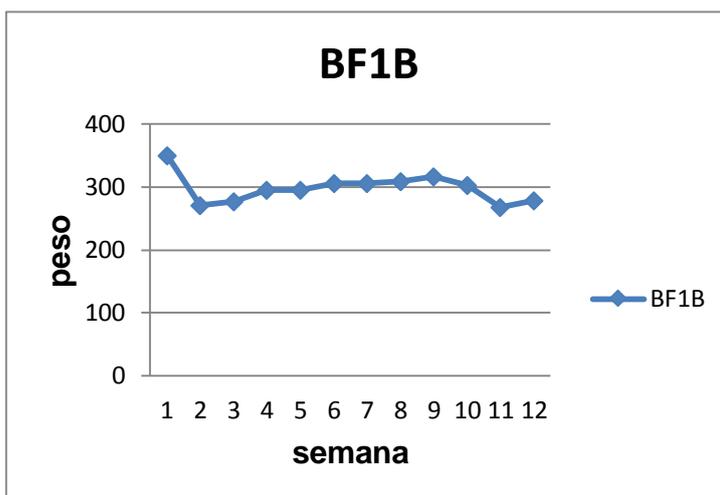
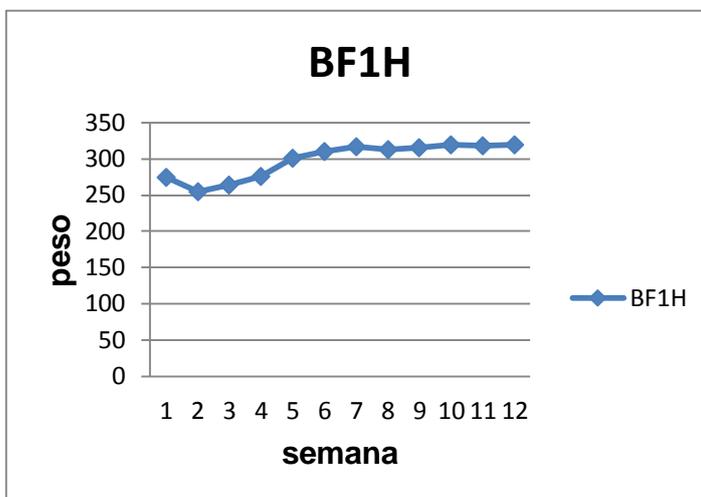
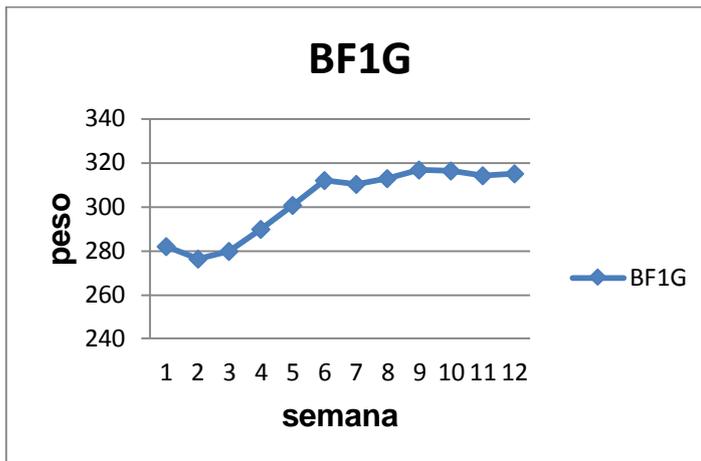


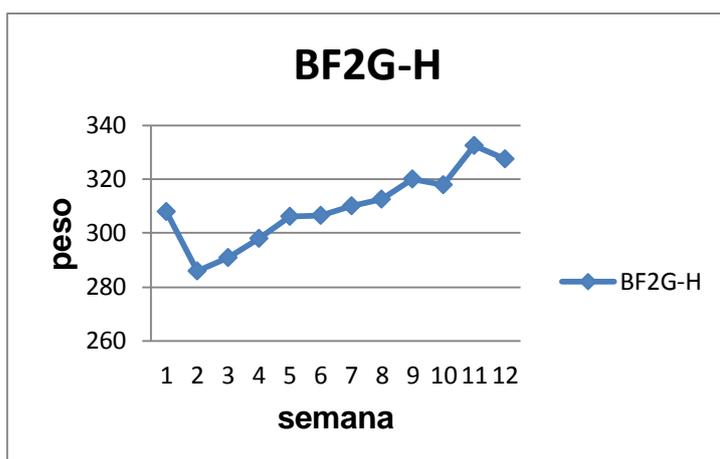
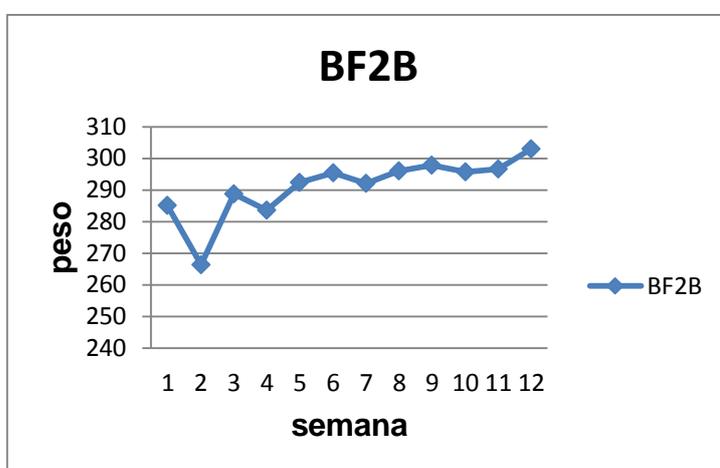
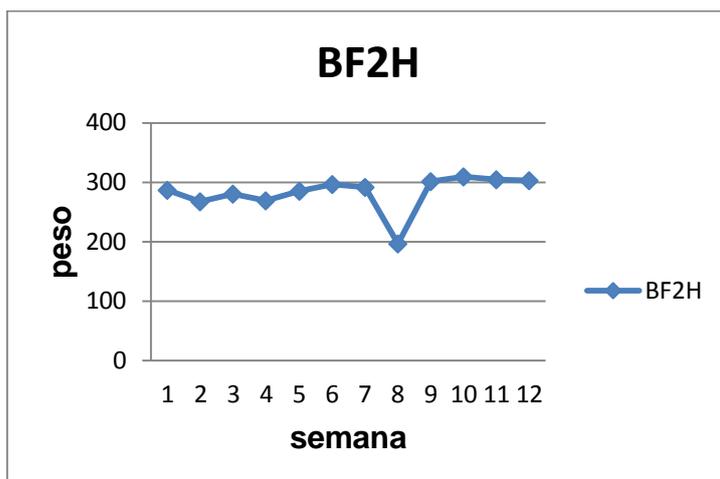


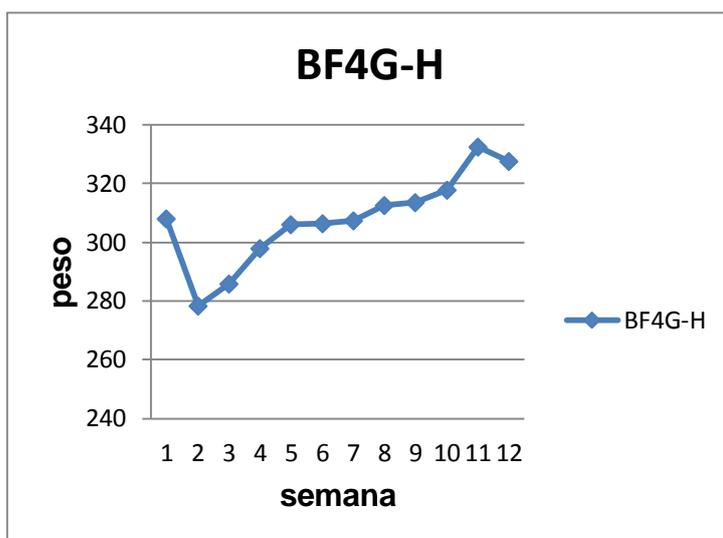
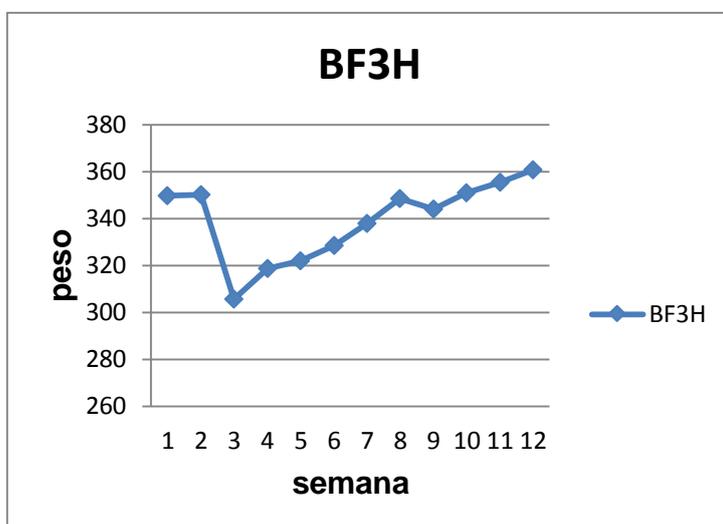
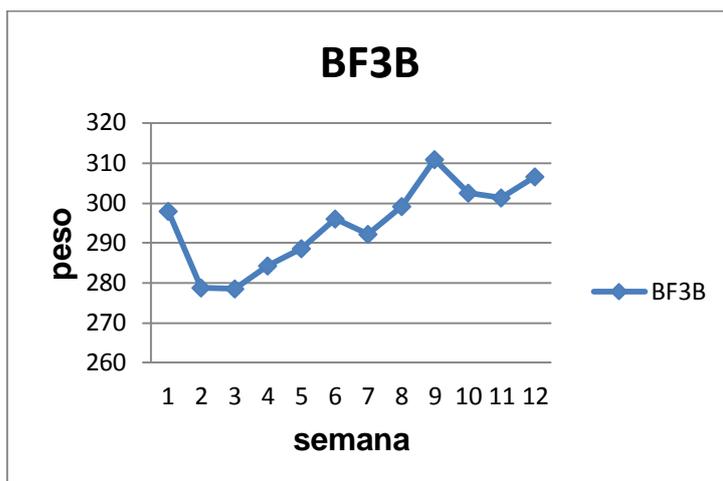


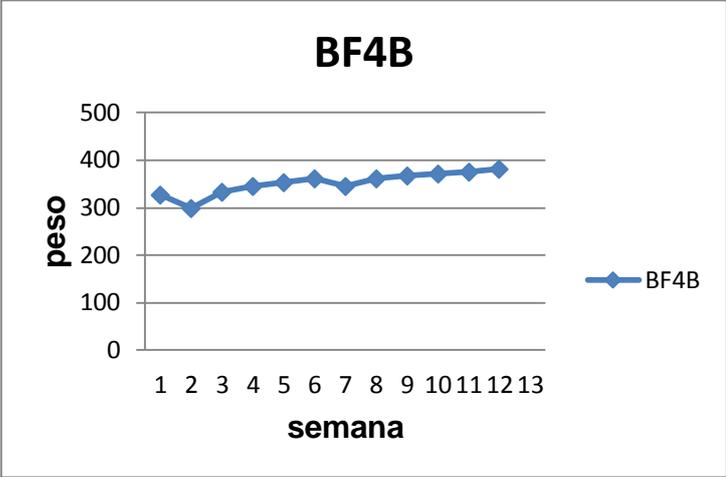
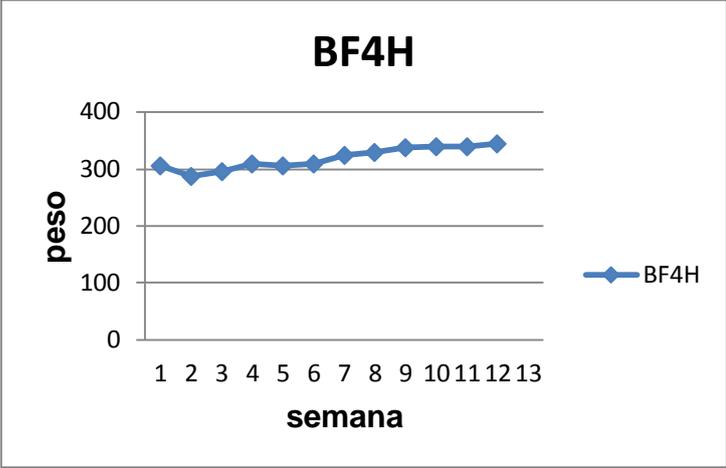












Anexo 3.

9. Anexo 3: Resultados de los ensayos de microindentación realizados.

Animal	Dureza hueso cortical	Dureza hueso trabecular
A1	71,0	72,1
	78,8	60,0
	80,5	66,1
	73,9	69,8
	69,4	59,2
	80,9	71,6
	73,5	67,2
	79,8	55,2
	75,3	62,1
	74,2	65,3
	74,0	67,6
	74,4	54,8
	81,6	58,4
	65,4	60,0
	70,9	49,3
	63,3	53,8
	56,6	47,9
	60,6	47,2
	61,4	57,2
	54,9	42,4
	62,6	45,4
	56,8	58,2
	52,7	50,9
	44,7	61,8
	46,2	42,7
	75,3	
	82,2	65,6
	79,9	55,6
	67,9	67,0
	57,6	63,7
	58,7	63,0
	63,6	52,4
75,2	64,2	
72,0	59,2	
70,1	57,4	
69,2	52,4	
66,9	60,4	
53,9	51,8	
52,5		

Animal	Dureza hueso cortical	Dureza hueso trabecular
	58,2	58,6
	48,5	56,1
	53,3	53,5
	52,1	48,6
	57,6	52,4
	59,0	59,6
	63,8	49,7
	59,0	60,6
	53,1	56,2
	65,5	60,4
	62,0	67,8
	51,3	54,5
	60,4	
	52,9	
	36,1	52,9
	37,8	56,2
	41,7	48,6
	42,2	59,1
	44,1	56,2
A2	52,6	66,7
	55,5	59,9
	45,0	64,2
	49,0	56,6
	40,5	59,4
	40,5	56,9
	52,1	59,7
	61,1	63,7
	66,4	62,9
	71,1	58,7
	68,7	69,4
	75,3	72,4
	59,0	58,3
	75,8	57,7
	73,1	58,4
	74,3	70,7
	80,5	58,4
	79,2	61,8
	80,9	50,7
	83,5	57,6

Animal	Dureza h. cort.	Dureza h. trab
B	74,2	56,7
	65,2	50,2
	79,0	51,9
	66,5	58,6
	64,8	60,6
	70,7	69,1
	75,4	49,2
	70,2	63,7
	73,8	67,2
	72,9	58,5
	74,6	54,0
	76,8	51,3
	73,9	56,3
	71,6	55,2
	57,7	61,5
	56,8	65,1
	54,2	70,7
	57,8	63,3
	51,0	59,1
	56,9	63,1
	54,2	61,5
	51,6	70,0
	46,6	59,8
	58,7	62,3
	63,3	62,8
	54,2	55,1
	57,6	67,4
	45,7	60,3
	62,6	49,9
	63,4	54,7
	57,5	56,4
	57,6	63,5
	53,5	63,7
60,6	63,3	
57,9	53,9	
59,7	55,8	
59,6	57,6	
60,1	54,4	
64,9	63,9	
64,5	54,1	
58,9	61,1	
57,1	64,1	

Bibliografía.

Bibliografía.

10. Bibliografía.

1. Alvarez-Nebreda ML, Jimenez AB, Rodriguez P, Serra JA. Epidemiology of hip fracture in the elderly in Spain. *Bone*. 2008;42(2):278-85.
2. Riggs BL, Melton LJ, 3rd. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone*. 1995;17(5 Suppl):505S-11S.
3. Gruber R, Koch H, Doll BA, Tegtmeier F, Einhorn TA, Hollinger JO. Fracture healing in the elderly patient. *Experimental gerontology*. 2006;41(11):1080-93.
4. van Staa TP, Dennison EM, Leufkens HG, Cooper C. Epidemiology of fractures in England and Wales. *Bone*. 2001;29(6):517-22.
5. Giannoudis P, Psarakis S, Kontakis G. Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature. *Injury*. 2007;38 Suppl 1:S81-9.
6. Ronga M, Fagetti A, Canton G, Paiusco E, Surace MF, Cherubino P. Clinical applications of growth factors in bone injuries: experience with BMPs. *Injury*. 2013;44 Suppl 1:S34-9.
7. Giannoudis PV, Dinopoulos HT. Autologous bone graft: when shall we add growth factors? *The Orthopedic clinics of North America*. 2010;41(1):85-94; table of contents.
8. Bishop JA, Palanca AA, Bellino MJ, Lowenberg DW. Assessment of compromised fracture healing. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2012;20(5):273-82.
9. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, et al. Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*. 2014;45 Suppl 2:S3-7.
10. Tzioupis C, Giannoudis PV. Prevalence of long-bone non-unions. *Injury*. 2007;38 Suppl 2:S3-9.
11. Zeckey C, Mommsen P, Andruszkow H, Macke C, Frink M, Stubig T, et al. The aseptic femoral and tibial shaft non-union in healthy patients - an analysis of the health-related quality of life and the socioeconomic outcome. *The open orthopaedics journal*. 2011;5:193-7.
12. Hobby B, Lee MA. Managing atrophic nonunion in the geriatric population: incidence, distribution, and causes. *The Orthopedic clinics of North America*. 2013;44(2):251-6.
13. Parker MJ, Raghavan R, Gurusamy K. Incidence of fracture-healing complications after femoral neck fractures. *Clinical orthopaedics and related research*. 2007;458:175-9.

14. Blume SW, Curtis JR. Medical costs of osteoporosis in the elderly Medicare population. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2011;22(6):1835-44.
15. Wiese A, Pape HC. Bone defects caused by high-energy injuries, bone loss, infected nonunions, and nonunions. *The Orthopedic clinics of North America*. 2010;41(1):1-4, table of contents.
16. Busse JW, Bhandari M, Sprague S, Johnson-Masotti AP, Gafni A. An economic analysis of management strategies for closed and open grade I tibial shaft fractures. *Acta orthopaedica*. 2005;76(5):705-12.
17. K.Ito SMP. *Biology and Biomechanics in Bone Healing*. AO Principles of Fracture Management. . expanded s, editor2007. 9-31 p.
18. Philip J Wraighte BES. Principles of fracture healing. *GENERAL PRINCIPLES OF ORTHOPAEDIC SURGERY*. 2006;24(6):198-205.
19. Joseph AB TA, J.L.Marsh, Larry G, Anil R, Joseph L. Bone and Joint Healing. In: Wolters Kluwer LWW, editor. *Rockwood and Green's Fractures in Adults*. 7th2010. p. p. 85-103.
20. M B. Biomechanics of Osteoporotic fractures. *Clinical reviews in bone and mineral metabolism*. 2006;4(3):143-54.
21. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-5.
22. Merloz P. Macroscopic and microscopic process of long bone fracture healing. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2011;22(6):1999-2001.
23. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S3-6.
24. Einhorn TA. The science of fracture healing. *Journal of orthopaedic trauma*. 2005;19(10 Suppl):S4-6.
25. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, et al. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2010;16(4):427-34.
26. Jagodzinski M, Krettek C. Effect of mechanical stability on fracture healing--an update. *Injury*. 2007;38 Suppl 1:S3-10.
27. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*. 2007;38 Suppl 1:S11-25.

28. McKinley T. Principles of Fracture Healing. Surgery. 2003;21 (9):209-12.
29. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. Journal of cellular biochemistry. 2003;88(5):873-84.
30. A.W H. A histological study of the early phase of bone repair. The Journal of bone and joint surgery American volume. 1930;12:825-44.
31. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. The Journal of bone and joint surgery British volume. 1978;60-B(2):150-62.
32. Fazzalari NL. Bone fracture and bone fracture repair. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2011;22(6):2003-6.
33. Beamer B, Hettrich C, Lane J. Vascular endothelial growth factor: an essential component of angiogenesis and fracture healing. HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery. 2010;6(1):85-94.
34. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. Nature genetics. 2006;38(12):1424-9.
35. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. Journal of embryology and experimental morphology. 1966;16(3):381-90.
36. Bais MV, Wigner N, Young M, Toholka R, Graves DT, Morgan EF, et al. BMP2 is essential for post natal osteogenesis but not for recruitment of osteogenic stem cells. Bone. 2009;45(2):254-66.
37. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clinical orthopaedics and related research. 1998(355 Suppl):S7-21.
38. Rajeev Jahagirdar BS. Principles of fracture healing and disorders in bone union. Surgery. 2008;27(2):63-9.
39. Cannada LK. Viable bone and circulatory factors required for survival of bone grafts. The Orthopedic clinics of North America. 2010;41(1):5-13; table of contents.
40. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. Injury. 2005;36 Suppl 3:S5-7.
41. Abou-Khalil R, Colnot C. Cellular and molecular bases of skeletal regeneration: what can we learn from genetic mouse models? Bone. 2014;64:211-21.

42. Paul J Harwood JBN, Anthony LR Michael. An update on fracture healing and non-union. *ORTHOPAEDICS AND TRAUMA* 2010;24(1):9-23.
43. Dijkman BG, Sprague S, Schemitsch EH, Bhandari M. When is a fracture healed? Radiographic and clinical criteria revisited. *Journal of orthopaedic trauma*. 2010;24 Suppl 1:S76-80.
44. Bhandari M, Fong K, Sprague S, Williams D, Petrisor B. Variability in the definition and perceived causes of delayed unions and nonunions: a cross-sectional, multinational survey of orthopaedic surgeons. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2012;94(15):e1091-6.
45. Corrales LA, Morshed S, Bhandari M, Miclau T, 3rd. Variability in the assessment of fracture-healing in orthopaedic trauma studies. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2008;90(9):1862-8.
46. Frolke JP, Patka P. Definition and classification of fracture non-unions. *Injury*. 2007;38 Suppl 2:S19-22.
47. Axelrad TW, Einhorn TA. Use of clinical assessment tools in the evaluation of fracture healing. *Injury*. 2011;42(3):301-5.
48. Hoang-Kim A, Miclau T, Goldhahn J, Nijman TH, Poolman RW. Patient-important outcome for the assessment of fracture repair. *Injury*. 2014;45 Suppl 2:S44-8.
49. Busse JW, Bhandari M, Guyatt GH, Heels-Ansdell D, Mandel S, Sanders D, et al. Use of both Short Musculoskeletal Function Assessment questionnaire and Short Form-36 among tibial-fracture patients was redundant. *Journal of clinical epidemiology*. 2009;62(11):1210-7.
50. Augat P, Faschingbauer M, Seide K, Tobita K, Callary SA, Solomon LB, et al. Biomechanical methods for the assessment of fracture repair. *Injury*. 2014;45 Suppl 2:S32-8.
51. Whelan DB BM, McKee MD, et al. . Interobserver and intraobserver variation in the assessment of the healing of tibial fractures after intramedullary fixation. *J Bone Joint Surg Br*. 2002;84:15-8.
52. Morshed S, Corrales L, Genant H, Miclau T, 3rd. Outcome assessment in clinical trials of fracture-healing. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2008;90 Suppl 1:62-7.
53. Costelloe CM, Dickson K, Cody DD, Hernandez M, DeMouy EH. Computed tomography reformation in evaluation of fracture healing with metallic fixation: correlation with clinical outcome. *The Journal of trauma*. 2008;65(6):1421-4.
54. Bhattacharyya T, Bouchard KA, Phadke A, Meigs JB, Kassarian A, Salamipour H. The accuracy of computed tomography for the diagnosis of tibial

nonunion. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2006;88(4):692-7.

55. Augat P, Morgan EF, Lujan TJ, MacGillivray TJ, Cheung WH. Imaging techniques for the assessment of fracture repair. *Injury*. 2014;45 Suppl 2:S16-22.

56. Moed BR, Subramanian S, van Holsbeeck M, Watson JT, Cramer KE, Karges DE, et al. Ultrasound for the early diagnosis of tibial fracture healing after static interlocked nailing without reaming: clinical results. *Journal of orthopaedic trauma*. 1998;12(3):206-13.

57. Caruso G, Lagalla R, Derchi L, Iovane A, Sanfilippo A. Monitoring of fracture calluses with color Doppler sonography. *Journal of clinical ultrasound : JCU*. 2000;28(1):20-7.

58. Sun MH, Leung KS, Zheng YP, Huang YP, Wang LK, Qin L, et al. Three-dimensional high frequency power Doppler ultrasonography for the assessment of microvasculature during fracture healing in a rat model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2012;30(1):137-43.

59. Hankenson KD, Zimmerman G, Marcucio R. Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury*. 2014;45 Suppl 2:S8-S15.

60. Ivaska KK, Gerdhem P, Akesson K, Garnero P, Obrant KJ. Effect of fracture on bone turnover markers: a longitudinal study comparing marker levels before and after injury in 113 elderly women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2007;22(8):1155-64.

61. Sarahrudi K, Thomas A, Albrecht C, Aharinejad S. Strongly enhanced levels of sclerostin during human fracture healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2012;30(10):1549-55.

62. Ingle BM, Hay SM, Bottjer HM, Eastell R. Changes in bone mass and bone turnover following distal forearm fracture. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 1999;10(5):399-407.

63. Kurdy NM, Bowles S, Marsh DR, Davies A, France M. Serology of collagen types I and III in normal healing of tibial shaft fractures. *Journal of orthopaedic trauma*. 1998;12(2):122-6.

64. Stoffel K, Engler H, Kuster M, Riesen W. Changes in biochemical markers after lower limb fractures. *Clinical chemistry*. 2007;53(1):131-4.

65. Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Kottstorfer J, Kecht M, et al. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) levels in human fracture healing. *Injury*. 2011;42(8):833-7.

66. Zimmermann G, Henle P, Kusswetter M, Moghaddam A, Wentzensen A, Richter W, et al. TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone*. 2005;36(5):779-85.
67. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3 Suppl 3:S131-9.
68. Einhorn TA. Breakout session. 1: Definitions of fracture repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 1998(355 Suppl):S353.
69. Weber BG CO. Pseudoarthrosis: Pathology, Biomechanics, Therapy, Results. Switzerland: Hans Huber Medical Publisher; 1976.
70. Hernigou P, Beaujean F. [Bone marrow in patients with pseudarthrosis. A study of progenitor cells by in vitro cloning]. *Revue de chirurgie orthopedique et reparatrice de l'appareil moteur*. 1997;83(1):33-40.
71. Giannoudis PV, Jones E, Einhorn TA. Fracture healing and bone repair. *Injury*. 2011;42(6):549-50.
72. Dimitriou R, Carr IM, West RM, Markham AF, Giannoudis PV. Genetic predisposition to fracture non-union: a case control study of a preliminary single nucleotide polymorphisms analysis of the BMP pathway. *BMC musculoskeletal disorders*. 2011;12:44.
73. Copuroglu C, Calori GM, Giannoudis PV. Fracture non-union: who is at risk? *Injury*. 2013;44(11):1379-82.
74. Zeckey C, Hildebrand F, Glaubitz LM, Jurgens S, Ludwig T, Andruszkow H, et al. Are polymorphisms of molecules involved in bone healing correlated to aseptic femoral and tibial shaft non-unions? *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011;29(11):1724-31.
75. Hayda RA, Brighton CT, Esterhai JL, Jr. Pathophysiology of delayed healing. *Clinical orthopaedics and related research*. 1998(355 Suppl):S31-40.
76. Giannoudis PV, Schneider E. Principles of fixation of osteoporotic fractures. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2006;88(10):1272-8.
77. Hernigou J, Schuind F. Smoking as a predictor of negative outcome in diaphyseal fracture healing. *International orthopaedics*. 2013;37(5):883-7.
78. Aspenberg P. Drugs and fracture repair. *Acta orthopaedica*. 2005;76(6):741-8.
79. Kurmis AP, Kurmis TP, O'Brien JX, Dalen T. The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drug administration on acute phase fracture-healing: a review. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2012;94(9):815-23.

80. Krischak GD, Augat P, Blakytyn R, Claes L, Kinzl L, Beck A. The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2007;127(6):453-8.
81. Giannoudis PV, MacDonald DA, Matthews SJ, Smith RM, Furlong AJ, De Boer P. Nonunion of the femoral diaphysis. The influence of reaming and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2000;82(5):655-8.
82. Lynch JR, Taitsman LA, Barei DP, Nork SE. Femoral nonunion: risk factors and treatment options. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2008;16(2):88-97.
83. Calori GM, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L. Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury*. 2007;38 Suppl 2:S11-8.
84. Gelalis ID, Politis AN, Arnaoutoglou CM, Korompilias AV, Pakos EE, Vekris MD, et al. Diagnostic and treatment modalities in nonunions of the femoral shaft: a review. *Injury*. 2012;43(7):980-8.
85. Huang KC, Tong KM, Lin YM, Loh el W, Hsu CE. Evaluation of methods and timing in nail dynamisation for treating delayed healing femoral shaft fractures. *Injury*. 2012;43(10):1747-52.
86. Ruiz AL, Kealey WD, McCoy GF. Implant failure in tibial nailing. *Injury*. 2000;31(5):359-62.
87. Marino JT ZB. Use of solid and cancellous autologous bone graft for fractures and nonunions. *The Orthopedic clinics of North America*. 2010;41(1):15-26.
88. Megas P. Classification of non-union. *Injury*. 2005;36 Suppl 4:S30-7.
89. Calori GM, Phillips M, Jeetle S, Tagliabue L, Giannoudis PV. Classification of non-union: need for a new scoring system? *Injury*. 2008;39 Suppl 2:S59-63.
90. Crowley DJ, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Femoral diaphyseal aseptic non-unions: is there an ideal method of treatment? *Injury*. 2007;38 Suppl 2:S55-63.
91. Hak DJ. Management of aseptic tibial nonunion. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2011;19(9):563-73.
92. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. Annual review of cell and developmental biology. 2000;16:191-220.
93. Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S23-33.

94. Calori GM, Giannoudis PV. Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber. *Injury*. 2011;42(11):1191-3.
95. Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. 2000;45(3):346-53.
96. Pelissier P MA, Bareille R, et al. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors, and could stimulate bone regeneration. *J Orthop Res* 2004;22(1):73-9.
97. Giannoudis PV, Faour O, Goff T, Kanakaris N, Dimitriou R. Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions. *Injury*. 2011;42(6):591-8.
98. Fernandez-Bances I, Perez-Basterrechea M, Perez-Lopez S, Nunez Batalla D, Fernandez Rodriguez MA, Alvarez-Viejo M, et al. Repair of long-bone pseudoarthrosis with autologous bone marrow mononuclear cells combined with allogenic bone graft. *Cytotherapy*. 2013;15(5):571-7.
99. Khanfour AA, Zakzouk SA. Distal femur non-union after interlocked intramedullary nailing. Successful augmentation with wave plate and strut graft. *Acta orthopaedica Belgica*. 2012;78(4):492-9.
100. Said GZ, Said HG, el-Sharkawi MM. Failed intramedullary nailing of femur: open reduction and plate augmentation with the nail in situ. *International orthopaedics*. 2011;35(7):1089-92.
101. Nadkarni B, Srivastav S, Mittal V, Agarwal S. Use of locking compression plates for long bone nonunions without removing existing intramedullary nail: review of literature and our experience. *The Journal of trauma*. 2008;65(2):482-6.
102. Elster EA, Stojadinovic A, Forsberg J, Shawen S, Andersen RC, Schaden W. Extracorporeal shock wave therapy for nonunion of the tibia. *Journal of orthopaedic trauma*. 2010;24(3):133-41.
103. Simonis RB, Parnell EJ, Ray PS, Peacock JL. Electrical treatment of tibial non-union: a prospective, randomised, double-blind trial. *Injury*. 2003;34(5):357-62.
104. Goldstein C, Sprague S, Petrisor BA. Electrical stimulation for fracture healing: current evidence. *Journal of orthopaedic trauma*. 2010;24 Suppl 1:S62-5.
105. Watanabe Y, Matsushita T, Bhandari M, Zdero R, Schemitsch EH. Ultrasound for fracture healing: current evidence. *Journal of orthopaedic trauma*. 2010;24 Suppl 1:S56-61.
106. Homma Y, Zimmermann G, Hernigou P. Cellular therapies for the treatment of non-union: the past, present and future. *Injury*. 2013;44 Suppl 1:S46-9.

107. Conway JD. Autograft and nonunions: morbidity with intramedullary bone graft versus iliac crest bone graft. *The Orthopedic clinics of North America*. 2010;41(1):75-84; table of contents.
108. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury*. 2011;42 Suppl 2:S3-15.
109. Masquelet AC, Benko PE, Mathevon H, Hannouche D, Obert L, French Society of O, et al. Harvest of cortico-cancellous intramedullary femoral bone graft using the Reamer-Irrigator-Aspirator (RIA). *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*. 2012;98(2):227-32.
110. Schmidmaier G, Herrmann S, Green J, Weber T, Scharfenberger A, Haas NP, et al. Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. *Bone*. 2006;39(5):1156-63.
111. De Long WG, Jr., Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2007;89(3):649-58.
112. Ranly DM, McMillan J, Keller T, Lohmann CH, Meunch T, Cochran DL, et al. Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2005;87(9):2052-64.
113. Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2005;87(10):1434-8.
114. Peterson B, Whang PG, Iglesias R, Wang JC, Lieberman JR. Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. Preparations in a spine fusion model. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2004;86-A(10):2243-50.
115. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2002;84-A(12):2123-34.
116. Ristiniemi J, Flinkkila T, Hyvonen P, Lakovaara M, Pakarinen H, Jalovaara P. RhBMP-7 accelerates the healing in distal tibial fractures treated by external fixation. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2007;89(2):265-72.
117. Giannoudis PV, Kanakaris NK, Dimitriou R, Gill I, Kolimarala V, Montgomery RJ. The synergistic effect of autograft and BMP-7 in the treatment of

atrophic nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*. 2009;467(12):3239-48.

118. Kanakaris NK, Lasanianos N, Calori GM, Verdonk R, Blokhuis TJ, Cherubino P, et al. Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: a 4-year multicentre experience. *Injury*. 2009;40 Suppl 3:S54-61.

119. Giannoudis PV, Kontakis G. Treatment of long bone aseptic non-unions: monotherapy or polytherapy? *Injury*. 2009;40(10):1021-2.

120. Baksh D, Zandstra PW, Davies JE. A non-contact suspension culture approach to the culture of osteogenic cells derived from a CD49^{low} subpopulation of human bone marrow-derived cells. *Biotechnology and bioengineering*. 2007;98(6):1195-208.

121. Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta reumatologica portuguesa*. 2011;36(3):209-18.

122. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy*. 2007;9 Suppl 1:S1.

123. Solán XN. Tratamiento de la osteoporosis con fármacos osteoformadores y otros. Mecanismo de acción de la PTH 1-34, PTH intacta, denosumab, ranelato de estroncio, calcitonina y nuevos fármacos en perspectiva. *Medicine*. 2010;10(60):4144-8.

124. Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(11):6323-31.

125. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2001;16(6):1004-14.

126. Colombini A, Lombardi G, Galliera E, Dogliotti G, Randelli P, Meersseman A, et al. Plasma and drainage fluid levels of soluble receptor activator of nuclear factor-kB (sRANK), soluble receptor activator of nuclear factor-kB ligand (sRANKL) and osteoprotegerin (OPG) during proximal humerus fracture healing. *International orthopaedics*. 2011;35(5):777-82.

127. Zupan J, Mencej-Bedrac S, Jurkovic-Mlakar S, Prezelj J, Marc J. Gene-gene interactions in RANK/RANKL/OPG system influence bone mineral density in postmenopausal women. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;118(1-2):102-6.

128. Delos D, Yang X, Ricciardi BF, Myers ER, Bostrom MP, Camacho NP. The effects of RANKL inhibition on fracture healing and bone strength in a mouse

model of osteogenesis imperfecta. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 2008;26(2):153-64.

129. Williams BO. Insights into the mechanisms of sclerostin action in regulating bone mass accrual. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2014;29(1):24-8.

130. Komatsu DE, Mary MN, Schroeder RJ, Robling AG, Turner CH, Warden SJ. Modulation of Wnt signaling influences fracture repair. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 2010;28(7):928-36.

131. Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *The New England journal of medicine.* 2007;357(9):905-16.

132. Secreto FJ, Hoepfner LH, Westendorf JJ. Wnt signaling during fracture repair. *Current osteoporosis reports.* 2009;7(2):64-9.

133. Kedlaya R, Veera S, Horan DJ, Moss RE, Ayturk UM, Jacobsen CM, et al. Sclerostin inhibition reverses skeletal fragility in an Lrp5-deficient mouse model of OPGG syndrome. *Science translational medicine.* 2013;5(211):211ra158.

134. Chang MK, Kramer I, Keller H, Gooi JH, Collett C, Jenkins D, et al. Reversing LRP5-dependent osteoporosis and SOST deficiency-induced sclerosing bone disorders by altering WNT signaling activity. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2014;29(1):29-42.

135. Bukata SV. Systemic administration of pharmacological agents and bone repair: what can we expect. *Injury.* 2011;42(6):605-8.

136. Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone.* 2011;49(1):50-5.

137. Goldhahn J, Feron JM, Kanis J, Papapoulos S, Reginster JY, Rizzoli R, et al. Implications for fracture healing of current and new osteoporosis treatments: an ESCEO consensus paper. *Calcified tissue international.* 2012;90(5):343-53.

138. McDonald MM, Dulai S, Godfrey C, Amanat N, Szynda T, Little DG. Bolus or weekly zoledronic acid administration does not delay endochondral fracture repair but weekly dosing enhances delays in hard callus remodeling. *Bone.* 2008;43(4):653-62.

139. Eriksen EF, Lyles KW, Colon-Emeric CS, Pieper CF, Magaziner JS, Adachi JD, et al. Antifracture efficacy and reduction of mortality in relation to timing of the first dose of zoledronic acid after hip fracture. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2009;24(7):1308-13.

140. Tarantino U, Celi M, Feola M, Liuni FM, Resmini G, Iolascon G. A new antiresorptive approach to the treatment of fragility fractures: long-term efficacy and safety of denosumab. *Aging clinical and experimental research*. 2013;25 Suppl 1:S65-9.
141. Gerstenfeld LC, Sacks DJ, Pelis M, Mason ZD, Graves DT, Barrero M, et al. Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2009;24(2):196-208.
142. Pietrogrande L, Raimondo E. Teriparatide in the treatment of non-unions: scientific and clinical evidences. *Injury*. 2013;44 Suppl 1:S54-7.
143. Kakar S, Einhorn TA, Vora S, Miara LJ, Hon G, Wigner NA, et al. Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2007;22(12):1903-12.
144. Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA, et al. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2002;17(11):2038-47.
145. Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, Nino AJ, See K, Krohn K, et al. Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25(2):404-14.
146. Bashutski JD, Eber RM, Kinney JS, Benavides E, Maitra S, Braun TM, et al. Teriparatide and osseous regeneration in the oral cavity. *The New England journal of medicine*. 2010;363(25):2396-405.
147. Bruel A, Olsen J, Birkedal H, Risager M, Andreassen TT, Raffalt AC, et al. Strontium is incorporated into the fracture callus but does not influence the mechanical strength of healing rat fractures. *Calcified tissue international*. 2011;88(2):142-52.
148. Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*. 2008;42(1):129-38.
149. Fernandez JM, Molinuevo MS, McCarthy AD, Cortizo AM. Strontium ranelate stimulates the activity of bone-specific alkaline phosphatase: interaction with Zn(2+) and Mg (2+). *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 2014;27(3):601-7.

150. Brennan TC, Rybchyn MS, Green W, Atwa S, Conigrave AD, Mason RS. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *British journal of pharmacology*. 2009;157(7):1291-300.
151. Palacios S SBR, Valdés C, Vázquez F. Recomendaciones sobre ranelato de estroncio en el tratamiento de la osteoporosis. *Prog Obstet Ginecol*. 2012;55(1):38-9.
152. Atkins GJ, Welldon KJ, Halbout P, Findlay DM. Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2009;20(4):653-64.
153. Ammann P, Shen V, Robin B, Mauras Y, Bonjour JP, Rizzoli R. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004;19(12):2012-20.
154. Boivin G, Meunier PJ. The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2003;14 Suppl 3:S19-24.
155. Cattani-Lorente M, Rizzoli R, Ammann P. In vitro bone exposure to strontium improves bone material level properties. *Acta biomaterialia*. 2013;9(6):7005-13.
156. Dahl SG, Allain P, Marie PJ, Mauras Y, Boivin G, Ammann P, et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone*. 2001;28(4):446-53.
157. Meunier PJ, Slosman DO, Delmas PD, Sebert JL, Brandi ML, Albanese C, et al. Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis--a 2-year randomized placebo controlled trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(5):2060-6.
158. Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, Adami S, Compston J, Phenekos C, et al. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(5):2816-22.
159. Cebesoy O, Tutar E, Kose KC, Baltaci Y, Bagci C. Effect of strontium ranelate on fracture healing in rat tibia. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2007;74(6):590-3.

160. Li YF, Luo E, Feng G, Zhu SS, Li JH, Hu J. Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2010;21(11):1889-97.
161. Ozturan KE, Demir B, Yucel I, Cakici H, Yilmaz F, Haberal A. Effect of strontium ranelate on fracture healing in the osteoporotic rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011;29(1):138-42.
162. Szczesny G, Olszewski WL, Zagozda M, Rutkowska J, Czapnik Z, Swoboda-Kopec E, et al. Genetic factors responsible for long bone fractures non-union. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2011;131(2):275-81.
163. Dimitriou R, Kanakaris N, Soucacos PN, Giannoudis PV. Genetic predisposition to non-union: evidence today. *Injury*. 2013;44 Suppl 1:S50-3.
164. Niikura T, Hak DJ, Reddi AH. Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2006;24(7):1463-71.
165. Koh A, Niikura T, Lee SY, Oe K, Koga T, Dogaki Y, et al. Differential gene expression and immunolocalization of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins between experimental nonunions and standard healing fractures. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011;29(12):1820-6.
166. Hinsche AF, Giannoudis PV, Matthews SE, Smith RM. Spontaneous healing of large femoral cortical bone defects: does genetic predisposition play a role? *Acta orthopaedica Belgica*. 2003;69(5):441-6.
167. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005;36(12):1392-404.
168. Devlin RD, Du Z, Pereira RC, Kimble RB, Economides AN, Jorgetti V, et al. Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology*. 2003;144(5):1972-8.
169. Aspenberg P, Jeppsson C, Economides AN. The bone morphogenetic proteins antagonist Noggin inhibits membranous ossification. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2001;16(3):497-500.
170. Horiki M, Imamura T, Okamoto M, Hayashi M, Murai J, Myoui A, et al. Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. *The Journal of cell biology*. 2004;165(3):433-45.

171. Montero JL TMJ, Romero Vidal A. Modelos animales: Tipos y generalidades. In: Universidad de Alcalá SEpICdAdLS, editor. Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio. 1. Salamanca España: Universidad de Alcalá, Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL) 2008. p. 81-93.
172. Svendsen P HJ. Animal Models. Boca Ratón, Florida: CRC Press; 1994.
173. Rolling BE KM. The Experimental Animal in Biomedical Research. Boca Ratón, Florida: CRC Press; 1990.
174. Wright KC. Working with laboratory animals: general principles and practical considerations. Journal of vascular and interventional radiology : JVIR. 1997;8(3):363-73.
175. Mills LA, Simpson AH. In vivo models of bone repair. The Journal of bone and joint surgery British volume. 2012;94(7):865-74.
176. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, et al. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. Bone. 2011;49(4):591-9.
177. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. Endocrinology. 1998;139(2):663-70.
178. Oetgen ME, Merrell GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA. Development of a femoral non-union model in the mouse. Injury. 2008;39(10):1119-26.
179. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2003;21(3):503-10.
180. Geris L, Reed AA, Vander Sloten J, Simpson AH, Van Oosterwyck H. Occurrence and treatment of bone atrophic non-unions investigated by an integrative approach. PLoS computational biology. 2010;6(9):e1000915.
181. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumloffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, et al. Development of a reliable non-union model in mice. The Journal of surgical research. 2008;147(1):84-91.
182. Diez-Perez A, Guerri R, Nogues X, Caceres E, Pena MJ, Mellibovsky L, et al. Microindentation for in vivo measurement of bone tissue mechanical properties in humans. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2010;25(8):1877-85.

183. van der Meulen MC, Jepsen KJ, Mikic B. Understanding bone strength: size isn't everything. *Bone*. 2001;29(2):101-4.
184. Donnelly E. Methods for assessing bone quality: a review. *Clinical orthopaedics and related research*. 2011;469(8):2128-38.
185. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 1993;14(4):595-608.
186. Bridges D, Randall C, Hansma PK. A new device for performing reference point indentation without a reference probe. *The Review of scientific instruments*. 2012;83(4):044301.
187. Gallant MA, Brown DM, Organ JM, Allen MR, Burr DB. Reference-point indentation correlates with bone toughness assessed using whole-bone traditional mechanical testing. *Bone*. 2013;53(1):301-5.
188. Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1980;51(4):595-600.
189. Greenblatt MB, Shim JH, Glimcher LH. Mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Annual review of cell and developmental biology*. 2013;29:63-79.
190. Fukuda T, Takeda S. [Regulation of osteoblastic differentiation by Wnt signals]. *Clinical calcium*. 2013;23(6):825-30.
191. Mead TJ, Wang Q, Bhattaram P, Dy P, Afelik S, Jensen J, et al. A far-upstream (-70 kb) enhancer mediates Sox9 auto-regulation in somatic tissues during development and adult regeneration. *Nucleic acids research*. 2013;41(8):4459-69.
192. Urreizti R, Garcia-Giralt N, Riancho JA, Gonzalez-Macias J, Civit S, Gueri R, et al. COL1A1 haplotypes and hip fracture. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2012;27(4):950-3.
193. Niebler S, Bosserhoff AK. The transcription factor activating enhancer-binding protein epsilon (AP-2epsilon) regulates the core promoter of type II collagen (COL2A1). *The FEBS journal*. 2013;280(6):1397-408.
194. Villafan-Bernal JR, Sanchez-Enriquez S, Munoz-Valle JF. Molecular modulation of osteocalcin and its relevance in diabetes (Review). *International journal of molecular medicine*. 2011;28(3):283-93.
195. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi*. 2010;77(1):4-12.

196. Ke HZ, Richards WG, Li X, Ominsky MS. Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases. *Endocrine reviews*. 2012;33(5):747-83.
197. Mwale F, Yao G, Ouellet JA, Petit A, Antoniou J. Effect of parathyroid hormone on type X and type II collagen expression in mesenchymal stem cells from osteoarthritic patients. *Tissue engineering Part A*. 2010;16(11):3449-55.
198. Poser L, Matthys R, Schawalder P, Pearce S, Alini M, Zeiter S. A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs. *BioMed research international*. 2014;2014:348635.
199. Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comparative medicine*. 2001;51(4):292-9.
200. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European cells & materials*. 2007;13:1-10.
201. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 1984;2(1):97-101.
202. Park SH, O'Connor K, Sung R, McKellop H, Sarmiento A. Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model. *Journal of orthopaedic trauma*. 1999;13(2):114-20.
203. Zhao Z, Yang D, Ma X, Zhao H, Nie C, Si Z. Successful repair of a critical-sized bone defect in the rat femur with a newly developed external fixator. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2009;219(2):115-20.
204. Harrison LJ, Cunningham JL, Stromberg L, Goodship AE. Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model. *Journal of orthopaedic trauma*. 2003;17(1):11-21.
205. Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, Kuo YR, Yang KD, Huang HC, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2004;22(3):526-34.
206. Schoen M, Rotter R, Schattner S, Mittlmeier T, Claes L, Vollmar B, et al. Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2008;26(2):184-9.
207. Garcia P, Herwerth S, Matthys R, Holstein JH, Histing T, Menger MD, et al. The LockingMouseNail--a new implant for standardized stable osteosynthesis in mice. *The Journal of surgical research*. 2011;169(2):220-6.

208. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T. Development of a locking femur nail for mice. *Journal of biomechanics*. 2007;40(1):215-9.
209. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P. An experimental model for non-union in rats. *Injury*. 1995;26(10):681-6.
210. Montijo HE, Kellam JF, Gettys FK, Starman JS, Nelson MK, Bayoumi EM, et al. Utilization of the AO LockingRatNail in a novel rat femur critical defect model. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2012;25(6):381-6.
211. Boerckel JD, Dupont KM, Kolambkar YM, Lin AS, Guldberg RE. In vivo model for evaluating the effects of mechanical stimulation on tissue-engineered bone repair. *Journal of biomechanical engineering*. 2009;131(8):084502.
212. Johnson BA, Fallat LM. The effect of screw holes on bone strength. *The Journal of foot and ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons*. 1997;36(6):446-51.
213. Yu YY, Bahney C, Hu D, Marcucio RS, Miclau T, 3rd. Creating rigidly stabilized fractures for assessing intramembranous ossification, distraction osteogenesis, or healing of critical sized defects. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(62).
214. Thompson Z, Miclau T, Hu D, Helms JA. A model for intramembranous ossification during fracture healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2002;20(5):1091-8.
215. Claes L, Blakytyn R, Gockelmann M, Schoen M, Ignatius A, Willie B. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2009;27(1):22-7.
216. Garcia P, Histing T, Holstein JH, Klein M, Laschke MW, Matthys R, et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *European cells & materials*. 2013;26:1-12; discussion -4.
217. Hsu WK, Sugiyama O, Park SH, Conduah A, Feeley BT, Liu NQ, et al. Lentiviral-mediated BMP-2 gene transfer enhances healing of segmental femoral defects in rats. *Bone*. 2007;40(4):931-8.
218. Pek YS, Gao S, Arshad MS, Leck KJ, Ying JY. Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29(32):4300-5.
219. Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, Lee ES, Tan LG, Mattar CN, et al. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials*. 2010;31(4):608-20.

220. Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1984;66(2):274-9.
221. Hunt TR, Schwappach JR, Anderson HC. Healing of a segmental defect in the rat femur with use of an extract from a cultured human osteosarcoma cell-line (Saos-2). A preliminary report. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1996;78(1):41-8.
222. Burastero G, Scarfi S, Ferraris C, Fresia C, Sessarego N, Fruscione F, et al. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. *Bone*. 2010;47(1):117-26.
223. Schwarz C, Wulsten D, Ellinghaus A, Lienau J, Willie BM, Duda GN. Mechanical load modulates the stimulatory effect of BMP2 in a rat nonunion model. *Tissue engineering Part A*. 2013;19(1-2):247-54.
224. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of craniofacial surgery*. 1990;1(1):60-8.
225. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschlegel ME, Epari DR, Schutz MA, Duda GN, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*. 2009;30(12):2149-63.
226. Skaliczki G, Schandl K, Weszl M, Major T, Kovacs M, Skaliczki J, et al. Serum albumin enhances bone healing in a nonunion femoral defect model in rats: a computer tomography micromorphometry study. *International orthopaedics*. 2013;37(4):741-5.
227. Thormann U, Ray S, Sommer U, Elkhassawna T, Rehling T, Hundgeburth M, et al. Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Biomaterials*. 2013;34(34):8589-98.
228. Kaspar K, Matziolis G, Strube P, Senturk U, Dormann S, Bail HJ, et al. A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by external fixator. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2008;26(12):1649-55.
229. Dickson GR, Geddis C, Fazzalari N, Marsh D, Parkinson I. Microcomputed tomography imaging in a rat model of delayed union/non-union fracture. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2008;26(5):729-36.
230. Chaubey A, Grawe B, Meganck JA, Dymont N, Inzana J, Jiang X, et al. Structural and biomechanical responses of osseous healing: a novel murine

nonunion model. *Journal of orthopaedics and traumatology : official journal of the Italian Society of Orthopaedics and Traumatology*. 2013;14(4):247-57.

231. Boyd SK, Szabo E, Ammann P. Increased bone strength is associated with improved bone microarchitecture in intact female rats treated with strontium ranelate: a finite element analysis study. *Bone*. 2011;48(5):1109-16.

232. Oakes DA, Lee CC, Lieberman JR. An evaluation of human demineralized bone matrices in a rat femoral defect model. *Clinical orthopaedics and related research*. 2003(413):281-90.

233. Reginster JY, Kaufman JM, Goemaere S, Devogelaer JP, Benhamou CL, Felsenberg D, et al. Maintenance of antifracture efficacy over 10 years with strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2012;23(3):1115-22.

234. Delannoy P, Bazot D, Marie PJ. Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice. *Metabolism: clinical and experimental*. 2002;51(7):906-11.

235. Takaoka S, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T. The Calcium-sensing Receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast differentiation and mineralization. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2010;42(9):627-31.

236. Marie PJ. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2005;16 Suppl 1:S7-10.

237. Liu AL, Shen PW, Chen PJ. Strontium ranelate in fracture healing and joint pain improvement in a rheumatoid arthritis patient. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*. 2013;10(3):206-9.

238. McCann RM, Colleary G, Geddis C, Clarke SA, Jordan GR, Dickson GR, et al. Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2008;26(3):384-93.

239. Habermann B, Kafchitsas K, Olender G, Augat P, Kurth A. Strontium ranelate enhances callus strength more than PTH 1-34 in an osteoporotic rat model of fracture healing. *Calcified tissue international*. 2010;86(1):82-9.

240. Zacchetti G, Dayer R, Rizzoli R, Ammann P. Systemic treatment with strontium ranelate accelerates the filling of a bone defect and improves the

material level properties of the healing bone. *BioMed research international*. 2014;2014:549785.

241. Li Y, Feng G, Gao Y, Luo E, Liu X, Hu J. Strontium ranelate treatment enhances hydroxyapatite-coated titanium screws fixation in osteoporotic rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2010;28(5):578-82.

242. Maimoun L, Brennan TC, Badoud I, Dubois-Ferriere V, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate improves implant osseointegration. *Bone*. 2010;46(5):1436-41.

243. Steiner M, Claes L, Ignatius A, Simon U, Wehner T. Disadvantages of interfragmentary shear on fracture healing--mechanical insights through numerical simulation. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2014;32(7):865-72.

244. Brandi ML. Healing of the bone with anti-fracture drugs. Expert opinion on pharmacotherapy. 2013;14(11):1441-7.

245. Yalin S, Sagir O, Comelekoglu U, Berkoz M, Eroglu P. Strontium ranelate treatment improves oxidative damage in osteoporotic rat model. *Pharmacological reports : PR*. 2012;64(2):396-402.

246. Wu Y, Adeeb SM, Duke MJ, Munoz-Paniagua D, Doschak MR. Compositional and material properties of rat bone after bisphosphonate and/or Strontium ranelate drug treatment. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*. 2013;16(1):52-64.

247. Raouf A, Seth A. Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays. *Bone*. 2002;30(3):463-71.

248. Kurdy NM. Serology of abnormal fracture healing: the role of PIIINP, PICP, and BsALP. *Journal of orthopaedic trauma*. 2000;14(1):48-53.

249. Vaisman DN, McCarthy AD, Cortizo AM. Bone-specific alkaline phosphatase activity is inhibited by bisphosphonates: role of divalent cations. *Biological trace element research*. 2005;104(2):131-40.

250. Yamaguchi M, Weitzmann MN. The intact strontium ranelate complex stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF-kappaB activation. *Molecular and cellular biochemistry*. 2012;359(1-2):399-407.

251. Barbara A, Delannoy P, Denis BG, Marie PJ. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. *Metabolism: clinical and experimental*. 2004;53(4):532-7.

252. Alegre DN, Ribeiro C, Sousa C, Correia J, Silva L, de Almeida L. Possible benefits of strontium ranelate in complicated long bone fractures. *Rheumatology international*. 2012;32(2):439-43.
253. Tarantino U, Celi M, Saturnino L, Scialdoni A, Cerocchi I. Strontium Ranelate and bone healing: report of two cases. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*. 2010;7(1):65-8.
254. Salvin S QL, Maset M, Lombardi S; Sacco S, Mansutti E. Strontium ranelate and femoral fracture healing during rheumatoid arthritis and osteoporosis. *Bone*.2009(45).
255. Kaufman JM, Audran M, Bianchi G, Braga V, Diaz-Curiel M, Francis RM, et al. Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of osteoporosis in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(2):592-601.
256. Bolland MJ, Grey A. A comparison of adverse event and fracture efficacy data for strontium ranelate in regulatory documents and the publication record. *BMJ open*. 2014;4(10):e005787.
257. Reginster JY. Cardiac concerns associated with strontium ranelate. *Expert opinion on drug safety*. 2014;13(9):1209-13.
258. Audran M, Jakob FJ, Palacios S, Brandi ML, Broll H, Hamdy NA, et al. A large prospective European cohort study of patients treated with strontium ranelate and followed up over 3 years. *Rheumatology international*. 2013;33(9):2231-9.
259. Taubel J, Naseem A, Wang D, Arezina R, Lorch U, Camm AJ. Repeated supratherapeutic dosing of strontium ranelate over 15 days does not prolong QT(c) interval in healthy volunteers. *British journal of clinical pharmacology*. 2012;74(2):296-303.
260. Chong CP, van Gaal WJ, Savige J, Lim WK. Cardiac injury and troponin testing after orthopaedic surgery. *Injury*. 2011;42(9):855-63.
261. Khan SK, Rushton SP, Shields DW, Corsar KG, Refaie R, Gray AC, et al. The risk of cardiorespiratory deaths persists beyond 30 days after proximal femoral fracture surgery. *Injury*. 2014.