

Efectos de la desperiostización metafisaria sobre el cartílago de crecimiento y el desarrollo tibial: Estudio experimental en conejos Nueva-Zelanda

ZAFRA JIMÉNEZ, J. A.*; MORATINOS PALOMERO, P.**, y RESINES ERASUN, C*.

*Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología II. Hospital 12 de Octubre. Madrid. **Unidad de Anatomía Patológica Experimental. Hospital Militar Central «Gómez Ulla». Madrid.

RESUMEN: Objetivo: Evaluar si la sección de las fibras del periostio en la metafisis proximal de la tibia es un estímulo del crecimiento óseo.

Material y método: Estudio experimental con grupos apareados. Sujetos: 36 conejos blancos raza Nueva Zelanda intervenidos a las 6 semanas de edad. Fueron distribuidos en cinco series: serie I sacrificados a las 8 semanas de edad, serie II sacrificados a las 10 semanas de edad, serie III sacrificados a las 14 semanas de edad, serie IV sacrificados a las 10 semanas de edad pero reintervenidos a las 8 semanas de edad, y serie V sacrificados durante las 2 primeras semanas después de la cirugía.

Técnica quirúrgica: sección circunferencial del periostio en la metafisis proximal de la tibia derecha del conejo; tibia izquierda: tibia control. Los parámetros evaluados, de las tibias control y de las tibias problema, fueron los siguientes: radiológicos (incrementos de longitud de las tibias, ángulo epifisodiafisario y ángulo diafisario), macroscópicos (longitud, peso, volumen, ancho metafisario y ancho diafisario), histológicos (grosor del cartílago de crecimiento, de la zona proliferativa, de la zona hipertrófica, y citometría de flujo).

Resultados: El tamaño macroscópico de las tibias problema era mayor al de las de control ($p < 0,05$). El incremento de longitud ocurría durante las dos primeras semanas tras la desperiostización ($p < 0,05$). No se objetivó mayor actividad celular del cartílago de crecimiento tras la desperiostización.

Conclusiones: La desperiostización circunferencial metafisaria de los huesos largos es un estímulo del crecimiento óseo.

PALABRAS CLAVE: Placa crecimiento. Periostio. Crecimiento óseo. Experimental

Correspondencia:

Dr. J. A. ZAFRA JIMÉNEZ.
Ctra. del Mediodía, 46, 1.º A. 28050 Madrid.
Tel. 91 625 23 58.
e-mail: anazafra@arrakis.es

Recibido: Abril de 2002.
Aceptado: Abril de 2002.

Effects of metaphyseal periosteum section of the growth cartilage and tibial development. Experimental study in New Zealand rabbits

SUMMARY: Objective: To determine if section of the periosteal fibers of the proximal tibial metaphysis stimulates bone growth.

Materials and methods: Experimental study of paired groups.

Subjects: Thirty-six white New Zealand rabbits operated on at age 6 weeks. They were distributed into five series: series I was sacrificed at 8 weeks, series II at 10 weeks, series III at 14 weeks, series IV was sacrificed at 10 weeks but reoperated at 8 weeks, and series V, sacrificed in the course of the first two weeks after surgery.

Surgical technique: Circumferential section of the periosteum of the proximal metaphysis of the right tibia of the rabbit. The left tibia remained unchanged as a control. The parameters evaluated in the test and control tibias were radiological (increased tibial length, epiphyseo-diaphyseal angle, and diaphyseal angle), macroscopic (length, weight, volume, metaphyseal width, and diaphyseal width), histological (thickness of the growth cartilage, proliferative zone, hypertrophic zone, and flow cytometry).

Results: The macroscopic size of the test tibia was greater than in controls ($p < 0.05$). Length increased in the first two weeks after periosteal section ($p < 0.05$). No greater cell activity was observed in the growth cartilage after periosteal section.

Conclusion: Metaphyseal circumferential periosteal section of long bones stimulates bone growth.

KEY WORDS: Growth plate. Periosteum. Bone development.

El crecimiento óseo es el resultado de la proliferación y maduración de los condrocitos del cartílago de crecimiento, y de la síntesis de macromoléculas por parte de éstos. Estas funciones pueden ser moduladas por factores químicos o mecánicos.

La presencia de un factor químico que aumentara el crecimiento óseo ya fue referida por Lacroix en 1951; este autor sostenía que los huesos fracturados secretaban una sustancia que llamó osteogenina responsable del aumento de longitud que se observaba en estos huesos¹. Más recientemente se ha estudiado que diversas hormonas pueden estimular diversas funciones del cartílago de crecimiento. Así la tiroxina aumenta la proliferación celular en la capa proliferativa al aumentar la síntesis de ADN². Los factores de crecimiento, ILE-I, ILE-III, FGF, EGF, PDGF, TGF- β , aumentan la producción de proteínas en la capa hipertrófica³. La calcitonina aumenta la calcificación en la metáfisis al disminuir la actividad de los osteoclastos^{4,5}.

Los factores mecánicos modifican también la actividad de la fisis. Las fuerzas de compresión disminuyen el crecimiento óseo, mientras que las de distracción lo aumentan, según la ley de Hueter-Volkmann. Existen varios ejemplos clínicos. Así en la escoliosis idiopática juvenil, el acuñaamiento vertebral es progresivo una vez que se ha deformado la vértebra; esto se debe a que la placa de crecimiento de la vértebra recibe cargas asimétricas. El lado cóncavo de la curva experimenta fuerzas de compresión mayores que el convexo; esta mayor compresión determina una disminución de la actividad del cartílago de crecimiento de la zona cóncava. Por esta zona cóncava la vértebra crece menos y se acuña más, estableciéndose un círculo vicioso. En las fracturas mediales metafisarias de tibia en tallo verde, debido a la rotura del periostio en el lado medial, existe un mayor crecimiento de la fisis a este nivel, y una deformidad en valgo de la rodilla^{6,7}.

Varios estudios experimentales también se han explicado por esta ley. Cuando se produce una compresión sobre el cartílago de crecimiento disminuye la síntesis de proteínas, de proteoglicanos, y aumentan las concentraciones en la matriz de H⁺ y K⁺⁸. La síntesis de proteínas y proteoglicanos aumenta al dejar de actuar las fuerzas de compresión⁹.

El periostio, al unirse a las fibras del anillo pericondral de De Lacroix y a las de la epífisis y metáfisis, produce fuerzas compresivas sobre el cartílago de crecimiento a través de sus densas fibras longitudinales. La desperiostización disminuiría estas fuerzas de compresión, pudiendo estimular la fisis y, por tanto, el crecimiento longitudinal del hueso. La bibliografía recoge varios estudios que han partido de este supuesto, no siendo concluyentes sus resultados¹⁰⁻¹⁷.

El objetivo de este trabajo es establecer si la desperiostización metafisaria circunferencial de los huesos largos produce un aumento en el tamaño de éstos y si ello se debe a un aumento en la proliferación celular del cartílago de crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio experimental con grupos apareados. Los sujetos estudio fueron conejos Nueva Zelanda de

6 semanas de edad. Se observaron las tibias de estos animales; la tibia izquierda fue la control, y la derecha la problema.

Se utilizaron en el estudio 36 animales. Los sujetos fueron distribuidos en cinco series. En la serie I los animales fueron sacrificados a la 8.^a semana de edad. En la serie II el sacrificio se llevó a cabo a la 10.^a semana de edad. Estas dos series estaban compuestas por 6 animales, número suficiente para poder realizar un estudio estadístico de tendencias mediante test no paramétricos. En la serie III el sacrificio de los animales tuvo lugar durante la 14.^a semana de edad; el número de sujetos estudio de esta serie fue de 12, número de sujetos necesario para realizar comparación de medias mediante test paramétricos. En los animales de la serie IV se realizaron 2 desperiostizaciones; la primera a las 6 semanas como en las otras series, y la segunda a las 8 semanas, justo en el momento en el cual cesaba el estímulo para el crecimiento que había producido la primera desperiostización, para observar si esta reintervención era un nuevo estímulo para el crecimiento de la tibia. El análisis estadístico precisaba también un mínimo de 6 sujetos. Por último se añadió una serie V, compuesta por 6 animales, sacrificados durante las dos primeras semanas después de la cirugía, en la cual se realizaron los estudios de citometría de flujo.

La técnica quirúrgica utilizada en las tibias problema fue la siguiente: se realizó una incisión cutánea en U centrada en la tuberosidad anterior de la tibia. A través de ésta se realizó una sección circunferencial del periostio, en la metáfisis proximal de la tibia derecha. La misma técnica quirúrgica pero sin desperiostizar se realizó en la tibia control (figs. 1, 2 y 3).

Durante todo el período experimental se realizaron controles clínicos de la marcha, reflejos, tamaño del animal y estado de la herida.

En el momento de la cirugía y en el momento del sacrificio de los animales se determinaron diferentes parámetros bioquímicos: glucosa, sodio, potasio, fósforo, calcio, fosfatasa alcalina y osteocalcina.

Una vez sacrificados los animales, se procedió al estudio macroscópico de las tibias de los animales para saber si exis-



Figura 1. Incisión en U en la cara anterior de la tibia centrada en tuberosidad tibial anterior.



Figura 2. Sección del periostio en la cara externa de la tibia con una dirección paralela a la fisis, 1 cm distal a ésta.

tía un aumento de tamaño. Se midieron la longitud, el ancho metafisario, el ancho diafisario, el peso, y el volumen de las tibias control y las tibias problema. La talla se midió, mediante un calibrador con una sensibilidad de 0,5 mm, desde la superficie articular del platillo interno de la meseta tibial hasta la superficie articular del maleolo medial. El peso se determinó con un peso digital con una sensibilidad de 0,01 g. El volumen de las tibias se calculó introduciendo la tibia



Figura 3. Sección del periostio en la cara medial de la tibia con una dirección paralela a la fisis, 1 cm distal a ésta.

en una probeta, con un volumen de agua determinado, obteniendo otro volumen al introducir la tibia. El volumen de la tibia era la diferencia entre los dos volúmenes anteriores.

Se realizaron controles radiológicos durante todo el proceso experimental: en el momento de la cirugía, posteriormente cada dos semanas y por último en el momento del sacrificio. Los valores que se calcularon fueron la longitud tibial, el incremento de longitud de las tibias cada dos semanas, el ángulo epifisodiafisario y el ángulo axial o diafisario. La medición de la longitud tibial se realizó desde la superficie articular del cóndilo medial hasta la superficie articular del maleolo medial, como en la medición macroscópica (fig. 4). A partir de la longitud tibial medida desde el momento de la cirugía hasta el momento del sacrificio se pudo calcular el incremento de longitud de las tibias cada dos semanas. El ángulo epifisodiafisario es el complementario al formado por la línea de unión entre los puntos más



Figura 4. Medición radiológica de la longitud tibial.

proximales de la metafisis proximal de la tibia y por la línea que une los dos puntos medios de las epífisis proximal y distal (fig. 5). El ángulo axial o diafisario se obtuvo a partir del ángulo formado entre las líneas que unían el punto medio de la diáfisis con el punto medio de la epífisis proximal y el punto medio de la epífisis distal (fig. 6). Estas mediciones siempre se realizaron a la misma distancia focal para que los porcentajes de magnificación fuesen iguales.

El análisis histológico constaba de dos partes. Un análisis morfológico del cartílago de crecimiento y sus estructuras vecinas, utilizando diferentes sistemas de tinción: hematoxilina-eosina, azul de metileno, PAS, tricrómica de Masson, Wilder, Gallego, von Kossa, y observando si existían diferencias la estructura de la fisis, morfología celular o disposición de la matriz, entre las tibias problema y las tibias control. Además, se analizó la estructura del hueso epifisario y metafisario.

La segunda parte del análisis histológico tenía como objetivo estudiar si existía una mayor proliferación celular del cartílago de crecimiento de las tibias problema, mediante un análisis de histomorfometría, calculando el grosor del cartílago de crecimiento y de cada una de sus zonas, y un análisis de citometría de flujo.

El grosor del cartílago de crecimiento se midió desde el borde del hueso subcondral hasta la última capa de condrocitos hipertróficos, antes de la zona vascular. La altura de la zona proliferativa se calculó desde la zona de inicio de las columnas, hasta la zona en la cual los condrocitos aumentan en volumen y tienen una longitud igual a su anchura. La altura de la capa hipertrófica se midió desde el límite de la zona anterior hasta la zona en la cual el último tabique transversal no está calcificado. En cada tibia se utilizaron 10 cortes, donde se efectuaron 20 mediciones del grosor de la fisis, de la capa proliferativa y de la capa hipertrófica. Estas mediciones se



Figura 5. Medición radiológica del ángulo epifiso-diafisario.



Figura 6. Medición radiológica del ángulo axial o diafisario.

compararon con las mismas mediciones de la tibia contralateral. Estas mediciones también se realizaron mediante una plantilla reticulada incorporada al objetivo del microscopio.

El análisis de citometría de flujo se llevó a cabo con la serie V, integrada por 6 conejos blancos neozelandeses intervenidos a las 6 semanas de edad, sacrificados al segundo, quinto, séptimo, noveno, undécimo y decimotercer día después de la cirugía. La pata problema fue la pata derecha, y la pata control fue la pata izquierda. Tras el procesado histológico se procedió a la selección de la banda correspondiente al cartílago de crecimiento (zonas proliferativa e hipertrófica) para la suspensión celular. Se preparó la suspensión celular mediante la técnica de Hedley modificada, realizando tinción con yoduro de propidio. La adquisición y lectura de las suspensiones se efectuó con citómetro FACScan™ (Becton-Dickinson) y análisis con el software ModFit LT v2,0™ (Verity Software House) para Windows 95™. Se evaluó la ploidía, número de eventos analizados, porcentaje de eventos que representan artefactos, bondad de ajuste del modelo propuesto a los datos observados, porcentaje de variación en la población G1, porcentaje de células en fase G1, porcentaje de células en fase S, porcentaje de células en fase G2, e índice de ADN.

El análisis estadístico de los datos anteriores se realizó utilizando el programa informático *Microsoft Excel*®. Los test paramétricos utilizados fueron t-Student para muestras apareadas y ANOVA, para comparaciones múltiples. Los test no paramétricos fueron test de Wilcoxon para muestras aparadas y test de Kruskal-Wallis en comparaciones múltiples.

RESULTADOS

Los controles clínicos mostraron que el número de complicaciones de la técnica quirúrgica era mínimo, y que el crecimiento del animal seguía un ritmo normal.

Los resultados de los parámetros bioquímicos fueron que los valores de la glucosa, sodio, potasio, calcio, fósforo, calcitonina y osteocalcina eran normales antes y después de la cirugía.

Los resultados de las mediciones macroscópicas de las tibias problema y las tibias control fueron los siguientes. La longitud de las tibias problema era mayor que las de las tibias control. En la serie I, las tibias problema tenían una longitud de 1,4 mm mayor que su correspondiente control; en la serie II de 1,7 mm; en la serie III de 2 mm; y en la serie IV de 2,7 mm, con una significación estadística del 0,01 para la serie III, y de 0,05 para las series I, II y IV (tabla 1) (fig. 7). El peso de todas las tibias problema era superior al de su correspondiente control. Como promedio lo era en 0,59 g en la serie I, 0,41 g en la II, 0,54 g en la III y 0,93 en la IV. Estos valores eran estadísticamente significativos con un error (del 0,05 en las series I, II y IV, y 0,01 en la serie III (tabla 2). Los valores del volumen siguieron la misma



Figura 7. Imagen de las tibias control y tibias problema del mismo animal tras la necropsia.

Tabla 1. Valores estadísticos de la longitud macroscópica de las tibias

	Tibias problema	Tibias control	p
Serie I	71,2	69,7	0,05
Serie II	85,5	83,8	0,05
Serie III	99,5	97,8	0,01
Serie IV	85,8	83,1	0,05

Tibias problema: Longitud promedio de las tibias problema de cada una de las series. Valores expresados en milímetros. Tibias control: Longitud promedio de las tibias control de cada una de las series. Valores expresados en milímetros. P: Estadístico p.

Tabla 2. Valores estadísticos del peso de las tibias

	Tibias problema	Tibias control	p
Serie I	4,61	4,02	0,05
Serie II	6,65	6,24	0,05
Serie III	8,77	8,23	0,01
Serie IV	6,47	5,54	0,05

Tibias problema: Peso promedio de las tibias problema de cada una de las series. Valores expresados en gramos. Tibias control: Peso promedio de las tibias control de cada una de las series. Valores expresados en gramos. P: Estadístico p.

tendencia, claramente superiores los de las tibias problema respecto a sus correspondientes control. Como promedio las tibias problema tenían un volumen superior de 5 mm³ en las series I, II y III, y de 10 mm³ en la serie IV, con unos niveles de significación del 0,01 para la serie III, y de 0,05 para las series I, II y IV (tabla 3). Además, se observó que en las tibias problema de la serie IV el incremento de volumen, peso y longitud era superior al incremento registrado en las tibias problema de las otras series, con una significación estadística del 0,01. Los anchos metafisario y diafisario, no variaron entre las tibias control y las tibias problema, en ninguna de las series. Este dato relaciona directamente el incremento de peso y volumen con el incremento de longitud.

Los resultados radiológicos obtenidos fueron los siguientes: el incremento de longitud de la serie I fue de 1,4 mm durante las 2 primeras semanas; en la serie II fue de 1,9 mm durante las 2 primeras semanas, no existiendo sobrecrecimiento en las 2 siguientes semanas; en la serie III se observaron los mismos resultados, sobrecrecimiento de las tibias problema de 1,9 mm durante las dos primeras semanas tras la cirugía, no existiendo sobrecrecimiento en las 6 semanas siguientes; en la serie IV se observó un incremento de longitud de 1,6 mm durante las dos primeras semanas después de la primera cirugía, y de 0,9 mm después de la segunda cirugía. Es decir, el incremento de longitud de las tibias desperiostizadas ocurría sólo durante las dos primeras semanas después de la segunda desperiostización. Los valores de longitud radiológicos en el momento del sacrificio fueron iguales a los obtenidos macroscópicamente (error α 0,05), en cada una de las series, considerando el factor de magnificación radiológico. En nuestras series observamos una deformidad en valgo

Tabla 3. Valores estadísticos del volumen de las tibias

	Tibias problema	Tibias control	p
Serie I	37,5	32,5	0,05
Serie II	54,1	48,3	0,05
Serie III	64,1	57,9	0,01
Serie IV	52,5	42,5	0,05

Tibias problema: Volumen promedio de las tibias problema de cada una de las series. Valores expresados en milímetros cúbicos. Tibias control: Volumen promedio de las tibias control de cada una de las series. Valores expresados en milímetros cúbicos. P: Estadístico p.

de las tibias desperiostizadas pues existía un aumento del ángulo epifisodiafisario; esta deformidad era estadísticamente significativa (error α 0,01) en la serie III, y en las series I y II (error α 0,05). En las series I y II eran de 3°, en la serie III era de 4°, y en la serie IV era de 6°. En las tibias desperiostizadas de los conejos de la serie IV había una deformidad en valgo mayor, estadísticamente significativa (error α 0,05) respecto a las otras series. La desperiostización repetida aumentaba la deformidad. El ángulo diafisario mostraba unos valores superiores en las tibias desperiostizadas en las tres primeras series, entre 2 y 7°, siendo estadísticamente significativos en las series II y III (Serie II α : 0,05. Serie III α : 0,05). En la serie I este valor no fue estadísticamente significativo. En las tibias de la serie IV el valor del ángulo diafisario fue 11° mayor por término medio (Serie IV α : 0,05) (fig. 8). Esta deformidad era significativamente mayor en las tibias problema de la serie IV respecto a las tibias problema de la serie II y III con una seguridad del 99% (error α : 0,01).

Los resultados del análisis histológico fueron los siguientes. En nuestras series no se observaron diferencias morfológicas entre el grupo de las tibias desperiostizadas y el de las tibias control. La orientación de los vasos de la fisis y de las fibras del periostio de los 2 grupos eran similares (fig. 9). Tampoco se encontraron alteraciones en la es-

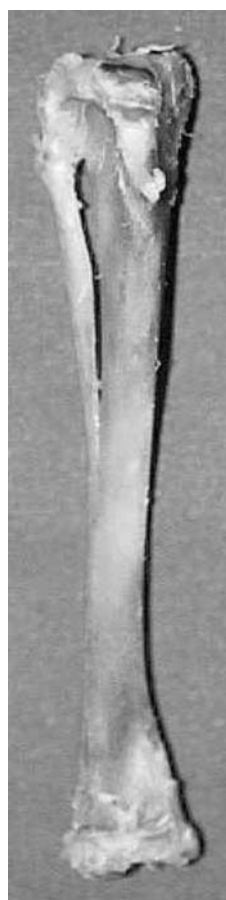


Figura 8. Aumento del ángulo diafisario en las tibias problema.

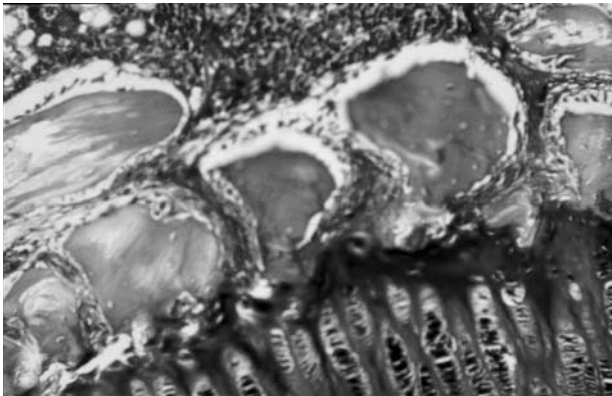


Figura 9. Conejo 5. Serie III. Tibia problema. Disposición arciforme de las ramas arteriolares de la arteria epifisaria, antes de alcanzar la zona de reserva del cartílago de crecimiento. Tinción de Azul de Toluidina $\times 400$.

estructura de la fisis, morfología celular y disposición de la matriz (fig. 10). Asimismo la estructura del hueso metafisario y epifisario fueron normales.

Los estudios de histomorfometría mostraron que no existían diferencias estadísticamente significativas en el grosor total de la fisis, el grosor de la zona proliferativa y el grosor de la zona hipertrófica del cartílago de crecimiento, entre las tibias problema y las tibias control (tabla 4). Los estudios de citometría de flujo no encontraron un mayor porcentaje de células en fase S en el cartílago de crecimiento de las tibias problema que en el de las tibias control (tabla 5).

DISCUSIÓN

Aunque la relación del periostio con la actividad del cartílago de crecimiento es un tema estudiado desde hace varias décadas, no hay trabajos concluyentes en la bibliografía que relacionen la desperiostización con un aumento del tamaño del hueso medido macroscópicamente. Sólo se han encontrado 3 trabajos publicados en la bibliografía que

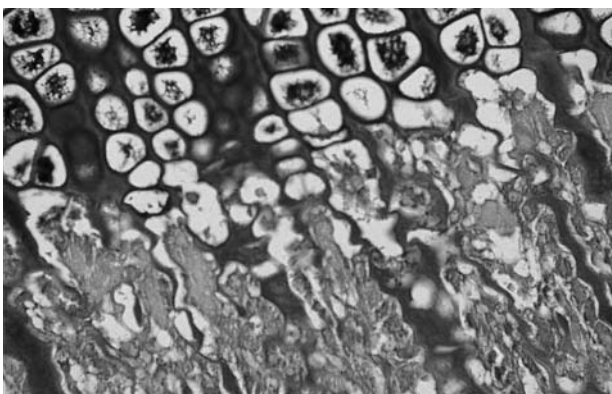


Figura 10. Conejo 2. Serie I. Tibia problema. Formación de osteoide en la metafisis siguiendo el esqueleto cartilaginoso de la zona degenerativa. Tinción Masson $\times 1.000$.

Tabla 4. Valores promedio del grosor de las zonas del cartílago de crecimiento

		Tibia problema			Tibia control		
		PZ	HZ	T	PZ	HZ	T
Serie I	Conejo 1	175	267	510	178	283	514
	Conejo 2	148	312	529	156	304	524
	Conejo 3	229	325	621	244	333	636
	Conejo 5	223	329	604	219	323	588
Serie II	Conejo 1	175	267	510	178	283	514
	Conejo 2	148	312	529	156	304	524
	Conejo 3	229	325	621	244	333	636
	Conejo 5	223	329	604	219	323	588
Serie III	Conejo 1	225	302	576	210	295	573
	Conejo 2	223	310	590	223	308	579
	Conejo 3	156	225	423	171	224	460
	Conejo 4	179	227	482	183	246	459
	Conejo 5	208	225	504	200	239	479
	Conejo 6	184	205	440	190	225	455
	Conejo 7	129	146	313	127	157	335
	Conejo 8	181	235	466	182	242	469
	Conejo 9	180	233	457	177	235	480
	Conejo 10	179	267	485	180	269	490
Serie IV	Conejo 1	208	208	479	208	208	471
	Conejo 2	221	295	587	242	295	587
	Conejo 5	214	292	554	218	289	557
	Conejo 6	212	341	612	219	341	623

PZ: Longitud de la zona proliferativa. HZ: Longitud de la zona hipertrófica. T: Grosor total de la fisis. Resultados en μ .

realicen una medición macroscópica de la longitud de las tibias tras la desperiostización. El peso y el volumen, que por la metodología de obtención son los valores más fiables, no han sido utilizados por ningún autor^{12,13,17}.

Warrell y Taylor obtuvieron una longitud mayor en las tibias de las ratas desperiostizadas circunferencialmente. Las diferencias fueron escasas entre 0,45 mm a 0,69 mm. Las observaciones las realizaron 34 días después de la cirugía¹³.

Dimitrou, Karpetanos y Symeonides, realizaron una incisión hemicircunferencial en la extremidad proximal de tibias de conejos Nueva Zelanda de 6 semanas de edad, obteniendo unos resultados similares a los nuestros. Sin embargo, los resultados no pudieron ser concluyentes porque las series utilizadas fueron menores y el análisis estadístico no era válido¹⁷.

Tabla 5. Resultados de la citometría de flujo

	Tibia problema	Tibia control
Conejo 1	33,08	42,58
Conejo 2	35,76	63,51
Conejo 3	31,89	44,92
Conejo 4	19,85	64,91
Conejo 5	25,56	2,00
Conejo 6	20,70	24,64

Porcentaje de células en fase S.

Houghton y Deckel en 1976 analizaron mediante una medición macroscópica, los efectos que la desperiostización produce sobre el crecimiento de los huesos largos; utilizaron húmeros de ratas y midieron su longitud. Sin embargo, la técnica quirúrgica consistió en una desperiostización del tercio medio del hueso¹².

Los resultados obtenidos en el trabajo presentado muestran que la desperiostización produce un aumento en el tamaño macroscópico de los huesos, medido directamente, tanto de la longitud, del volumen y del peso, y que, además, este aumento es estadísticamente significativo.

¿Cuándo ocurre el incremento de longitud de las tibias? Los resultados obtenidos por otros autores encuentran un crecimiento uniforme durante todo el período experimental. Así, Houghton y Deckel, obtenían más incremento de longitud en los húmeros sacrificados a las 3 semanas de la cirugía, 0,30 mm, frente a los 0,15 mm que aumentan a la semana¹². Carvell obtenía un sobrecrecimiento de las tibias desperiostizadas, de 0,21 mm, a los 10 días de la cirugía, y de 0,97 mm a los 50 días de la cirugía¹⁴. En las series de Dimitrou, Karpetanos y Symeonides, que utilizaron una metodología similar a la nuestra, los valores de sobrecrecimiento fueron de 1 o 2 mm, pero el aumento de longitud sucede durante todo el período experimental¹⁷.

Los resultados obtenidos en el trabajo presentado son distintos a los anteriores pues sólo hay aumento de longitud las dos primeras semanas tras la desperiostización.

El estudio radiológico nos permitió, además, analizar las deformidades angulares secundarias a fuerzas de compresión sobre el cartílago de crecimiento, distintas a las del periostio, como son las del peroné y los tendones de la pata de ganso.

En las tibias desperiostizadas existe una deformidad en valgo, que aumenta cuando se realizan dos desperiostizaciones. Esta deformidad se debe a las fuerzas de tracción ejercidas por el peroné sobre el cartílago de crecimiento. Así, la tibia al crecer está sujeta a las fuerzas de compresión del periostio, del peroné y de los tendones de la pata de ganso. El cartílago de crecimiento de las tibias problema tras la cirugía sólo recibe el efecto de compresión en la zona externa realizado por el peroné. El peroné puede influir sobre la fisis si el ritmo de crecimiento de ésta aumenta, como sucede con la desperiostización. En ese caso, el peroné, al no tener un ritmo de crecimiento similar al de la tibia, supone un freno para la fisis proximal de la tibia en la zona posterolateral, y se produce una deformidad en valgo. Este efecto ya fue señalado por Carvell y en nuestro trabajo se objetiva nuevamente. Ahora bien, si el ritmo de crecimiento de la tibia fuese normal, la presencia del peroné no supone ninguna fuerza de compresión o distracción que pudiese modificar la actividad de su fisis¹⁴.

Dimitrou, Karpetanos y Symeonides describieron que las tibias tras la sección del periostio tenían una deformidad en S, más acusada en las últimas semanas del período expe-

rimental¹⁷. Esta deformidad en S durante las últimas semanas se debía a que la deformidad en valgo aumentaba y la diáfisis tibial contrarrestaba esta deformidad. Esta deformidad también se obtiene en las tibias desperiostizadas del trabajo presentado, con unos valores y cronología muy similares; el menor valor se obtiene la 2.^a semana después de la cirugía, pero alcanza su máximo valor en la 4.^a semana después de la cirugía.

Llama la atención el que el mayor valor de la deformidad en S ocurra dos semanas después de la máxima deformidad en valgo. Esto se debe a que la deformidad en S es una respuesta de la fisis distal a la deformidad en valgo que ocurre en la metafisis proximal de la tibia. El cartílago de crecimiento tiene una morfología para resistir las fuerzas de compresión; por ello se dispone perpendicularmente a ellas. Cuando la tibia se deforma en valgo, el cartílago de crecimiento distal recibe una carga asimétrica, por lo que realiza un crecimiento también asimétrico hasta que se dispone perpendicularmente a las fuerzas de compresión. Este proceso de remodelación se traduce en la tibia en la deformidad en S y en el aumento del ángulo diafisario, fenómenos que suceden después de la deformidad inicial en valgo. Lógicamente cuanto mayor sea la deformidad en valgo mayor será la deformidad en S de la tibia como sucede en las series presentadas. La deformidad en S es responsabilidad del cartílago de crecimiento distal, que mantiene, sin embargo, su ritmo de crecimiento inferior al proximal. Estos hallazgos nos permiten observar cómo el cartílago de crecimiento responde a la modificación de las condiciones biomecánicas.

El cartílago de crecimiento es la estructura histológica responsable de los cambios referidos anteriormente. Por ello, el siguiente paso del estudio experimental fue analizar si existía una mayor proliferación celular.

Para estudiar la proliferación celular de la fisis se tomó como medida el grosor de ésta. Kember afirmó que el grosor de la capa proliferativa de la rata variaba poco durante el crecimiento óseo. Sin embargo, un estudio más detenido de sus datos muestra como la longitud de la fisis es mayor cuando el crecimiento es más rápido¹⁸. Seinsheimer y Sledge en conejos de Nueva Zelanda, encontraron cómo el grosor de la fisis es un índice fiable del ritmo de crecimiento de ésta. Así un cartílago de crecimiento que crece a un ritmo de 500 μm al día tiene un grosor un 43% mayor que un cartílago de crecimiento que crece a un ritmo de 250 μm al día¹⁹. Hansson utilizando los mismos animales, para un ritmo de crecimiento de 561 μm al día a los 30 días de edad, tenía un grosor de la fisis de 753 μm ; cuando el ritmo de crecimiento era menor, de 362 μm al día, a los 70 días de edad, la longitud de la fisis también disminuía pues era de 591 μm ²⁰. Se puede concluir que el grosor de la fisis puede ser utilizado como indicador del ritmo de crecimiento de la fisis.

Por ello realizamos estudios de morfometría para analizar si existía una mayor proliferación celular en el cartílago de crecimiento de las tibias control respecto a las tibias pro-

blema. La mayor parte de los autores que han utilizado técnicas de estimulación del crecimiento óseo, para observar los cambios en el cartílago de crecimiento han utilizado técnicas de cálculo del grosor total de la fisis^{14,21-23}. La metodología utilizada precisa la definición de varios puntos muy importantes: la definición de las zonas, el número de mediciones realizado y la técnica de medición de las zonas.

Los resultados obtenidos fueron que el grosor total de la fisis así como el de la zona proliferativa y el de la zona hipertrófica eran iguales en la tibia control y en la tibia desperiostizada circunferencialmente, no existiendo diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados no sugieren que exista un mayor ritmo de crecimiento de la fisis del hueso que ha sido desperiostizado.

Algunos autores sugieren, sin embargo, que la medición del grosor de la fisis y sus capas es un parámetro estático y, por tanto, si existe un aumento en la producción de condrocitos por parte del cartílago de crecimiento también existe una mayor calcificación de éstos, por lo que el grosor total es igual²³. Es decir, existe un aumento en la osificación endocranal, sin que existan alteraciones en el grosor de la fisis, ni de sus zonas. Esto explica los resultados de autores como Wilson-McDonald, Houghton y Bradley et al, Hernández, Serrano, Mariñoso et al y Houghton y Deckel, que no encuentran diferencias significativas en el grosor de la fisis, entre los huesos de más longitud respecto de los huesos con menos longitud, y los que se presentan en este trabajo^{12,21,23}.

Las técnicas morfométricas son una medición indirecta de la proliferación celular del cartílago de crecimiento. Los resultados negativos obtenidos puede que no reflejaron con exactitud la actividad celular de la fisis; por ello se empleó una técnica directa de medición de la proliferación celular: la citometría de flujo. Esta técnica se basa en los cambios que ocurren durante el ciclo celular. Con la citometría de flujo es posible conocer el porcentaje de células que se encuentran en fase S, fase en la cual se sintetiza el nuevo ADN celular.

Las técnicas de proliferación celular, y por tanto la citometría de flujo, no habían sido empleadas para evaluar si la desperiostización produce un estímulo para la actividad del cartílago de crecimiento. Además la citometría de flujo tampoco se había utilizado para medir la actividad celular de la fisis. En cambio las técnicas de 5-bromo-2'-deoxiuridina sí se habían empleado para la medición de la actividad celular de la fisis tras la distracción²².

Se utilizó una nueva serie de conejos para el estudio de la citometría de flujo, la serie V, compuesta por conejos sacrificados durante las dos primeras semanas tras la desperiostización. En los apartados anteriores se expuso como el aumento de tamaño de las tibias desperiostizadas respecto de aquellas que no lo fueron ocurre durante las dos primeras semanas. Por ello se decidió medir la proliferación celular de la fisis, empleando la citometría de flujo, durante estas 2 primeras semanas de la cirugía después de la desperiostiza-

ción.

Los datos obtenidos muestran que los cartílagos de crecimiento de las tibias desperiostizadas no tienen un mayor porcentaje de células en fase S, y por tanto no permiten afirmar que las tibias problema tengan una mayor actividad proliferativa. Los resultados obtenidos tienen unos criterios de validación suficientes, pues el número de eventos, el porcentaje de artefactos y la bondad de ajuste tienen unos valores adecuados, por lo que se evidencia que la técnica de citometría de flujo es válida para el estudio de la proliferación celular del cartílago de crecimiento.

No se ha demostrado que la desperiostización sea un estímulo para una mayor actividad celular en el cartílago de crecimiento, pese a que en este trabajo las tibias desperiostizadas tienen una mayor longitud, peso y volumen que las no desperiostizadas. Las técnicas de 5-bromo-2'-deoxiuridina empleadas para la medición de la actividad celular de la fisis tras la distracción, tampoco mostraron que ésta constituía un estímulo para el cartílago de crecimiento²².

Los resultados obtenidos, un mayor crecimiento óseo sin una mayor proliferación celular en la fisis, pueden deberse a que el aumento en la osificación endocranal se deba a otros factores, además de la proliferación celular en el cartílago de crecimiento, aunque los datos obtenidos a partir de la citometría de flujo inviten a continuar esta línea de investigación.

Agradecimientos: A todo el personal del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Militar Gómez Ulla, en cuyas instalaciones se realizó casi todo el trabajo experimental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lacroix P. The organisation of bones. London: Churchill, 1951.
2. Iannotti JP. Growth plate physiology and pathology. *Orthop Clin. North Am* 1990;21:1-17.
3. Brighton CT. Longitudinal bone growth. The growth plate and its dysfunctions. En: American Academy of Orthopaedic Surgeons, ed. *Instructional Course Lectures XXXVI*. St Louis: CV Mosby 1987:3-17.
4. Burch WM, Corda G. Calcitonin stimulates maturation of mammalian growth plate cartilage. *Endocrinology* 1985;116:1724-8.
5. Austin LA, Heath H III. Calcitonin: Physiology and pathophysiology. *N Eng J Med* 1981;304:269-78.
6. Stokes IAF, Spence H, Aronsson DD, Kilmer N. Mechanical modulation of vertebral body growth. *Spine* 1996;21:1162-7.
7. Frost HM. Biomechanical control of knee alignment. *Clin Orthop* 1997;335:335-42.
8. Gray ML, Pinzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC. Mechanical and physicochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res* 1988;6:777-92.
9. Gray ML, Pizzanelli AM, Lee RC, Grodzinsky AJ, Swann DA. Kinetics of the chondrocyte biosynthetic response to compressive load and release. *Biochimica et Biophysica Acta* 1989;991:415-25.

10. Crilly RG. Longitudinal overgrowth of chicken radius. *J Anat* 1972;112:11-8.
11. Houghton GR. The role of the periosteum in the growth of long bones. *J Bone Joint Surg* 1979;61B:218-20.
12. Houghton GR, Dekel S. The periosteal control of long bone growth. *Acta Orthop Scand* 1979;50:635-7.
13. Warrel E, Taylor, JF. The role of periosteal tension in the growth of long bones. *J Anat* 1979;128:179-84.
14. Carvell JE. The relationship of the periosteum to angular deformities of long bones. *Clin Orthop* 1983;173:262-74.
15. Lynch MC, Taylor JF. Periosteal division and longitudinal growth in the tibia of the rat. *J Bone Joint Surg* 1987;69B: 812-6.
16. Harkness EM, Trotter WD. Growth of transplants of rat humerus following circumferential division of the periosteum. *J Anat* 1978;126:275-89.
17. Dimitriou CG, Kapetanios GA, Symeonides PP. The effect of partial division on growth of the long bones. *Clin Orthop* 1988;236:265-9.
18. Kemper, NF. Comparative patterns of cell division in epiphyseal cartilage plates in the rat. *J Anat* 1972;111:137-42.
19. Seinsheimer F, Sledge CB. Parameters of longitudinal growth rate in rabbit epiphyseal growth plates. *J Bone Joint Surg* 1981;63A:627-31.
20. Hansson LI. Daily growth in length of diaphysis measured by oxytetracycline in rabbit normally and after medullary plugging. *Acta Orthop Scand, Supl* 1967;101:1-199.
21. Wilson-McDonald J, Houghton GR, Bradley J, Morscher E. The relationship between periosteal division and compression or distraction of the growth plate. *J. Bone Joint Surg* 1990; 72B:303-8.
22. Apte SS. Physeal distraction and cell proliferation in the growth plate. *J Bone Joint Surg* 1994;76B:837-43.
23. Hernández JA, Serrano S, Mariñoso ML, Aubia J, Lloreta J, Marrugat J, et al. Bone growth and modeling induced by periosteal stripping in the rat. *Clin Orthop* 1995;320: 211-9.