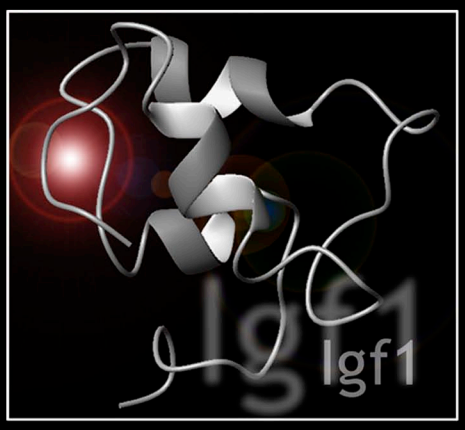
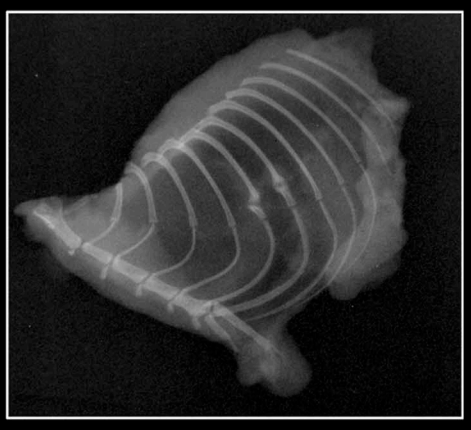
Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas

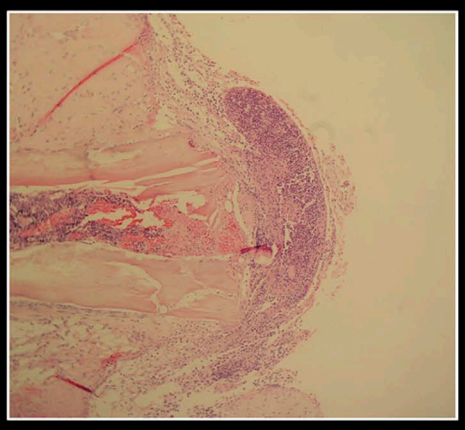
Tesis Doctoral

Ainara Arin Martínez

Valoración de los efectos terapéuticos y mecanismos de acción *in vivo* de los ultrasonidos pulsátiles sobre la consolidación de las fracturas costales.







UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

Las Palmas de Gran Canaria. 2009

Financiación

Los proyectos de investigación que han permitido la realización de esta tesis doctoral han sido financiados por el ***Colegio Oficial de Médicos de Las Palmas (COMLP)***:

Proyecto de investigación: *"Valoración del efecto de los ultrasonidos pulsátiles sobre la consolidación de las fracturas costales"*

Investigador principal: Dr. Norberto Santana Rodríguez

Año de concesión: 2005

Proyecto de investigación: *"Efectos del tratamiento con ultrasonidos pulsátiles, hormona de crecimiento y terapia celular sobre la consolidación de las fracturas costales. Estudio de los mecanismos genómicos subyacentes". Proyecto distinguido con la* ***Beca de Excelencia "Dr. Santiago González-Jaraba"***

Investigador principal: Dr. Norberto Santana Rodríguez

Año de concesión: 2007

Además, la presente tesis doctoral ha recibido financiación para su presentación, a través de la convocatoria de "Ayudas para la realización de tesis doctorales" de la ***Fundación Canaria de Investigación y Salud (FUNCIS)*** del año 2008, que ha sido otorgada a la doctoranda.

A mis padres, Julio y María Luisa
A mis hermanas, Yolanda y Myriam
A mi familia y amigos; a Laura y Alberto
Al Dr. Jose Carlos Rodríguez, a Arantza y Juan
Al Dr. Jose Luis Martín, al Dr. Santana y a la Dra. Fiuza

Agradecimientos

A mi hermana Yolanda, porque el sentido de mi vida y mi futuro profesional lo impulsa ella. Por hacer que todo a su lado sea grande. Porque su alegría, ingenuidad, asombro, nuevo conocimiento y felicidad que me transmite, lo hace de una forma tan pura que nadie más consigue en este mundo. Por esperar, que entienda que no estoy a su lado todo lo que me gustaría, debido a continuar haciendo la "o" en el colegio hoy en día y estar por ello en la distancia separadas y siempre inmersa en el trabajo por el que me entrego y desvivo. Por darme todo incondicionalmente y hacerme sentir los valores más importantes y humanos que han formado a la persona que hoy soy, para que con este trabajo termine esta etapa y comience la siguiente llena de ilusiones y nuevos retos. Por esperar que el buen trabajo contribuya a mejorar el futuro y podamos intervenir de una forma directa en quienes lo necesitan tanto. Para ti de tu "Yaya".

A mis padres, Julio y María Luisa. Por estar siempre conmigo y seguirme en todo lo que emprendo y allí donde vaya. Por haberme permitido llegar hasta aquí transmitiéndome toda su fuerza y respetando siempre mis decisiones. Por tenerme siempre presente en todo y contar conmigo para todo aún en la distancia. Por su incondicional amor de vuestro "gorrión".

A mi hermana Myriam y mi cuñado Jose, porque su tesón en hacerme saber que tenía que terminar esto y recordarme todo lo que lo he deseado en los momentos más difíciles, es lo que ha contribuido a conseguirlo. Por apoyarme en los comienzos, en las paradas, en su continuidad y contribuir así a conseguir mis metas gracias a las continúas consultas telefónicas. Por vivir con tanta alegría y así transmitirlo. A vosotros de "la canija".

A mi amiga Laura. Por demostrarme una pura amistad y un continuo apoyo. Por su positivismo, por escucharme, orientarme, por estar siempre a mi lado. Por sacar de mí todo lo amiga que puedo llegar a ser. Por seguir disfrutando juntas los buenos y malos momentos que este trabajo me ha ocasionado. Por poder celebrar juntas este año su boda y mi tesis. A su futuro marido Oscar. A Marta y Yeray, por estar siempre apoyándome en lo bueno y en lo malo. Por todo lo vivido y lo que nos queda.

A mis amigos. A Fon, Javi, Vila y Luis. Porque con vosotros he comenzado esto y con vosotros lo finalizo. Por ser una familia en Canarias. Por aguantarme durante todos los días. Por compartir juntos tantas cosas. Por esperar a que esto terminara algún día y haber hecho tan fácil el vivirlo a vuestro lado. A la "mano de obra" de Vila en muchas cuestiones de la tesis. A todos los amigos que han formado parte de mi vida aquí en Las Palmas y que ansían que llegue este momento. Al equipo *Atis Tirma*: Angel, Salo, Patri, Nieves, Uwe, Arcadio, Pablo…

A Alberto. Quién en este camino ha terminado a mi lado, por arreglar "mis olas" y por hacerme sentir tan feliz y poder así con todo. A Iñaki, Lauri, Sara, Sandra, Rubén, Miriam…a todos mis compañeros de León. Por continuar apoyándome ahora en este

proyecto. Por seguir siendo mis amigos y por esperar entusiasmados que lo consiga, contentos de saber que he llegado hasta aquí.

A la Kutxi de Bilbao: Susana, Joana, Katrin, Moni, Isa, Nuri, Elena….por esperar con paciencia a que esto terminara y por ansiar el poder pasar más tiempo a partir de ahora con vosotras. A mis amigas de Barrika, Silvia y Eva, que desde los 3 años continúan a mi lado y hoy día tan orgullosa me hacen sentir del logro obtenido.

A toda mi familia. A mis primas que esperan este final: Esther, Estibaliz y Sonia por todos nuestros felices reencuentros y toda mi familia que me apoya. A mis abuelos, que ya no están pero que me gustaría me vean desde alguna ventanita el día de la defensa; y en especial a la abuela Celsa, porque todavía la tengo tan cerca y aquí conmigo hoy presente.

Al Dr. José Manuel García Castellano, quién me introdujo en el maravilloso mundo de la Investigación, quién permitió que diera mis primeros pasitos y me aportó su materia y conocimientos en traumatología y cáncer.

A mi Director el Dr. Rodríguez, por ser el final de este camino. Porque desde que empecé en ésta profesión su presencia siempre me ha transmitido ánimo y seguridad. Por enseñarme a trabajar con esfuerzo contando siempre con su inmejorable crítica y recompensa. Por ser mí ejemplo a seguir. Por darme su confianza y convicción para saber que podía llegar hasta aquí. Por apostar por mí.

A mis Directores Norberto y José Luis. Por dejarme formar parte de su equipo, por todo lo que he aprendido de ellos y todo lo bien que lo hemos pasado trabajando juntos, por todo lo compartido. A sus familias; por todas las noches en casa de José y Elena con sus hijos: Miguel y Víctor, porque pueda llegar a recompensarles la "factura" de tantas cenas a cargo de la tesis. A Rula, por su orientación, su trabajo en la estadística y todo lo que junto a ella he aprendido. Al Dr. Leandro Pérez por toda su orientación para el estudio génico. A la Dra. Travieso por su ayuda en el estudio radiológico y al Dr. Rivera por su aportación en toda la histología.

A mi "amatxu Canaria": Arantza. A Julio y mi hermano Mikel, por dejarme formar parte de vuestra familia y hacerme sentir como uno más en la mesa. Sus grandes consejos y sabiduría ante la vida hacen que ésta sea más llevadera, más fácil y muchísimo más feliz. Por toda la "psicología" tan acertada desplegada por ellos en los momentos difíciles, un apoyo sin duda insuperable y de incalculable valor.

A Juan Verona, mi "aita Canario" y a su familia Ana y Alvaro, por haber participado activamente tanto en lo personal desde mi llegada al Hospital, como en la elaboración de este trabajo con toda su especialidad. Por ser un gran profesional y encantarme trabajar a su lado para resolver hasta lo más complicado y además permitirme disfrutar de su título de padrazo.

Al Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. A mis compañeros de la Unidad de Investigación y la Unidad de Ilustración. A todos ellos que han formado parte y con los que he aprendido en lo profesional y personal. Unos estuvieron y hoy ya no están; otros se van incorporando. Gracias a aquellos con los que voy compartiendo más cada día: Xiomara, María José, Heriberto, Inma, Florencio, Susa, Ramoni, Octavio, Raquel, Rubén, Nuria, Macame, Raúl, Cesar, Alejandro, Ayoze, Elisa, Osmel, Cristiano, Ricardo, Pedro, Miguel Ángel, Yanira, Jose Manuel, Patricia, Ardiel, Yolanda, Clara, Fran, Yaridé, Erika, Lidia, Nisa, Esther, Bernardino, Alfredo, Araceli, Miguel Ángel, Yeray, Marisol, Sandra, Milena, Rosa, Ángela, Charline, Ramón, Inma…

A mis Directores y compañeros de la Facultad de Veterinaria de Utrecht. Holanda.

A todo aquel, que apoyo y me apoya
Que conozco y me conoce
Que recuerdo y me recuerda
Que echo de menos y me echa de menos
Que disfruta conmigo y disfruto con el/ella.

A los organismos y ciudades que me han visto crecer y me han formado; mi trabajo y formación en Bilbao, la Facultad de Veterinaria de León. A la beca SICUE-SENECA por traerme hasta Las Palmas y comenzar desde aquí mi carrera investigadora. A la beca de FUNCIS por permitirme este lujo de investigar como trabajo y por vocación. A la beca ERASMUS por ser mi estancia y mis comienzos en Investigación en Holanda.

Y por supuesto a todas mis ratitas, que se han dejado la vida en este proyecto.

A todos ellos, gracias.

Índices

Índice de tablas……**I**

Índice de figuras……..**II**

Abreviaturas……..**IV**

Introducción……1

1.- Estructura y función del tejido óseo: Biología del hueso……1
1.1.- El nivel celular……..1
1.2.- El nivel tisular……..3

2.- Remodelado óseo……..4

3.- Regulación de la función ósea……5
3.1.- Factores de actuación sistémica……6
3.2.- Factores de actuación local……6

4.- Reparación tisular……8
4.1.- Biología de la reparación……8
4.1.1.- Fase inflamatoria……8
4.1.2.- Fase proliferativa y reparadora……10
4.1.3.- Fase de diferenciación y remodelación……11
4.2.- Factores de crecimiento……12
4.2.1.- Definición……12
4.2.2.- Síntesis……12
4.2.3.- Mecanismo de acción……13
4.2.4.- Funciones……15
4.2.5.- Clasificación y tipos……16
4.2.6.- Factores de crecimiento y reparación tisular……16
4.2.6.1.- Factor de crecimiento insulínico 1: IGF-I……17
4.2.6.2.- Factor de crecimiento transformante beta: TGF-β……18
4.2.6.3.- Proteínas morfogenéticas óseas: BMP……20
4.2.6.4.- Factor de crecimiento vascular endotelial: VEGF……21
4.3.- Otras proteínas relacionadas con la reparación tisular……22
4.3.1.- Colágeno……22
4.3.2.- Metaloproteasas de matriz: MMP……23
4.3.3.- Proteínas supresoras de la señalización de citoquinas:
Suppresor of cytokine signalling, SOCS……25
4.3.4.- Proteína quimiotáctica de monocitos 1: MCP-1……26

5.- Pared torácica……27
5.1.- Anatomía y función. ……27
5.1.1.- Partes blandas superficiales……28
5.1.2.- Esqueleto y partes blandas inherentes……29

5.1.2.1.- Esternón…….. 29
5.1.2.2.- Costillas……...……29
5.1.2.3.- Espacios intercostales……..... 30
5.1.2.4.- Fascia endotorácica…….....31
5.1.2.5.- Vasos intercostales……..31
5.1.2.6.- Nervios intercostales……...31
5.2.- Traumatismos torácicos……...…...……..... 31
5.2.1.- Etiopatogenia…….....32
5.2.2.- Clasificación……...32
5.2.2.1.- Traumatismo torácico cerrado…… 32
5.2.2.2.- Traumatismo torácico penetrante……....33
5.2.3.- Epidemiología…….33
5.2.4.- Clínica y diagnóstico…….. 33
5.2.4.1.- Evaluación inicial y exploración física……..……..35
5.2.4.2.- Procedimientos diagnósticos……...35
5.2.4.2.1.- Pruebas de imagen……...…36
5.2.4.2.2.- Broncoscopia……...36
5.2.4.3.- Manifestaciones clínicas y diagnóstico…….....38
5.2.4.3.1.- Traumatismos de pared torácica……..38
5.2.4.3.1.1.- Fractura costales.……38
5.2.4.3.1.2.- Tórax inestable…… 39
5.2.4.3.1.3.- Fractura de esternón…… 39
5.2.4.3.2.- Lesiones pleuropulmonares…….....40
5.2.4.3.2.1.- Contusión pulmonar…… 40
5.2.4.3.2.2.- Neumotórax traumático……...40
5.2.4.3.2.3.- Hemotórax traumático……40
5.2.4.3.2.4.- Traumatismos de tráquea y bronquios…… 41
5.2.4.3.2.5.- Traumatismos de corazón y grandes vasos…… 41
5.2.4.3.2.6.- Traumatismos del diafragma…….....42
5.2.4.3.2.7.- Traumatismos del esófago……...42
5.2.5.- Tratamiento…….43
5.2.5.1.- Atención prehospitalaria……45
5.2.5.2.- Atención hospitalaria……..45
5.2.5.2.1.- Evaluación inicial……46
5.2.5.2.2.- Exámenes complementarios……46
5.2.5.2.3.- Tratamiento de las lesiones…….....46
5.2.5.2.3.1.- Pared torácica…….....46
5.2.5.2.3.2.- Contusión pulmonar……...…… 47
5.2.5.2.3.3.- Neumotórax……47
5.2.5.2.3.4.- Hemotórax…….....48
5.2.5.2.3.5.- Lesiones de tráquea y bronquios…… 48
5.2.5.2.3.6.- Lesiones del corazón y grandes vasos…...……..48
5.2.5.2.3.7.- Rotura del diafragma…….....49
5.2.5.2.3.8.- Lesiones esofágicas…….…… 49
5.2.6.- Pronóstico……...…… 49
5.2.7.- Complicaciones……..... 49

6.- Ultrasonidos. ……..50
6.1.- Concepto e historia……..…….....51
6.1.1.- Concepto……51
6.1.2.- Historia……... 52

6.2.- Efectos biofísicos de los ultrasonidos……... 52
6.2.1.- Efecto mecánico…… 53
6.2.2.- Efecto térmico……..... 54
6.2.3.- Efecto biológico……..55
6.3.- Características de los ultrasonidos…..…… 57
6.3.1.- Ultrasonidos con impulsos modulados……...57
6.3.2.- Parámetros de los ultrasonidos pulsátiles.……...57
6.4.- Efectos de los ultrasonidos en las fracturas……..59
6.5.- Mecanismo de acción…… 61

7.- Aplicación de la Biología Molecular a nuestro estudio.
Reacción en cadena de la polimerasa……...…….....62
7.1.- Introducción……... 62
7.2.- PCR cuantitativa en tiempo real……..... 63

Justificación traslacional……...**64**

Objetivos…….. **65**

Material y método..……..... **66**

1.- Animales y hábitat……..66

2.- Grupos de estudio……...67
2.1.- Estudio radiológico e histológico……....67
2.2.- Estudio de expresión génica……68

3.- Modelo experimental…….……...…….…68

4.- Evolución clínica en el periodo postoperatorio…….…… 73

5.- Aplicación de ultrasonidos…..……...…… 73

6.- Estudio radiológico e histológico……...……...…….... 74
6.1.- Estudio radiológico……..……... 75
6.2.- Estudio histológico…….....76

7.- Estudio de expresión génica. …… 78
7.1.- Extracción de RNA y síntesis de cDNA……78
7.2.- Determinación de la expresión génica mediante qRT-PCR en tiempo real……..……...…..... 80

8.- Análisis estadístico…….…. 82

Resultados……………………………………………………………………..**83**

1.- Estudio radiológico……………………………………………………………83
1.1- Efecto del tratamiento con USP…………………………….……………83
1.2.- Efecto de las diferentes dosis de tratamiento……………………...............85
1.3.- Efecto del tiempo sobre la consolidación radiológica……………………… 85

2.- Estudio histológico…………………………….……………………..............87
2.1.- Influencia del tratamiento con USP…………………………………………87
2.2.- Influencia de las diferentes dosis de tratamiento………………………….. 89
2.3.- Influencia del tiempo……………………………………...………….. 89

3.- Estudio de la expresión génica………………………………….………. 92
3.1.- Influencia del tratamiento con USP………………………..…………… 92
3.1.1- Igf1………..………….……………………………………………….. 93
3.1.2-Tgfb1………………………………………………………………….. 93
3.1.3- BMP2………..………….…………………………………….………. 94
3.1.4- Vegfa………..……………………………………………...……… 94
3.1.5- Col2a1 ……….……………………..…………………………… 95
3.1.6- Mmp3……………………………………………………………....... 95
3.1.7- Socs2………..………….……………………..……………………. 96
3.1.8- Socs3……………………..……………………..……............. 96
3.1.9- MCP-1………..…..………………………………...…….……… 97
3.2.- Influencia de las dosis de tratamiento con USP……….…..…………… 98
3.2.1- Igf1………..………….……………………………………………….. 99
3.2.2-Tgfb1………………………………………………………………….. 99
3.2.3- BMP2………..………….………………………………………......... 100
3.2.4- Vegfa………..……………………………………………...…......... 100
3.2.5- Col2a1 ……….……………………..…………………………… 101
3.2.6- Mmp3………….…………………………………………………........... 101
3.2.7- Socs2………..………….……………………..……………………. 102
3.2.8- Socs3……………………..……………………..…………….. 103
3.2.9- MCP-1………..…..………………………………...……..…... 103

Discusión……………………….…………………………………………… **104**

Conclusiones………………….…………………………………………….. **114**

Conclusions…………………….……………………..…………………….. **116**

Bibliografía…………………….………………………………………….. **118**

Índice de tablas

Tabla I. Familias de factores de crecimiento……....16
Tabla II. Traumatismos torácicos cerrados……....33
Tabla III. Fases de evaluación del traumatismo……..45
Tabla IV. Genes, secuencias de los *primers* y condiciones de la qRT-PCR en tiempo real…… 81
Tabla V. Efecto del tratamiento en 3 categorías radiológicas……... 83
Tabla VI. Efecto del tratamiento en 2 categorías radiológicas……... 84
Tabla VII. Efecto de las dosis de tratamiento……...85
Tabla VIII. Efecto del tiempo agrupado y del tratamiento……86
Tabla IX. Influencia del tratamiento en 3 categorías histológicas……..87
Tabla X. Influencia del tratamiento en 2 categorías histológicas……..88
Tabla XI. Efecto de las dosis de tratamiento……..... 89
Tabla XII. Influencia del tiempo y del tratamiento……..…90
Tabla XIII. Expresión génica del callo óseo…….…..... 92
Tabla XIV. Expresión génica del callo óseo según las diferentes dosis de tratamiento……..…98

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía del espacio intercostal……..……30
Figura 2. Fracturas costales izquierdas con neumotórax y enfisema subcutáneo……..….. 37
Figura 3. Fisiopatología respiratoria en traumatismos torácicos…….... 43
Figura 4. Fármacos utilizados…… 69
Figura 5. Intubación orotraqueal…… 69
Figura 6. Posición del animal…….70
Figura 7. Ventilador SERVO 900…….. 70
Figura 8. Toracotomía posterolateral izquierda…… 71
Figura 9. Realización de segunda incisión…… 71
Figura 10. Ventana en pared torácica……...72
Figura 11. Colocación del drenaje pleural……....72
Figura 12. Empleo del tubo de drenaje para lograr la presión negativa de la cavidad torácica……..73
Figura 13. Aplicación de USP…… 74
Figura 14. Toma radiográfica……...76
Figura 15. Procesado para estudio histológico…….....77
Figura 16. Microscopio óptico Olympus BX50……...77
Figura 17. Homogeneizador…….....78
Figura 18. Espectrofotómetro Beckman DU 640…….....79
Figura 19. Termociclador…….....79
Figura 20. Termociclador de capilares LightCycler® 1.5…… 80
Figura 21. Imágenes de las 3 categorías radiológicas……...……...84
Figura 22. Efecto del tiempo en la formación del callo óseo……...85
Figura 23. Efecto de los tiempos de tratamiento en la formación del callo radiológico…….. 86
Figura 24. Animales que presentan callo radiológico según el tiempo y la dosis aplicada……..…….... 87
Figura 25. Imágenes de las 3 categorías histológicas…….. 88
Figura 26. Influencia del tiempo en la formación del callo óseo…….....89
Figura 27. Influencia de los tiempos de tratamiento en la formación del callo óseo…….....90
Figura 28. Animales que presentan callo histológico según el tiempo y la dosis aplicada……...91

Figura 29. Expresión de Igf1 control *versus* USP……....93
Figura 30. Expresión de Tgfb1 control *versus* USP……... 93
Figura 31. Expresión de BMP2 control *versus* USP…….. 94
Figura 32. Expresión de Vegfa control *versus* USP……... 94
Figura 33. Expresión de Col2a1 control *versus* USP…… 95
Figura 34. Expresión de Mmp3 control *versus* USP…….. 95
Figura 35. Expresión de Socs2 control *versus* USP……... 96
Figura 36. Expresión de Socs3 control *versus* USP……... 96
Figura 37. Expresión de MCP-1 control *versus* USP…… 97
Figura 38. Expresión de Igf1 control *versus* dosis de USP……**....** 99
Figura 39. Expresión de Tgfb1 control *versus* dosis de USP…… 99
Figura 40. Expresión de BMP2 control *versus* dosis de USP……100
Figura 41. Expresión de Vegfa control *versus* dosis de USP……100
Figura 42. Expresión de Col2a1 control *versus* dosis de USP……**...**101
Figura 43. Expresión de Mmp3 control *versus* dosis de USP……101
Figura 44. Expresión de Socs2 control *versus* dosis de USP……102
Figura 45. Expresión de Socs3 control *versus* dosis de USP……103
Figura 46. Expresión de MCP-1 control *versus* dosis de USP……...103

Resumen

Las fracturas costales son una patología frecuente en la práctica clínica con una importante morbi-mortalidad asociadas. En la actualidad no existe un tratamiento eficaz que pueda cambiar el curso evolutivo de las mismas y la incapacidad funcional que producen durante varios meses supone un importante coste hospitalario, farmacéutico, laboral y social.

En este trabajo hemos valorado el efecto *in vivo* de los ultrasonidos pulsátiles (USP) sobre la consolidación de las fracturas costales en un modelo experimental de ratas. Se ha valorado la dosis y tiempo óptimos de aplicación necesarios para acelerar la consolidación de las mismas mediante estudio histológico y radiológico y se ha pretendido profundizar en su mecanismo de acción valorando la expresión de algunos genes proliferativos y antiinflamatorios potencialmente relacionados con los mecanismos moleculares de la osteogénesis. Para ello se han utilizado 136 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, 88 ratas para el estudio radiológico e histológico y 48 ratas para el estudio de expresión génica. Los animales han sido distribuidos en 4 grupos: un control y otros tres que han recibido diferentes dosis de USP a 3MHz y 0,5 W/cm^2 de intensidad: a) 10% de pulso (50 mW/cm^2 I_{SATA}), b) 20% pulso (100 mW/cm^2 $I_{SATA)}$ y c) 50% pulso (250 mW/cm^2 I_{SATA}), durante 3 minutos diarios comenzando tras las primeras 24h de la cirugía hasta el momento del sacrificio que se realizó a los 2, 10, 20 y 28 días para el estudio radiológico e histológico y 10 y 28 días para el estudio génico.

Hemos observado que los USP aceleran la consolidación de las fracturas costales hasta 5 veces más que la evolución natural de las mismas. Las dosis más eficaces han sido 50 y 100 mW/cm^2 I_{SATA} con un *odds ratio* (OR) de consolidación de 7,7 (1,99-29,79 IC95%) y 6,16 (1,71-22,15 IC95%), respectivamente frente a los controles. El mayor efecto se ha obtenido por encima de los 10 días de tratamiento con un OR de consolidación de 5,11 (1,23-21,17 IC95%). Las dosis de 100 y 250 mW/cm^2 han incrementado significativamente la expresión de Igf1, Socs2, Socs3, Vegf y disminuido la de MCP1 y Col2a1, lo que no se ha observado con la dosis de 50 mW/cm^2. Ello hace suponer que a medida que se aumenta el pulso y por tanto la I_{SATA}, disminuye su eficacia sobre la consolidación de las fracturas costales debido a la generación de lesión tisular inflamatoria asociada que induce la expresión compensatoria de genes proliferativos y antiinflamatorios. Todo ello hace pensar que el mecanismo de acción es complejo y que son necesarios más estudios *in vivo* que profundicen en el conocimiento de las rutas metabólicas implicadas en la reparación de este tipo de fracturas inducidas por los USP.

Esta es la primera vez que se describe el efecto beneficioso de los USP sobre la consolidación y evolución de las fracturas costales y la primera vez que se demuestra *in vivo* que sus efectos no son sólo mecánicos sino que inducen cambios biológicos cuantificables en la expresión génica. Desde un punto de vista traslacional, su eficacia, facilidad de aplicación y bajo coste hacen que se plantee su uso como alternativa terapéutica en los pacientes con fracturas costales lo que podría reducir de este modo el coste personal, sanitario, laboral y social de las mismas.

Summary

Rib fractures are a common pathology in the dairy clinic with an important morby-mortality associated. Actually, there is not an efficacy treatment, which can change their evolution, and the functional inability that they produce during several months becomes an important hospital, pharmaceutical, working and social cost.

In this work, we have evaluated the *in vivo* effect of pulsated ultrasound (PUS) on the consolidation of rib fractures in an experimental rat model. It has evaluated the optimum dose and time of application necessary to accelerate their consolidation by histological and radiological study and it has expected to know their action mechanism by the expression of some proliferative and anti-inflammatories genes potentially related with the osteogenesis molecular mechanism. It has been used 136 Sprague-Dawley male rats, 88 rats in the histological and radiological study and 48 rats in the gene expression study. Animals have been distributed in 4 groups: one control and other three which have been received different doses of PUS 3MHz, 0,5 W/cm^2 of intensity: a) 10% of pulsed (50 mW/cm^2 I_{SATA}), b) 20% of pulsed (100 mW/cm^2 $I_{SATA)}$ and c) 50% of pulsed (250 mW/cm^2 I_{SATA}), during 3 minutes at diary starting after the first 24 hours until the sacrifice at 2, 10, 20 and 28 days in the histological and radiological study; and 10 and 28 days in the gene expression study.

We have observed that PUS accelerates the consolidation of fractured ribs until 5 times over their natural evolution. The best doses have been 50 and 100 mW/cm^2 I_{SATA} with *odds ratio* (OR) of 7,7 (1,99-29,79 IC95%) and 6,16 (1,71-22,15 IC95%), *versus* controls respectively. The best effect has been obtained over 10 days of treatment with OR of 5,11 (1,23-21,17 IC95%). The 100 and 250 mW/cm^2 doses have increased significantly the expression of Igf1, Socs2, Socs3 and Vegf and have decreased the expression of MCP1 and Col2a1, which have not been observed with the 50 mW/cm^2 dose. It has been supposed that when the pulse is increased and so the I_{SATA}, the efficacy is decreased on the consolidation of rib fractures due to the generation of tissue inflammatory disease associate which induces the compensatory expression of proliferative and anti-inflammatories genes. For all theses reasons it seems the mechanism of action in complex and further *in vivo* investigations are needed to define the pathways of the implicated genes in the reparation of this kind of fractures treated by PUS.

This is the first time in which the beneficial effect of the PUS on the rib fractures consolidation and evolution is described; and the first time in which it has demonstrated *in vivo* that not only are the effects mechanics but also they induce biological quantifiable changes in the gene expression. Translational overview, their efficacy, application easily and low cost are the reasons to use them like an alternative therapeutic in those patients with rib fractures so it could decrease their individual cost, sanitary, labored and social.

A: absorbancia
ADN: ácido Desoxirribonucleico
AINEs: antiinflamatorios no esteroideos
bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico
BMP: proteínas morfogenéticas óseas
BNR: coeficiente de no uniformidad del haz
BRU: unidades de remodelado óseo
BSU: unidad estructural ósea
CCL2: *chemokine (C-C motif) ligand 2*
Col2a1: colágeno tipo 2a1
Ct o CT: ciclo umbral
dATP: desoxiadenina trifosfato
dCTP: desoxicitosina trifosfato
dGTP: desoxiguanina trifosfato
dNTP: dinucleótidos trifosfato
dTTP: desoxitimina trifosfato
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EPO: eritropoyetina
ERA: área de radiación efectiva
FC: factores de crecimiento
FELASA: federación Europea de Asociaciones de Animales de Laboratorio
FGF: factor de crecimiento fibroblástico
Flt1: receptor del factor de permeabilidad vascular.
G-CSF: factor estimulante de colonias de tipo granulocítico
GDF: factores de crecimiento/diferenciación
GH: hormona de crecimiento
GM-CSF: factor estimulante de colonias de tipo granulocito-macrófago
HB-EGF: factor de crecimiento asociado a heparina similar al EGF
IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IGF-II: factores de crecimiento similares a la insulina tipo II
IL-1: interleuquina 1
IL-6: interleuquina 6
INF-gamma: interferón gamma
JAK: actividad de la quinasa Janus
JNK: quinasa c-jun N-terminal
KGF: factor de crecimiento de queratinocitos

LAP: péptido latente asociado
LIPUS: ultrasonidos pulsátiles de baja intensidad
LTBP: proteína asociada a TGF- β latente
MAPK: proteína quinasa activada por mitogénesis
MCP: proteína quimiotáctica de monocitos
M-CSF: factor estimulante de colonias de tipo macrófago
MDGF: factor de crecimiento derivado de los macrófagos
MDSC: células madre derivadas de músculo
MMP-1: metaloproteasa de matriz 1
MMP-3: metaloproteasa de matriz 3
ms: milisegundo
NK: células *Natural Killers*
NO: óxido Nítrico
Pb: pares de base
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (convencional)
PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDGF-2: factor de crecimiento derivado de las plaquetas 2
PDGF-β: factor de crecimiento derivado de las plaquetas β
PG: prostaglandina
PGE: prostaglandinas de la serie E
Polr2a: RNA polimerasa II subunidad a
PTH: hormona paratiroidea
qRT-PCR: PCR cuantitativa por transcriptasa inversa en tiempo real
s: segundos
S: Svedberg
SATA: promedio espacial, promedio temporal (*Spatial-Average, Temporal-Average*)
SATP: promedio de *peak* intensidad temporoespacial
SOCS: proteínas supresoras de la señalización de citoquinas
T_a: temperatura de anillado
TAC: tomografía axial computerizada
TGFRI: receptor del factor de crecimiento transformante I
TGFRII: receptor del factor de crecimiento transformante II
TGF-α: factor de crecimiento transformante alfa
TGF-β: factor de crecimiento transformante beta
TIMP: inhibidores tisulares de metaloproteasas de matriz
TNF α: factor de necrosis tumoral alfa
TNF β: factor de necrosis tumoral beta

TPO: trombopoetina

UCI: unidad de cuidados intensivos

US: ultrasonido

USP: ultrasonido pulsátil

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

Introducción

1.- Estructura y función del tejido óseo: biología del hueso

El hueso es un tejido metabólicamente activo que se diferencia de otros tejidos por su gran mineralización (Smith R., 1984). El tejido óseo desempeña funciones tanto biomecánicas como metabólicas. Dentro de las funciones biomecánicas, la dureza del hueso proporciona forma al cuerpo, protección a las vísceras, brinda un marco adecuado para la médula ósea y constituye la base física para la locomoción.

En sus funciones metabólicas, el contenido mineral del hueso colabora en la regulación de la composición del líquido extracelular, en especial, la de la concentración de calcio iónico. El papel esencial de mantener las concentraciones de iones calcio en el espacio extracelular tiene preferencia sobre el papel mecánico de sostén, muchas veces en detrimento de este último (Hahn Y. S. *et al*, 1987).

La remodelación del tejido esquelético se produce en el curso de la vida, y en condiciones normales favorece la reparación de las fracturas, la renovación de tejido envejecido y la readaptación de la arquitectura esquelética para dar respuesta óptima a la función y exigencias de la carga mecánica (Citivelli R. *et al*, 1990). Por ello, para comprender el desarrollo de este proceso es esencial el conocimiento de la fisiología y el metabolismo de las células óseas (Hedayati H. y Zuzga J. J. Jr., 1988; Gillespy T 3rd. y Gillespy MP., 1991).

1.1 El nivel celular

El metabolismo óseo se lleva a cabo por la acción de células propias del tejido óseo: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. La actividad metabólica se encamina hacia dos objetivos, el modelado óseo con la participación de los osteoblastos y el remodelado óseo gracias a la acción de osteoclastos y osteocitos.

Osteoblasto: es una célula derivada de células pluripotenciales mesenquimales de la médula ósea (Owen AH 3rd., 1985; Malaval L. *et al*, 1994), es una célula cuboide con características citoplasmáticas propias de una gran actividad de síntesis proteica. Las funciones de los osteoblastos, conocidas en la actualidad, son las siguientes (Mundy G. R., 1995):

- Son responsables de la producción de las proteínas de la matriz ósea, incluyendo colágeno tipo I y osteocalcina.

- Secretan factores de crecimiento que se almacenan en la matriz ósea, como el factor de crecimiento "transformante" beta (*Transforming Growth Factor-β*, TGF-β), las proteínas morfogenéticas óseas (*Bone Morphogenetics Proteins*, BMP), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (*Insulin Like Growth Factor*, IGF).

- Mineralizan la matriz ósea nueva por medio de las vesículas de la matriz, que son partículas subcelulares generadas a partir del citoplasma de los osteoblastos. Las vesículas de la matriz son ricas en fosfatasa alcalina.

- Producen otros constituyentes de la matriz ósea que pueden ser importantes en la mineralización, como los proteoglicanos y los fosfolípidos.

- Colaboran en la resorción ósea normal. Estudios experimentales sugieren que los osteoblastos y sus progenitores pueden actuar como células accesorias de la resorción osteoclástica, produciendo enzimas proteolíticas. Los osteoblastos poseen receptores para la hormona paratiroidea (*Parathyroid Hormone*, PTH), 1,25$(OH)_2$ colecalciferol (vitamina D3) y prostaglandinas (PG), siendo a través de ellos como actuarían estas hormonas y otros factores sistémicos. Los osteoblastos sintetizan diversos factores que pueden estimular la formación de los osteoclastos tales como interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6), factor estimulante de colonias de tipo granulocito-macrófago (*granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor*, GM-CSF) y prostaglandinas de la serie E (PGE). La actividad osteoblástica produce síntesis de fosfatasa alcalina.

Osteocito: es una célula derivada de los osteoblastos al quedar incorporados algunos en la matriz proteica sintetizada por ellos. Se encuentran en la superficie de las trabéculas óseas o en el interior de las lagunas del hueso mineralizado.

Los osteocitos se conectan entre sí mediante prolongaciones del citoplasma que atraviesan los canalículos de hueso. Se estimulan por la PTH y la calcitonina e intervienen en la regulación del calcio en los líquidos corporales.

Parece ser que los osteocitos podrían comportarse en ocasiones como osteoblastos sintetizando proteínas de la matriz para reparar microfracturas (Riancho J. A. *et al*, 1992; Manolagas S. C. y Jilka R. L., 1995).

Osteoclasto: es una célula grande y multinucleada con gran cantidad de mitocondrias y lisosomas. Actualmente se acepta que los osteoclastos derivan de la

célula madre pluripotencial hematopoyética. Su principal función es la resorción ósea, que se inicia con una fase de desmineralización seguida de una posterior degradación de la matriz ósea. Poseen fosfatasa ácida (isoenzima tartrato resistente), proteínas lisosomales del tipo de la catepsina B y anhidrasa carbónica productora de hidrogeniones. La activación de los osteoclastos produce una disminución del pH extracelular que solubiliza los cristales de hidroxiapatita y facilita la actuación de las enzimas lisosomales, fosfatasas y glicosidasas, que hidrolizan las fosfoproteínas y proteoglicanos, mientras la catepsina B destruye las fibras de colágeno. Se han identificado diversas citocinas que promueven la resorción ósea, como GM-CSF y factor estimulante de colonias de tipo macrofágico (*macrophage-colony-stimulating factor*, M-CSF), mientras que otras como IL-I, factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor α*, TNF α) y factor de necrosis tumoral beta (tumor necrosis factor β, TNF β) estimulan tanto la formación de osteoclastos como su actividad resortiva (Rodman M. J., 1993; Manolagas S. C. y Jilka R. L., 1995).

1.2 El nivel tisular

El esqueleto de un adulto está formado por dos tipos de tejido óseo, cuya estructura responde a una necesidad funcional determinada: hueso cortical o compacto y hueso trabecular o esponjoso. Aunque el hueso trabecular contribuye tan solo con un 20% a la masa ósea del esqueleto, tiene una mayor superficie que el hueso cortical y es metabólicamente más activo. Por ello, la pérdida de masa ósea más rápida y más intensa a lo largo de la vida se da en el hueso trabecular (Cummings S. R., 1985; Kanis J. A., 1991). A efectos prácticos, es pues interesante considerar la disposición esquelética de ambos tejidos.

El hueso cortical, con función de soporte estructural, predomina en la superficie externa de los huesos pero sobre todo en la diáfisis de los huesos largos del esqueleto apendicular, tal como el cuello del fémur o las costillas. La estructura del hueso cortical está formada por capas concéntricas de laminillas óseas, que rodean el conducto de Havers central, a través del cual se suministra el aporte sanguíneo y nervioso. Cada laminilla cilíndrica está cubierta por una población dispersa de osteocitos regularmente dispuestos. Se comunican unos con otros a través de unas extensiones citoplasmáticas que se proyectan a través de unos canalículos, los cuales sirven para la difusión del oxígeno y los nutrientes a las laminillas exteriores. La remodelación de este tipo de hueso tiene lugar en las superficies periósticas, endósticas y de los conductos de Havers.

El hueso trabecular se localiza sobre todo, en los huesos del esqueleto axial tal como los cuerpos vertebrales, la pelvis y en las metáfisis de los huesos largos, y su gran superficie respecto a su volumen lo convierten en la estructura ideal para el proceso de movilización del calcio y del fósforo.

El hueso trabecular es una compleja malla de placas y tubos que se entrecruzan. El hueso dentro de la trabécula es laminar, los osteocitos están orientados concéntricamente y tienen una red canalicular bien desarrollada. El hueso trabecular en crecimiento o remodelación, tiene la dirección de la deposición determinada por una fila de osteoblastos en el borde de la trabécula.

2.- Remodelado óseo

El hecho de que el esqueleto esté formado en gran proporción por matriz extracelular y de que carezca de parénquima, podría sugerir que es una estructura poco activa, no obstante, el esqueleto es uno de los sistemas más dinámicos del organismo.

En el adulto, el 7.6% del tejido óseo es renovado anualmente, cifra que es superior en el joven, e inferior en el anciano. Este proceso se denomina remodelado óseo, e impide que el esqueleto adulto acumule excesiva fatiga mecánica.

El hueso permanece en un estado de equilibrio dinámico de manera que está siendo constantemente remodelado en un proceso continuo de reabsorción y formación (Smith M. G., 1988; Rubin C. D., 1991; Rodman M. J., 1993; Manolagas S. C. y Jilka R. L., 1995). Los mecanismos dinámicos del recambio esquelético fueron durante mucho tiempo objeto de debate, según la teoría propuesta originalmente por Frost (Frost H. M., 1999), la remodelación ósea se verifica tanto en las estructuras trabeculares como en los sistemas haversianos mediante la acción sucesiva de los osteoclastos y los osteoblastos trabajando de forma ‘acoplada’ en las unidades de remodelado óseo (BRU). Cada ciclo de remodelado consta de tres fases: resorción, reposo o inversión y formación.

Resorción: durante esta fase un grupo de osteoclastos, probablemente a través de estímulos recibidos de los osteocitos de las trabéculas óseas (Canalis E. *et al*, 2003), excava una superficie ósea dando lugar a imágenes en sacabocados conocidas como lagunas de Howship. Este proceso dura de una a tres semanas.

Reposo o inversión: este periodo de aparente inactividad dura de una a dos semanas.

Formación: en el curso de esta fase, que dura unos tres meses, los osteoblastos rellenan la zona excavada por los osteoclastos con nuevo hueso. En primer lugar, los osteoblastos depositan matriz ósea sin mineralizar, y en una fase ulterior, el osteoide se

impregna de sales minerales especialmente de fosfato cálcico cristalino (hidroxiapatita). Entre el inicio del depósito de osteoide y el inicio de su mineralización, existe un tiempo de demora de unos 10-20 días.

La mineralización se inicia en la interfase entre el osteoide y el hueso mineralizado preexistente y avanza hacia la superficie a lo largo de un plano de barrido de 2 a 3 micras de espesor. Este plano, integrado en parte por mineral amorfo, se denomina frente de mineralización. A medida que este frente se desplaza va dejando tras de sí matriz ósea mineralizada en forma de cristales de hidroxiapatita. Por consiguiente, el espesor del osteoide, que en condiciones normales es de unas 9 micras, es directamente proporcional a la velocidad de formación de la matriz orgánica, e inversamente proporcional a la velocidad de avance del frente de mineralización.

El nuevo segmento de tejido óseo, resultante de la acción de una unidad de remodelamiento óseo, se denomina unidad estructural ósea (BSU). El límite entre el hueso preexistente y la nueva BSU es identificable morfológicamente como una línea ondulada, y recibe el nombre de superficie de inversión o de cemento.

El volumen de hueso preexistente, que es recambiado por hueso nuevo, en la unidad de tiempo, se denomina recambio óseo y depende de manera fundamental del número de unidades de remodelado activas. La diferencia entre el volumen de hueso formado y hueso reabsorbido por unidad de tiempo, se denomina balance óseo. Si la reabsorción y la formación son idénticas, se dice que hay un 'acoplamiento' de las actividades de ambos tipos de células, y el balance será igual a cero (Rubin C. D., 1991; Mundy G. R., 1995; Canalis E. *et al*, 2003). Cada unidad de remodelado puede generar un balance nulo, negativo o positivo. En el conjunto del esqueleto, el balance resulta de la suma aritmética de cada uno de estos balances individuales. La velocidad de pérdida o ganancia de masa ósea depende menos del valor del balance negativo o positivo generado por cada unidad de remodelado, que del número de unidades de remodelado activas o, lo que es lo mismo, un recambio aumentado acelera las pérdidas o ganancias y un recambio disminuido las enlentece. Todos los procesos que de manera característica, como la osteoporosis, presentan ciclos de remodelado con balance negativo, dan lugar a un déficit irreversible y acumulativo de masa ósea, que se establecerá a una velocidad directamente proporcional al grado de recambio.

3.- Regulación de la función ósea

La activación y actuación de las unidades de remodelado óseo se conocen sólo en parte y probablemente están bajo el control de un intrincado mecanismo en el que participan factores endocrinos, humorales, nutricionales, mecánicos y posiblemente

también genéticos (Mundy G. R., 1991; Gonzalez A. J. *et al*, 1992). De todos modos, los mejor conocidos son los de carácter humoral, bien actúen de forma sistémica (factores hormonales) o bien de forma local (factores paracrinos).

3.1 Factores de actuación sistémica

Los factores hormonales están integrados por las hormonas calciotropas (hormona paratiroidea, calcitriol y calcitonina) y otras que pueden calificarse de inespecíficas (Gonzalez A. J. *et al*, 1992).

La hormona paratiroidea estimula los osteoclastos y secundariamente los osteoblastos, resultando un balance óseo negativo con una pérdida de masa ósea.

La vitamina D3 también estimula los osteoclastos y por tanto el recambio óseo, sin embargo el resultado final de su acción es difícil de adivinar ya que además inhibe la secreción de PTH y por otro lado parece estimular directamente a los osteoblastos. Lo más probable es que su actuación sea un factor positivo para el incremento de la masa ósea.

La calcitonina, inhibe a los osteoclastos y por el fenómeno de acoplamiento inhibe también a los osteoblastos, disminuyendo el recambio óseo, con un efecto final positivo sobre la masa ósea.

Entre las hormonas calificadas de inespecíficas, merecen destacarse los estrógenos - su ausencia aumenta el recambio óseo, determinando osteopenia - y las hormonas tiroideas, que también aumentan el recambio óseo. Los glucocorticoides conducen a una pérdida ósea a través de una estimulación de los osteoclastos e inhibición de los osteoblastos.

3.2 Factores de actuación local

El hecho de que en un momento dado sólo algunos puntos concretos del esqueleto estén siendo objeto de remodelado, indica que deben existir factores locales que ejercen sus efectos sobre las células óseas. De hecho, se han identificado diversas sustancias, unas específicas del hueso y otras inespecíficas, que están implicadas en la proliferación y diferenciación celular de múltiples tejidos.

Los efectos de todos estos factores son imprevisibles ya que se ven influidos por la presencia o ausencia de otros factores así como su concentración. En general

podemos decir que las PGs, IL-1, IL-6, Factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y Factor de necrosis tumoral beta (TNFβ), GM-CSF y M-CSF, parecen desarrollar fundamentalmente un efecto estimulador de la resorción ósea. Los factores de crecimiento similares a la insulina tipo I y tipo II (IGF-I e IGF-II), el interferón *gamma* (INF-*gamma*) y TGF-β, estimulan la formación o se oponen a la resorción ósea (Mundy G. R., 1991).

Tras un traumatismo se produce una agresión tisular. Esta agresión pone en marcha un proceso en el organismo encaminado, o bien a la reparación, o a la regeneración del tejido lesionado. Se entiende por reparación, aquel proceso cuyo fin es la restauración del tejido sin que se conserve bien su arquitectura original ni tampoco su función. Este proceso es el que tiene lugar en lo que conocemos como cicatrización. Por el contrario, en el proceso de regeneración, la restauración del tejido lesionado posee propiedades indistinguibles del tejido original, tanto desde el punto de vista morfológico como funcional (Garg A. K., 2000).

La reparación tisular constituye un complejo proceso biológico que comprende la integración de diversos estadios tales como, la inflamación, quimiotaxis y división celular, angiogénesis, síntesis de las proteínas de la matriz extracelular y la remodelación del tejido neoformado. La aparición de un tejido nuevo donde previamente había una solución de continuidad, la formación de un tejido que reproduce las propiedades morfológicas y biomecánicas del tejido previo, la activación de una proliferación masiva de varias estirpes celulares en la región dañada (que el organismo sabe activar y controlar localmente una vez restituida la población celular necesaria) son en definitiva, datos que explican el interés científico creciente de diversos campos biomédicos en la reparación tisular.

La reparación tisular no es una disciplina marginal en el campo de la investigación biomédica. Casi todas las enfermedades albergan durante su evolución procesos de reparación tisular. Además, un gran número de complicaciones médicas o quirúrgicas pueden ser atribuidas a deficiencias en la reparación de los tejidos. Existen un amplio abanico de enfermedades (diabetes, cáncer, inmunodepresión), que influyen de forma negativa sobre la reparación de las lesiones tisulares, siendo la causa de una parte importante de la morbilidad e indirectamente, de la mortalidad, que se encuentra a nivel hospitalario.

La cicatrización de heridas y la consolidación de las fracturas, por citar dos exponentes significativos, por su elevada incidencia y por los problemas que plantean en condiciones fisiológicas (lentitud del proceso de reparación) y patológicas (alteración de la calidad biológica de la reparación), precisan de nuevas aportaciones y estrategias terapéuticas. Encontrar alternativas terapéuticas que estimulen los procesos de reparación adquiere una singular importancia para la superación de múltiples patologías.

Para ello, es clave conocer los fundamentos biológicos y celulares de la reparación, así como las propiedades y formas de actuar de los mediadores moleculares que regulan estos procesos [factores de crecimiento (FC), citocinas, etc.].

4.- Reparación tisular

La reparación de los tejidos está bien caracterizada a nivel microscópico, pero no así a nivel molecular (Bennett N. T. y Schultz G. S., 1993b, a). No obstante, los avances científicos alcanzados en este campo en las dos últimas décadas nos permiten constatar que los factores peptídicos de crecimiento regulan los procesos claves de la reparación tisular. Es por ello, que destinaremos un apartado específico a los FC más adelante.

4.1 Biología de la reparación

Los adelantos en los últimos años, han contribuido a aumentar nuestros conocimientos sobre la biología celular, la inflamación y la reparación tisular. La diversidad de tejidos condiciona peculiaridades distintas en el contexto de la reparación. En el proceso reparativo existen fenómenos celulares y tisulares que son comunes, los cuales los reflejamos a continuación a grandes rasgos.

Durante la curación de fracturas, el hueso se forma a través de dos mecanismos: *formación ósea intramembranosa* (directamente por los osteoblastos) y *osificación endocondral* (indirectamente por la calcificación de cartílago y su posterior reemplazo por hueso). Los procesos derivados de la curación de fracturas pueden ser divididos en 5 fases solapadas: inflamación, angiogénesis, formación de callo blando, formación de callo duro y remodelado (Claes L. y Willie B., 2007). La reparación constituye un fenómeno biológico que comprende varios procesos perfectamente ensamblados y ordenados. En términos generales y más definidos desde el mismo momento en que se produce la agresión a un tejido, se activa una cascada de señales moleculares que dan lugar a una secuencia concatenada de procesos que integran las siguientes fases: inflamatoria, proliferativa y reparadora, y de remodelación (Bennett N. T. y Schultz G. S., 1993a).

4.1.1.- Fase inflamatoria

La inflamación representa la compleja reacción de defensa del organismo ante la acción de diferentes agentes nocivos de procedencia mecánica, física, química o bacteriana. El objetivo de ésta es la eliminación de los agentes nocivos, o en su defecto su inactivación, limpiar el tejido y establecer las condiciones óptimas para los sucesivos

procedimientos proliferativos. Esta fase se inicia en el momento en que se produce la lesión y su duración alcanza en condiciones fisiológicas los primeros días del proceso (Martin P., 1997).

Al principio de la fase inflamatoria, la sangre se extravasa desde los vasos sanguíneos del hueso, médula del periostio y los tejidos circundantes, formando un hematoma que ayuda al reclutamiento de células hacia el foco de fractura. La degranulación plaquetaria, durante la formación del coágulo, libera distintos FC: el PDGF, el factor de crecimiento vascular endotelial (Vascular Endotelial Growth Factor, VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (Basic Fibroblast Growth Factor , bFGF), el factor de crecimiento insulínico (Insulin like groth factor, IGF-1), el factor de crecimiento epidérmico (Epidermal growth factor, EGF) y el TGF-β, que son potentes factores quimiotácticos de células inflamatorias, sobre todo el PDGF y el TGF-β.

Los FC liberados de las plaquetas activadas inician y modulan la curación de lesiones tanto óseas como de partes blandas (Eppley B. L. *et al*, 2004), induciendo una diferenciación celular acelerada y produciendo un tejido bien organizado, incluso en lesiones que previamente eran consideradas como intratables (Carter K., 2003). Los FC liberados desde las plaquetas parecen ser los iniciadores de la cascada de acontecimientos que dirigen a la curación, se difunden rápidamente desde el lugar de la lesión y son degradados por las proteasas (Bennett N. T. y Schultz G. S., 1993b).

El edema continúa con células inflamatorias, comenzando con leucocitos polimorfonucleares seguidos de macrófagos y linfocitos, llegando al sitio de fractura para retirar el tejido dañado y necrótico. La angiogénesis avanza potenciando el desarrollo del hematoma y la proliferación vascular (Claes L. y Willie B., 2007). En la fase inicial de la inflamación predominan los granulocitos neutrófilos, los cuales se encargan de liberar diversas sustancias mensajeras estimulantes de la inflamación, las llamadas citocinas (TNF-α e IL); fagocitan bacterias, pero también liberan enzimas proteolíticas que se encargan de eliminar las regiones dañadas y sin vitalidad del foco de fractura (Claes L. y Willie B., 2007). El número de neutrófilos alcanza un pico a las 24 horas y entonces cae gradualmente. La infiltración de neutrófilos (Martin P., 1997) cesa en unos pocos días y los neutrófilos utilizados en las fases previas son fagocitados por los macrófagos tisulares. En ausencia de infección, los neutrófilos no son requeridos más adelante para completar la reparación tisular normal (Slavin J., 1996). Transcurridas 24 horas, se produce la migración de los monocitos a la región de la lesión reclutados desde la circulación sanguínea, gracias a factores quimiotácticos como TGF-β sobre todo, PDGF (Wahl S. M. *et al*, 1987) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), alcanzando su pico a las 48 horas después de producirse la lesión. PDGF (Martin P., 1997) por otro lado, también induce la síntesis de proteínas quimiotácticas de monocitos (Monocyte chemoattractant protein, MCP) por las células

tisulares circundantes y esto constituye un persistente estímulo para la infiltración de monocitos (Slavin J., 1996). Los monocitos se transforman en macrófagos en la zona de la lesión, de modo que al tercer día, los neutrófilos han sido sustituidos en gran parte por macrófagos.

Si se impide la infiltración de macrófagos, la reparación se verá severamente dañada (Leibovich S. J. y Ross R., 1975). Por ello se propuso, y posteriormente se comprobó, que los macrófagos liberan una batería de citocinas [como la IL-1 y el factor de necrosis tumoral alfa, (TNF-α)] y los FC [(bFGF, TGF-α, TGF-β, VEGF, PDGF, factor de crecimiento derivado de los macrófagos (MDGF), que es una proteína similar a PDGF), MCP-1 y el factor de crecimiento asociado a heparina similar al factor de crecimiento epidérmico (Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor, HB-EGF)] en la región lesionada que amplifican las señales precoces liberadas por la degranulación plaquetaria y los neutrófilos (Martin P., 1997). Estos a su vez estimulan y controlan la deposición de proteínas de la matriz, la angiogénesis y la reepitelización en el caso de las lesiones cutáneas. Por ello son considerados en el momento actual, una fuente esencial de citocinas que conducirá a la reparación de la lesión (Slavin J., 1996).

4.1.2.- Fase proliferativa y reparadora

En esta fase, que comienza aproximadamente al cuarto día, predomina la proliferación celular con el fin de alcanzar la restitución vascular y de volver a rellenar la zona defectuosa mediante el tejido neoformado (Grant M. B. *et al*, 1993).

La formación de este tejido neoformado es iniciada, principalmente, por los fibroblastos, que producen por una parte colágeno y por otra proteoglicanos (macromoléculas de la matriz extracelular). La retícula de fibrina es aprovechada como matriz por los fibroblastos para la formación del colágeno. Las distintas poblaciones celulares presentes en la herida liberan varios FC, los fibroblastos concretamente bFGF, IGF-1, TGF-β, PDGF y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y las células endoteliales bFGF y PDGF. Muchos de los FC que regulan la proliferación de los fibroblastos, estimulan también la síntesis del colágeno (PDGF, FGF, TGF-β). El factor de crecimiento más importante que participa en la fibrosis inflamatoria es el TGF-β (Massagué J., 1990).

La reparación de un tejido no puede progresar sin nuevos vasos, ya que éstos deben garantizar un aporte adecuado de sangre, oxígeno y nutrientes (Slavin J., 1996). Gracias a los FC, los vasos intactos periosteales del borde del foco de fractura generan brotes vasculares que migran a la zona lesionada y al coágulo sanguíneo colindante (Claes L. y Willie B., 2007). La degradación proteolítica de la membrana basal del vaso progenitor, la migración de las células endoteliales hacia el estímulo

angiogénico (VEGF, bFGF, IGF-1), la proliferación de las células endoteliales justo detrás de las células que migran, la maduración de las células endoteliales y por último el reclutamiento de las células periendoteliales, son pasos sucesivos regulados por los FC (Schultz G. *et al*, 1991). La expresión del VEGF es estimulada por otros FC (como TGF-β, PDGF, TGF-α) y citocinas (Dvorak H. F. *et al*, 1995).

El IGF-1 es asimismo, un potente agente quimiotáctico para las células del endotelio vascular (Bennett N. T. y Schultz G. S., 1993a) existiendo además otros factores como el PDGF y el TGF-β, que son importantes en la correcta maduración y remodelación vascular (Leibowitz H. M. *et al*, 1990).

En el foco de fractura las células mesenquimales del hematoma proliferan y se diferencian para producir cartílago y una malla ósea que genera el callo de fractura (Claes L. y Willie B., 2007), blando. La formación ósea intramembranosa comienza en el periostio, a cierta distancia del foco de fractura. Posteriormente, el callo de fractura blando pasa a ser un callo fibroso o cartilaginoso que rodea al foco de fractura formando un callo externo (Claes L. y Willie B., 2007).

4.1.3.- Fase de diferenciación y remodelación

En esta fase comienza la maduración de las fibras de colágeno. La extensión de la lesión se reduce, disminuye cada vez más la presencia vascular y el contenido de agua en el tejido neoformado que gana en consistencia y se transforma finalmente en un tejido reparado (Martin P., 1997).

El metabolismo del colágeno dentro de la zona lesionada se mantiene en un equilibrio entre la síntesis y la degradación (Slavin J., 1996). La digestión del colágeno maduro resulta de la ruptura de una localización específica dentro de la triple α hélice por la colagenasa intersticial (metaloproteasa de matriz 1, MMP-1). La colagenasa intersticial es producida por diferentes tipos celulares, incluyendo las células endoteliales, los monocitos y los fibroblastos. Es liberada como una forma inactiva y es proteolizada por la plasmina o estromelisina generando la enzima activa. Una vez formadas, las MMP son inhibidas rápidamente por sus inhibidores tisulares (TIMP). Los TIMP son importantes en la regulación de la actividad de la colagenasa. El TGF-β inhibe las MMP, es un potente estimulador de la producción de procolágeno y TIMP-1, y bloquea la inducción de colagenasa por otras citocinas. Así, el TGF-β tiene un papel fundamental en la inhibición de la colagenolisis, dirigiendo la deposición de colágeno y de otras proteínas de la matriz (Slavin J., 1996). El resultado final de los procesos de síntesis y degradación es la remodelación.

En el foco de fractura varios días más tarde, se forma hueso nuevo sobre la base cartilaginosa por osificación endocondral. El callo duro esta formado por el callo perióstico y continua creciendo mediante el proceso de calcificación; y el callo blando se transforma en malla ósea (Claes L. y Willie B., 2007). Durante este estadío de remodelado óseo, la malla ósea y el cartílago calcificado son reemplazados por hueso laminar secundario, tanto cortical como trabecular, dependiendo del lugar anatómico. Durante el remodelado de la malla ósea hacia hueso laminar, los procesos de resorción eliminan activamente cualquier parte innecesaria del callo (Claes L. y Willie B., 2007). El remodelado continua durante años después de la consolidación ósea determinada por la clínica y por el estudio radiográfico (Wendeberg B., 1961); sin embargo, la densidad mineral ósea permanecerá más baja en el hueso fracturado durante años.

4.2 Factores de crecimiento

4.2.1.- Definición

Los factores de crecimiento son péptidos grandes o glicoproteínas que ejercen diversos efectos sobre el crecimiento celular, metabolismo y diferenciación; regulando diversos procesos biológicos a través de interacciones con receptores celulares que funcionan como un ligando-activador de enzimas intracelulares (De Groot C. J. y Woodroofe M. N., 2001).

Los factores peptídicos de crecimiento fueron descubiertos inicialmente debido a su capacidad para estimular la mitosis continua de células quiescentes, en un medio nutricionalmente completo que carecía de suero. Esto distingue a los FC de los elementos esenciales, cofactores y nutrientes requeridos para los procesos metabólicos, pero que no son suficientes para iniciar la división celular (Bennett N. T. y Schultz G. S., 1993b).

4.2.2.- Síntesis

Los FC son producidos localmente a nivel del tejido lesionado, y sistémicamente desde diferentes fuentes, siendo sintetizados por muchos tipos celulares que intervienen en la reparación de los tejidos (Bennett N. T. y Schultz G. S., 1993b). Las plaquetas almacenan los FC en los gránulos alfa, que tras una lesión se liberan al medio extracelular durante el proceso de la coagulación. La concentración de los FC alcanzada tras la degranulación de los gránulos alfa se incrementa de forma lineal (Garg A. K., 2000).

4.2.3.- Mecanismo de acción

Actúan sobre la célula productora de diversas formas (estimulación endocrina, paracrina, yuxtacrina, autocrina e intracrina) (Bennett N. T. y Schultz G. S., 1993b).

Un modo de acción endocrino tiene lugar cuando un FC secretado por una célula ejerce su acción sobre otras células a distancia. El paracrino ocurre cuando el FC tiene efecto sobre las células adyacentes y el modo yuxtacrino es similar, aunque el FC ejerce su efecto cuando está unido a la membrana celular ó a la matriz extracelular. Las acciones autocrinas están mediadas por un FC sobre su propia célula de origen, después de su secreción dentro del medio extracelular (Raff M. C. , 1996). Una variación de la acción autocrina ha sido denominada intracrina y fue descrita por primera vez en una variante oncogénica del PDGF denominada v-sis (Bejcek B. E. *et al*, 1989). La acción intracrina ocurre dentro de la célula de origen, y es así independiente de la secreción del FC (Raff M. C. , 1996). Los FC liberados desde los macrófagos, neutrófilos, linfocitos, plaquetas y fibroblastos, se unen a las células diana por una vía específica a través de los receptores de superficie celulares, induciendo a las células a migrar, dividirse, o producir otras proteínas (síntesis de la matriz) o factores requeridos para la reparación (Herndon D. N. *et al*, 1993). Una interrelación compleja de lazos de "feed-back" surge en el medioambiente tisular, donde los FC se regulan asimismos y los unos a los otros durante el crecimiento tisular (Herndon D. N. *et al*, 1993).

Los efectos de los FC están mediados por la activación de receptores celulares específicos (Bennett N. T. y Schultz G. S., 1993a). Los receptores son módulos de proteínas transmembrana que pueden unir FC a sus dominios extracelulares con una alta afinidad y especificidad y pueden transmitir la información generada por la unión produciendo cambios intracelulares. Las similitudes estructurales entre los receptores celulares pueden explicar la reactividad cruzada entre sustancias (Herndon D. N. *et al*, 1993). Los receptores de los FC constan de por lo menos tres dominios: *una región extracelular* que se une al factor de crecimiento con alta afinidad y especificidad, un *segmento intramembrana*, y uno o más *dominios intracelulares* que interactúan con señales moleculares dentro de la célula. A pesar de la diversidad de FC y receptores caracterizados, todos los receptores comparten estos rasgos estructurales. Cuando el mismo ligando se une a dos receptores vecinos ocurren cambios conformacionales que son transmitidos al dominio intracelular, y origina una serie de cambios citoplasmáticos que dan lugar al inicio de la transcripción de los ácidos nucleicos. Los receptores de los FC ejercen su función uniéndose a enzimas intracelulares a las que activan. Con la excepción de los receptores para la familia de TGF-β, todos los receptores de los FC estudiados tienen actividad tirosinquinasa. Así en muchos casos, los fenómenos intracitoplasmáticos son realizados a través de esta enzima, la cual fosforila proteínas citoplasmáticas, alguna de las cuales permanecen en el citoplasma y otras pasan al núcleo donde producen una activación genética (Herndon D. N. *et al*, 1993). Los

receptores para TGF-β y moléculas relacionadas fosforilan substratos de serina y treonina en lugar de tirosina (Massagué J., 1998).

Varios principios generales gobiernan los pasos a través de los cuales los FC activan sus receptores, aunque hay detalles específicos que difieren para cada combinación FC-receptor. La unión de un FC al dominio extracelular de su receptor, conduce a una dimerización u oligomerización del receptor (Raff M. C. , 1996).

Los cambios conformacionales inducidos por la unión al ligando activan el dominio intracelular quinasa del receptor, lo cual conduce secuencialmente a una fosforilación del receptor, por un mecanismo de transfosforilación, y entonces a la fosforilación de otros substratos. La autofosforilación, particularmente sobre los residuos de tirosina, crea una serie de sitios cercenados para otras proteínas intracelulares que contienen módulos denominados dominios SH2, por su similitud con una región de aproximadamente 100 aminoácidos que fue identificada por primera vez en el oncogén celular c-src (Koch C.A. *et al*, 1991). Se ha identificado otra clase de lugar de unión a fosfotirosina, denominado dominio PTB. Aunque estructuralmente distinto del dominio SH2, es funcionalmente equivalente en mediar interacciones entre una tirosina fosforilada y una proteína de señalización. Así, los receptores de FC activados con múltiples tirosinas fosforiladas en diferentes contextos de aminoácidos, vuelven al punto focal para la agregación intracelular transitoria de muchas proteínas que contienen SH2 - o PTB-. Estas proteínas incluyen una variedad de intermediarios en sendas de transducción de señal, con los últimos efectos amplificados y diversificados respecto a la señal inicial inducida por la unión del FC a su receptor (Claesson-Welsh L., 1994).

En el contexto de las acciones sobre el núcleo de los FC, los cambios a largo plazo que se dan en las células inducidas por FC son secundarios a alteraciones en la expresión de genes. Estos cambios no son sino un resultado de las múltiples rutas de señales inducidas después de la unión de proteínas sobre el receptor activado. Así, hay rutas que reflejan una respuesta primaria a los FC, de la que dependen una serie de interacciones proteína-proteína y pasos enzimáticos, en los que intervienen miembros de la familia de la proteína quinasa activada por mitogénesis (*Mitogen-activated protein kinase*, MAPK), que no requieren una nueva síntesis de proteínas celulares. La proteína c-fos se combina con c-jun como componentes de la proteína-1 activadora del factor de transcripción, el cual a su vez regula la actividad de una variedad de genes (Hill C. S. y Treisman R., 1995). De este modo, la expresión de genes y la biosíntesis de proteínas están alteradas después de que son estimuladas las señales del factor de crecimiento. Una vía relacionada, mediada por la activación de receptores de FC, conduce a la estimulación de otros miembros de la familia MAPK denominados quinasa c-jun N-terminal (JNK). Las JNK fosforilan c-jun sobre dos residuos de serina, que son críticos

para su activación como un factor de transcripción (Sánchez I. *et al*, 1994). Así, c-jun y c-fos pueden ser inducidos a través de la ruta de señales estimulada por el FC.

Existen también otras cascadas de MAPK con diferentes efectos sobre el núcleo que son activadas por los receptores de los FC. Como podemos observar la acción del FC a través de diversas rutas tiene una gran repercusión en la biología de la célula, y por ende, en la del tejido en el que se localiza.

4.2.4.- Funciones

Los FC ejercen funciones distintas en pacientes catabólicos y malnutridos, así como en pacientes con cáncer. De hecho, son secretados por muchos tipos celulares como una función basal o de respuesta a un desafío, como una herida o un proceso carcinogénico. Son los mediadores del crecimiento y la reparación celular fisiológica y patológica que incluye procesos tales como la embriogénesis, la reparación de tejidos y la carcinogénesis.

Las sendas enzimáticas que se inician por la unión de un factor de crecimiento a su receptor conducen a largo plazo a cambios en la expresión génica y la síntesis proteica que alteran el fenotipo de células individuales y tejidos, y tienen profundos efectos sobre el crecimiento y desarrollo completo del animal (Bennett N. T. y Schultz G. S., 1993b; Raff M. C. , 1996).

Los factores de crecimiento son proteínas solubles de señalización que regulan acontecimientos claves en los procesos de reparación tisular, como son la proliferación celular, la capacidad para reclutar células al foco de lesión mediante el proceso de quimiotaxis, la capacidad de diferenciar estas células a elementos capaces de reproducir la función apropiada para el tejido en el que se encuentran y, por último, hacer que estas células sean capaces de sintetizar la matriz extracelular necesaria para dar forma al tejido en el que asienta la lesión (Garg A. K., 2000). Estas propiedades demostrables *in vitro* llevaron a la conclusión de que tales FC juegan un importante papel en la reparación (Bennett N. T. y Schultz G. S., 1993a).

Los FC de las plaquetas se encuentran en concentraciones y proporciones normales, lo cual resulta en una mayor y más efectiva interrelación. Así, la combinación de PDGF-2 e IGF-1 o bien la de PDGF-2 y TGF-α es más efectiva que la de cada uno de ellos (Lynch S. E. *et al*, 1987; Lynch S. E. *et al*, 1989). Es sabido que en la regeneración ósea, PDGF y TGF-β tienen un potente efecto sinérgico quimiotáctico sobre los osteoblastos humanos (Cochran D. L. y Wozney J. M., 1999).

4.2.5.- Clasificación y tipos

Una vez conocidos los genes que codifican los FC y su secuencia de aminoácidos, se ha intentado agruparlos en una serie de familias (Tabla I), en base a las homologías estructurales existentes entre ellos. En cualquier caso, hemos de tener en cuenta que todavía no se conoce la secuencia de bases que codifican un gran número de FC de existencia probada.

Tabla I. Familias de factores de crecimiento

FAMILIA	*MIEMBROS*
EGF	EGF
	TGF-α
TGF-β	TGF-β
HBGF	FGF a
	FGF b
	ECDGF
PDGF	PDGF-AA
	PDGF-AB
	PDGF-BB
IGF	IGF-1
	IGF-2
NGF	NGF
	BDNF
VEGF	VEGF

4.2.6.- Factores de crecimiento y reparación ósea

La reparación de fracturas esta caracterizada por la implicación de múltiples factores que son expresados en una secuencia temporal definida (Khan S N. *et al*, 2000; Gerstenfeld L C. *et al*, 2003) y de alguna manera, pueden ser considerados una recapitulación del desarrollo óseo endocondral (Franceschi R. T., 2005).

La curación de una fractura ósea implica la acción coordinada en el espacio y en el tiempo de varios tipos celulares diferentes, proteínas y la expresión de cientos de genes trabajando conjuntamente para restaurar su integridad estructural (Malizos KN *et al*, 2006).

Estudios *in vivo* han demostrado que BMP, TGF-β, IGF, FGF, PDGF y VEGF están presentes durante la curación normal de las fracturas (Joyce M. E.Jingushi S. *et al*, 1990; Bourque WT. *et al*, 1993; Andrew JG. *et al*, 1995; Bostrom MP., 1998; Kloen P. *et al*, 2003; Okazaki K. *et al*, 2003; Mayer H. *et al*, 2005; Zimmermann G. *et al*, 2005).

Estos son agentes que intervienen de modo natural y cada uno de ellos tiene un rango de variantes moleculares las cuales han sido identificadas *in vivo* (Baylink DJ. *et al*, 1993; Lieberman J. R. *et al*, 2002; Mayer H. *et al*, 2005).

Se han estudiado en este trabajo la expresión de posibles genes implicados en este proceso, que detallamos a continuación:

4.2.6.1- Factor de crecimiento insulínico 1: IGF-1

En 1976, Rinderknecht y Humbel aislaron 2 sustancias activas del suero humano, las cuales, debido a su estructura similar a la proinsulina fueron llamadas IGF-I e IGF-II (Rinderknecht E. y Humbel R. E. , 1976).

El IGF-I es una hormona proteica polipéptidica de 70 aminoácidos del grupo de las somatomedinas, cuyo peso molecular es de 7649 daltons (Blundell T L. y Humbel R E., 1980) y que circula en la sangre a grandes concentraciones (1000 veces las de insulina). El IGF-I tiene un número de funciones biológicas similares a las de la insulina. Aunque el péptido presenta una elevada dependencia de la hormona de crecimiento (*Growth Hormone*, GH), cada vez más estudios muestran una secreción independiente de GH. El factor IGF-I produce numerosos efectos estimulantes del crecimiento, entre los que destacan efectos mitogénicos y la promoción de la sulfatación del cartílago. Asimismo, actúa como mediador de las acciones estimulantes del crecimiento en el esqueleto y otros órganos desencadenados por la hormona del crecimiento.

Entre muchas otras funciones destacan (Rosenfeld R.G. y Roberts C.T., 1999; Zapf J. y Froesch E. R., 1999):

- Ayuda al crecimiento de las células en la mitosis (cooperando con PDGF) y aumenta la diferenciación celular.

- Estimula el crecimiento: efectos mitógenos y promoción de la sulfatación del cartílago.

- Incrementa el rendimiento físico, mental y la resistencia en individuos sanos.

- Actúa dentro del sistema nervioso y es fundamental para el crecimiento y desarrollo de las neuronas, por lo tanto es un factor neurotrófico.

- Desempeña un papel importante en el envejecimiento celular, de tal manera, que las células cuando envejecen requieren más cantidad de IGF-1.
- Algunos estudios han encontrado asociaciones entre el IGF-1 y algunos tipos de cáncer; como el cáncer de próstata.

- Su acción principal consiste en el desarrollo óseo: además de estimular la proliferación celular de condrocitos, les hace sintetizar colágeno para la matriz ósea.

IGF es el factor de crecimiento más abundante en la matriz ósea. IGF-II es el más abundante en hueso, pero IGF-I tiene la mayor potencia osteogénica (Lieberman J. R. *et al*, 2002). En el hueso se sintetizan altos niveles de IGF-I y es secretado por los osteoblastos. IGF-I regula por tanto la formación de hueso de forma autocrina y estimula la formación de hueso induciendo la proliferación celular, la diferenciación y la biosíntesis de colágeno tipo I. IGF-I también aumenta el número de células multinucleadas osteoclásticas (Canalis E. *et al*, 1988).

4.2.6.2.- Factor de crecimiento transformante beta: TGF-β

La primera vez que se identificó TGF-β se trataba de un factor que promovía la transformación de los fibroblastos en cultivo celular, la acción de TGF-β sobre estas células alteraba su fenotipo y las transformaba en células tumorales (Okazaki R. *et al*, 2001). TGF-β resultó ser una mezcla de dos proteínas TGF-α y TGF-β. Estas moléculas pertenecen a la superfamilia de proteínas que incluye desde TGF-β1 hasta TGF-β5, proteínas morfogenéticas óseas, actinas e inhibinas. TGF-β1 es un homodímero no glicolisado, de 25 Kda de peso. Toda la secuencia de esta proteína se conserva de una especie a otra. El hecho de que una proteína sea conservativa entre las distintas especies indica que participa en procesos funcionales básicos para el mantenimiento de dichas especies. TGF-β1 se secreta de forma inactiva o latente y puede formar dos tipos de complejos latentes, uno de ellos denominado péptido latente asociado (latency associated peptide, LAP) que se forma al asociarse TGF- β1 con una proteína. Si además se asocia también con otra proteína de enlace el complejo se denomina proteína asociada a TGF- β latente (latent TGF-β binding proteína, LTBP) (Okazaki R. *et al*, 2001). Parece ser que LTPB incrementa la eficiencia de secreción de TGF-β desde las células y promueve la asociación de TGF-β a la matriz y facilita su activación (Taipale J. *et al*, 1998). Para que TGF-β ejerza su acción deberá interaccionar con los receptores correspondientes. Los receptores implicados son dos proteínas TGFRI y TGFRII. Prácticamente todas las células sintetizan TGF-β1 y todas las células expresan receptores para los TGF, este hecho indica que TGF-β1 afecta de alguna forma a todos los procesos fisiológicos (Okazaki R. *et al*, 2001).

Tiene tres papeles fundamentales (Okazaki R. *et al*, 2001):

- ~ Modula la proliferación celular, generalmente como supresor.
- ~ Mejora la deposición de matriz extracelular aumentando la síntesis e inhibiendo la degradación.
- ~ Tiene efecto inmunosupresor a través de varios mecanismos.

Controla la proliferación y expresión de la diferenciación fenotípica de varios tipos de células específicas del esqueleto, entre ellas los precursores celulares mesenquimales hacia condrocitos, osteoblastos y osteoclastos (Sporn M. B. y Roberts A. B., 1988).

Estudios en la curación de tejidos blandos han demostrado que TGF-β es liberado por la degranulación plaquetaria en el lugar de la lesión, posiblemente para iniciar una cascada de eventos reparadores (ConnolhJ F. y Shindell R., 1986). El TGF-β es un potente factor quimiotáctico para los macrófagos residentes en el foco lesional (Sporn M. B. y Roberts A. B., 1989). Además de atraer macrófagos al lugar de la lesión, este peptido activa la síntesis de otros factores de crecimiento y desactiva la producción de peróxido de hidrógeno por los macrófagos, gracias a esto los fibroblastos no son destruidos (Tsunawaki S. *et al*, 1988). Por otro lado, TGF-β estimula a los fibroblastos en el tejido en reparación mediante la activación de la producción de componentes de la matriz extracelular, como colageno, fibronectina y proteoglicanos; mediante la activación de receptores celulares de integrinas para estas proteínas de matriz extracelular y mediante la inhibición de la acción de enzimas proteolíticas que podrían destruir el tejido conectivo formado recientemente (Keski O. J. *et al*, 1988; Beck L. S. *et al*, 1993). El resultado de todas estas acciones es la formación de abundante tejido de granulación nuevo.

El papel de TGF-β1 durante la fase proliferativa es la capacidad para estimular la angiogénesis y la deposición de colágeno en los tejidos (Roberts A. B. *et al*, 1986; Beck L. S. *et al*, 1991). En la fase de maduración de la curación, TGF-β1 podría continuar ejerciendo control sobre los componentes de matriz extracelular, además de inhibir las acciones de aquellas sustancias que de otro modo podrían servir para degradarles. TGF-β1 participa en algunos procesos apoptóticos que ocurren durante la maduración de las heridas (Yanagihara K. y Tsumuraya M., 1992; Desmouliere A. *et al*, 1995). Diferentes estudios sugieren que TGF-β estimula tanto la formación ósea intramembranosa como la endocondral (Noda M. y Camilliere J. J., 1989; Joyce M. E.Roberts A. B. *et al*, 1990). La familia de TGF-β, entre los cuales se encuentra las BMP, son importantes estimuladores de la expresión de genes involucrados en la síntesis de proteínas de matriz extracelular. Se ha observado, *in vitro*, que TGF-β incrementa la formación del

tejido de granulación y la fuerza tensil de las heridas cutáneas cuando se administra este FC (Einhorn T. A., 1995).

TGF-β y BMP2 inducen la formación condrocítica en los márgenes de la articulación en estudios realizados en rodillas normales y artrósicas de ratón (Van den Berg W. B. *et al*, 2001). Beck *et al*, demostraron la potente actividad osteoinductiva de TGF-β como aplicación terapeútica en defectos óseos no curados (Beck L. S. *et al*, 1993).

4.2.6.3.- Proteínas morfogenéticas óseas: BMP

La historia de las BMP comenzó en 1889 con las investigaciones del cirujano americano Senn, que utilizaba implantes óseos desmineralizados en la cirugía ósea restauradora (Senn N., 1889). A mediados de la década de los sesenta, el profesor M.R. Urist, de la Universidad de California en Los Ángeles, descubrió que los huesos alógenos desmineralizados implantados entre el músculo formaban hueso nuevo (Urist M. R., 1965). En 1973, este investigador y su equipo lograron extraer del tejido óseo una mezcla proteica heterogénea con propiedades para formar hueso en partes blandas, y que recibió el nombre de "proteína morfogenética ósea".

Cien años después de los estudios de Senn, Wang *et al*. aislaron, mediante la extracción química de matriz ósea bovina, una fracción proteica altamente inductiva con un peso molecular de 30.000 Da (Wang E. A. *et al*, 1990).

Wozney *et al*. lograron clonar desde la BMP-1 hasta la BMP-14 mediante secuenciación enzimática (Wozney J. M. *et al*, 1988). Hasta la fecha se han aislado y clonado más de 40 BMP de diferentes tejidos. Desde la BMP-1 hasta la BMP-7 están presentes en los tejidos óseos humanos, y tienen propiedades osteoinductivas (Dudley A. T. *et al*, 1995). Aproximadamente, existe un microgramo de cualquiera de estas proteínas por kilogramo de tejido óseo. Las BMP son proteínas formadas por dos cadenas polipeptídicas idénticas. Tras la disociación de las correspondientes secuencias de propéptidos se produce la proteína biológicamente activa. Con excepción de la BMP-1, que es idéntica a la proteinasa de procolágeno C, todas las BMP presentan restos de cisteína en su extremo C7 terminal y, en consecuencia, se engloban en la familia de proteínas de TGF-ß. Entre los miembros de esta amplia familia, emparentados con las BMP, se encuentran, entre otros, la activina y la inhibina. En la familia BMP también se incluyen los llamados factores de crecimiento/diferenciación (*growth differentiation factor*, GDF).

En los últimos años, también se han identificado los genloci en humanos para BMP-2 hasta BMP-7, habiéndose localizado en el cromosoma 20 (Kübler N. R., 2001). Además, se ha logrado el análisis de estructuras radiográficas de BMP-2 y BMP-7

cristalizadas. La estructura tridimensional de ambas proteínas muestra una gran similitud con los factores TGF-ß2 y TGF-ß3, respectivamente (Scheufler C. *et al*, 1999). La implantación heterótoma, es decir, intramuscular de dichas BMP, creadas mediante ingeniería genética, conduce en rata a la formación de hueso en tres semanas. Se trata de un proceso de formación de hueso endocondral en cascada: en los primeros cuatro días de implante donde se produce una migración quimiotáctica de células diana pluripotentes y mesenquimales; que se encuentran en pequeñas cantidades en los tejidos blandos próximos al esqueleto, así como en el tejido de sostén. Debido a ello, hasta el final de la primera semana se produce una proliferación de células pluripotentes, seguida de su diferenciación en condrocitos. Dos semanas después del implante, el nuevo cartílago muestra una calcificación de su matriz, que es acompañada por una invasión capilar del tejido. Hacia la tercera semana desde el implante, ya aparece hueso, con evidentes trabéculas óseas individuales que aportan estabilidad biomecánica, así como partes activas de médula ósea hematopoyética. Para la activación de este proceso en cascada bastan unos pocos miligramos de las correspondientes BMP. Tanto el volumen como la velocidad de formación ósea muestran una dependencia directa con la cantidad de proteína implantada. De la familia de las BMP, la BMP-2 y BMP-7 son las que poseen mayor poder osteoinductivo. La BMP-4 tiene alrededor de un 50% de la acción osteoinductiva de la BMP-2. En comparación con esta última, las BMP-3 y BMP-5 presentan una acción significativamente retardada, siendo necesarias mayores dosis para conseguir la inducción ósea.

Generalmente, FGFs, IGFs, FGF, PDGF actúan como factores mitogénicos que estan ampliamente distribuidos en el callo blando temprano de la reparación de lad fracturas. Sin embargo, las BMP individualmente también exhiben modelos de expresión temporal únicos, con mRNA de BMP-2 más altos durante la fase inicial inflamatoria, y BMP-3a, 4, 7, y 8 más altos durante las fases tardías condrogénica y osteogénica de la reparación de las fracturas (Cho T. J. *et al*, 2002). La expresión superpuesta de BMP-2, 3a, 4, 7, y 8 se observa en varios momentos durante la consolidación de la fractura (Cho T. J. *et al*, 2002). Zhao *et al*., determinaron que la duración *in vivo* de la expresión de BMP-2 desde fibroblastos transducidos con un adenovirus codificador de BMP-2 era menor a las dos semanas (Murphy G., 1995).

4.2.6.4.- Factor de crecimiento vascular endotelial: *VEGF*

El VEGF se aisló originalmente a partir de cultivos de hipófisis. Se trata de una proteína homodimérica cuya secuencia de aminoácidos tiene una similitud del 24% con el Factor de crecimiento derivado de las plaquetas β (PDGF-β), pero se une a distintos receptores que PDGF e induce distintos efectos biológicos. El VEGF, es el regulador más importante de la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* durante diversos procesos fisiopatológicos, como pueden ser el desarrollo embriológico o la curación de las heridas. Además de su papel como inductor de la neoangiogénesis, el VEGF incrementa

la supervivencia de los osteoblastos. VEGF es almacenado y secretado por osteoblastos y el endotelio y poseé un importante papel en la angiogénesis durante la consolidación de fracturas (Street J. T. *et al*, 2001; Deckers M. M. *et al*, 2002; Eckhardt H. *et al*, 2005; Li G. *et al*, 2005). Es un mitógeno potente y selectivo para las células endoteliales. Aunque no se conoce con detalle su papel en la regeneración, su importancia queda manifiesta por su acción angiogénica *in vivo*.

Para examinar las posibles interaciones entre BMP y las señales angiogénicas (Pelttari K. *et al*, 2008), utilizaron transferencia génica retroviral para establecer líneas de células madre estables derivadas de músculo que expresaban BMP-4, VEGF y el antagonista de VEGF, el receptor del factor de permeabilidad vascular (Flt1) soluble, y que fueron seguidamente examinados, solos o en combinación, para valorar la actividad osteogénica (Pelttari K. *et al*, 2008). VEGF por si mismo no incrementó la actividad osteogénica de las células madre derivadas de músculo (muscle-derived stem cell, MDSC). Sin embargo, se encontró que VEGF actua sinérgicamente con BMP 4 para incrementar el reclutamiento y la supervivencia de células madre mesenquimales y para estimular la formación y reparación ósea. Se demostró que los efectos de VEGF sobre la reparación de fracturas eran dependientes del ratio VEGF y BMP, de hecho índices elevados de VEGF/BMP demostraron que inhibían la osteogénesis. Por consiguiente, los efectos de VEGF fueron totalmente bloqueados por el antagonista Flt1 soluble. La vascularización es sumamente importante en todo el proceso de regeneración ósea y la coexpresión de factores angiogénicos y osteoinductivos pueden incrementar la formación ósea (Franceschi R. T., 2005).

4.3 Otras proteínas relacionadas con la reparación tisular

4.3.1.- Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano, representando el 30% de su peso en seco. El hueso, la piel, el tendón, el cartílago, los ligamentos y las paredes vasculares son especialmente ricas en colágenos, los cuales son esenciales en todos los tejidos y desarrollan un importante papel en el mantenimiento de la integridad estructural sobre numerosos tejidos y órganos. Además, los colágenos están implicados en muchas otras funciones biológicas importantes, tales como la unión celular, la quimiotaxis, la agregación plaquetaria y la filtración a través de la membrana basal.

Los colágenos desempeñan también un papel importante en la curación de heridas y fracturas. Por otro lado, la excesiva formación de colágeno representa un problema, ocasionando fibrosis de diferentes órganos y tejidos (Okada A. *et al*, 1997). Pertenece a una familia de más de 25 miembros que son producidos por varios tipos

celulares y se diferencian en su estructura molecular, características morfológicas, distribución, funciones y patologías. Los colágenos tipo II y XI se encuentran principalmente en tejido cartilaginoso (Madlener M. *et al*, 1998).

En el presente trabajo hemos estudiado el colágeno tipo 2a1 (Col2a1), que se encuentra clasificado dentro de los tipos de colágeno que forman largas fibrillas (Junqueira L. C. y Carneiro J., 2005). También pertenecen a este mismo grupo los colágenos tipo I, III, V y XI. En un estudio *in vitro*, se observó como la exposición de celulas mesenquimales de equino a TGF-β1 inducía la expresión de colágeno tipo II en cultivos en monocapa, diferenciándose rápidamente a condrocitos maduros (Ibarra C. *et al*, 2007).

Entre los genes candidatos a participar en el proceso artrósico, parecen tener un papel importante los que codifican para las proteínas estructurales de la matriz extracelular del cartílago, particularmente los que codifican para Col2a1. Hay varios indicios de que las alteraciones en este gen podrían ser causa de la degeneración de la articulación en el proceso artrósico, tales como la asociación de diversas mutaciones con distintas osteocondrodisplasias o la propia función de Col2a1, que codifica para las proteínas más abundantes de la matriz extracelular (Cicuttini F. M. y Spector T. D., 1996; Mustafa Z. *et al*, 2000; Zhai G. *et al*, 2004).

4.3.2.- Metaloproteasas de matriz: MMP

La degradación de las proteínas de la matriz extracelular es esencial en muchos procesos fisiológicos, por ejemplo, durante el desarrollo, el crecimiento y la reparación tisular. Por otro lado, la excesiva proteólisis desempeña un papel importante en numerosas condiciones patológicas, como la artrosis, la osteoartritis, los desordenes de la piel y la periodontitis (Rappolee D. A. *et al*, 1988; Mueller R. V. *et al*, 1994; Taipale J. *et al*, 1998). Las enzimas proteolíticas están clasificadas como exopeptidasas o endopeptidasas según excindan péptidos óseos terminales o internos, respectivamente. Las endopeptidasas están clasificadas como serina, cisteína, aspartico o metaloproteasas basadas en secuencias aminoacídicas y cofactores que determinan su actividad y mecanismo catalítico.

Las MMPs constituyen una familia multigénica de unas 25 enzimas de secreción y superficie celular que procesan o degradan numerosos substratos pericelulares. Sus dianas incluyen otras proteinasas, inhibidores de proteinasa, factores de la coagulación, moléculas quimiotácticas, factores de crecimiento latentes, proteínas unidas a FC, receptores de superficie celular, moléculas de adhesión celula-celula, y prácticamente todas las proteínas estructurales de la matriz extracelular. Por ello, las MMPs son capaces de regular muchos procesos biológicos y son íntimamente reguladas por si mismas (Sternlicht M. D. y Werb Z., 2001), pueden degradar la mayoría de componentes de la matriz extracelular además de tener un papel importante en la

activación y procesamiento de citocinas o FC, en la exposición de receptores de membrana, en la liberación del ligando Fas o en la inactivación del TNF-α. La degradación de la matriz extracelular es por lo tanto un proceso necesario para permitir la migración celular y la remodelación de los tejidos. Todo ello juega un papel crucial en muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos. Las MMPs de matriz participan en la curación de heridas, la angiogénesis y la metástasis de las células tumorales (Yanagihara K. y Tsumuraya M., 1992). Son secretadas como enzimas que requieren ser activadas. Además en los tejidos existen inhibidores de la acción de éstas, como son los TIMP y la α2-macroglobulina (Murphy G., 1995). Se cree que el control que ejercen los TIMP sobre la actividad de las MMPs tiene lugar alrededor de las células, mientras que la de la α2-macroglobulina tendría lugar en los fluidos, especialmente en los lugares con inflamación. La acción de las MMPs está regulada a tres niveles: inducción de la expresión, activación de las formas latentes y regulación por los TIMP. Con excepción de la MMP-11, todas la demás MMPs solubles son secretadas como cimógenos. En tejidos no lesionados se detecta una actividad muy baja de MMP. Su expresión está regulada transcripcionalmente por citoquinas inflamatorias, transformación celular, hormonas y FC. Dependiendo de la especificidad del substrato, similitud aminoacídica y módulos de secuencia identificable, la familia de MMPs puede ser clasificada en las siguientes diferentes subclases: colagenasas, gelatinasas, estromelisinas, matrilisinas y metaloproteasas de matriz tipo membrana (Desmouliere A. *et al*, 1995). De ellas trataremos las estromelisinas*:*

Dentro de este grupo de MMPs encontramos la metaloproteasa de matriz 3 (MMP-3) también llamada estromelisina 1, la MMP-10 (estromelisina 2) y la MMP-11 (estromelisina 3). Tanto la MMP-3 como la MMP-10 son expresadas por los fibroblastos y por las células escamosas de la piel normales y transformadas. Pueden ser activadas por la plasmina, calicreína, triptasa, elastasa y catepsina G. En estudios *in vitro* llevados a cabo con cultivos de células musculares lisas estimuladas con IL-1 o TNF-α, se observa que hay un incremento de la secreción y de la actividad de la MMP-1, 3 y 9. La MMP-3 además de otras acciones activa a la procolagenasa y a la progelatinasa B (Okada A. *et al*, 1997).

Muchos genes de metaloproteasas se expresan en cantidades elevadas durante el proceso de curación de heridas. De estos, MMP-3, MMP-9 y MMP-13 se expresaron en estadios tempranos del proceso de reparación y se encontraron fundamentalmente en las células epiteliales migratorias, mientras que las que corresponden a genes de expresión tardía; MMP-14, MMP-9 y MMP-11 se detectaron especificamente en las células estromales de la herida (Okada A. *et al*, 1997). Estos resultados también sugieren que durante la curación de las heridas cutáneas pro-MMP-2 y pro-MMP-9 estan activados por MMP-14 y MMP-3, respectivamente. Por otro lado, se ha visto la expresión de

TIMP-1 en el borde epitelial/mesenquimal durante la curación de heridas dérmicas (Madlener M. *et al*, 1998).

Se ha detectado un elevado incremento de MMP3 en pacientes con degradación de cartílago (Kubota E. *et al*, 1997). En artritis reumatoide, MMP-3 juega un papel significante en la progresión de las erosiones a través de la matriz cartilaginosa rica en proteoglicanos (Ainola MM. *et al*, 2005). Los estudios más recientes realizados por Pelttari *et al*. en ratones inmunodeprimidos encontraron que la perdida de capacidad de formación de cartilago ectópico, en el progreso de de diferenciación en condrocitos de articulación humana, puede ser predecido por el nivel de MMP-3 (Pelttari K. *et al*, 2008). El estudio de Eguchi *et al*. determina igualmente como la concentración de MMP-3 es un marcador útil para predecir el daño óseo en los estadios tempranos de la artrosis, y la supresión de la producción de MMP-3 podría ser una terapia efectiva para pacientes con artrosis temprana (Eguchi K., 2005). Sazaki *et al*. sugieren que la aplicación intraarticular de hialuronato inhibe la expresión y la produción de MMP-1 y MMP-3 en células sinoviales humanas estimuladas con IL1-beta. De este modo se propone que con su aplicación y la consiguiente disminución de la producción de MMP-3, se podría mejorar la inflamación articular derivada de la destrucción de hueso y cartilago (Sasaki A. *et al*, 2004).

Del mismo modo, la MMP-3 producida por los discos intervertebrales en humanos podría estar implicada en el inicio de la degradación de la matriz del disco intervertebral, produciendo degeneración del mismo (Nemoto O. *et al*, 1997).

Karsdal *et al*. sugieren que la MMP activada por TGF-beta mantiene la supervivencia osteoblástica durante la diferenciación hacia osteocitos mediante la vía dependiente de p44/42 (Karsdal M. A. *et al*, 2002).

4.3.3.- Proteínas supresoras de la señalización de citoquinas: Suppresor of cytokine signalling, SOCS

Las proteínas SOCS se transcriben en respuesta a la estimulación de citoquinas y utilizan varios mecanismos mediados por receptores para regular negativamente las vías de transducción de la señalización de citoquinas (Leroith D. y Nissley P., 2005; Rico-Bautista E. *et al*, 2006). Los mecanismos moleculares de la acción de SOCS implican la inhibición de la actividad de la quinasa Janus (JAK), bloqueando transductores de señal y activadores de transcripción (STAT) de los sitios de unión sobre receptores de citoquinas o promoviendo la degradación de proteínas específicas de señalización. Por consiguiente, las proteínas SOCS forman parte de un clásico circuito de retroalimentación negativo para evitar las consecuencias perjudiciales de la excesiva estimulación (Krebs D. L. y Hilton D. J., 2001).

La proteína SOCS2 es uno de los 8 miembros de la familia SOCS y es un regulador importante del crecimiento somático a través de la regulación de la señalización de GH/IGF-1 (Yoshimura A. *et al*, 2007). La proteína SOCS3 se cree que es esencial para las funciones de la placenta en estudios *in vivo* (Roberts A. W. *et al*, 2001). Metcalf *et al*. demostraron como ratones Socs2$^{-/-}$ presentaban un incremento en el crecimiento longitudinal del esqueleto asociado con la señalización desreguladora de GH/IGF-1 (Metcalf D. *et al*, 2000). Es posible que SOCS2 pueda estar relacionado con la transición del fenotipo condrocítico de la forma proliferativa a diferenciado (Macrae V. E. *et al*, 2009). SOCS2 induce la diferenciación de células mesenquimales C2C12 a mioblastos u osteoblastos (Ouyang X. *et al*, 2006) además de inducir la diferenciación de células progenitoras neuronales a neuronas (Goldshmit Y. *et al*, 2004; Wang L. *et al*, 2004). Macrae *et al*. proponen que las alteraciones encontradas en la estructura ósea de la tibia en ratones Socs2$^{-/-}$ es una consecuencia consistente y directa del aumento de señalización GH/IGF-1 (Macrae V. E. *et al*, 2009). Sin embargo se debe determinar si estos parámetros óseos alterados son sólo una consecuencia de los índices más rapidos del crecimiento longitudinal evidente en ratones Socs2$^{-/-}$, o representan un papel tisular autónomo para SOCS2 en el mantenimiento de la masa ósea. Macrae *et al*. muestran la primera evidencia del papel de SOCS2 en intervenir en los efectos de las citoquinas sobre la dinámica de la placa de crecimiento. Los niveles fisiológicos de SOCS2 inhiben la señalización a traves del eje GH/IGF-1 y es debido a esto por lo que regulan negativamente la formación ósea y el crecimiento endocondral (Macrae V. E. *et al*, 2009) e IGF-1, regulador de la homeostasis ósea (Giustina A. *et al*, 2008). Macrae *et al*. indican en su estudio que las citoquinas proinflamatorias realizan sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento óseo longitudinal a través de mecanismos que son independientes de SOCS2 (Macrae V. E. *et al*, 2009).

4.3.4.- Proteína quimiotáctica de monocitos 1: MCP-1

Las quimioquinas son una familia de potentes citoquinas quimiotácticas que regulan la locomoción y el tráfico de leucocitos en los procesos basales e inflamatorios; sin embargo, se ha observado recientemente que las quimioquinas son expresadas por células no hematopoyéticas como: células endoteliales, células musculares lisas y cardiomiocitos y sus funciones se extienden más allá de la actividad leucocitaria (Jia L. *et al*, 2006). MCP-1 (también conocido como *chemokine (C-C motif) ligand 2*, CCL2) es una importante quimioquina que induce el reclutamiento y la activación de monocitos, células T y células *Natural Killers* (NK) y esta implicada en enfermedades caracterizadas por infiltrados ricos en monocitos (Morimoto H. *et al*, 2006). Los metabolitos de los monocitos son reguladores potenciales de la actividad celular ósea (Posner L. J. *et al*, 1997). Los FC producidos por monocitos podrían estimular la formación ósea, mientras algunas citoquinas como IL-1 e IL-6 pueden inducir la resorción ósea. Para determinar si MCP-1 incrementa el reclutamiento de monocitos

durante la curación de fracturas se han llevado a cabo estudios *in vivo* en los cuales se ha aplicado MCP-1 en el foco óseo. Los resultados de Posner *et al*. indicaron que MCP-1 estimulaba de forma importante el reclutamiento de monocitos comparado con el vehículo solo. El incremento de monocitos producido por MCP-1 se asoció con un incremento en el número de osteoblastos en la línea de superficie ósea, aunque no en la misma magnitud que en los controles positivos; IGF1 y PDGF-BB (Posner L. J. *et al*, 1997). Estos resultados indican que MCP-1 induce el reclutamiento de monocitos en el hueso y sugieren que el reclutamiento está asociado con un incremento en el número de osteoblastos. Parece ser que este fenómeno ocurre por mecanismos indirectos ya que MCP-1 no incrementaba directamente la síntesis de DNA en células osteoblásticas *in vitro*. Es por ello que los fagocitos mononucleares activados podrían jugar un importante papel en la curación de lesiones óseas estimulando la proliferación de células osteoblásticas, presumiblemente a través de la producción de FC (Posner L. J. *et al*, 1997).

En estudios realizados por Omi *et al*. observaron como la estimulación en ratas con ultrasonidos pulsátiles de baja intensidad (LIPUS) activaba TIMP-1 y MCP-1 en las células del nucleo pulposo y macrófagos; tanto en la proteína como en los niveles del gen, recomendando los LIPUS como un tratamiento suplementario prometedor para las hernias de disco intervertebrales (Omi H. *et al*, 2008).

Bandom *et al*. aplicaron LIPUS en osteobastos en diferentes fases de maduración y analizaron la expresión de quimioquinas y citoquinas *in vitro*. Los LIPUS inducían la fosforilación de la quinasa reguladora de la señal extracelular y la expresión de la quimioquina RANKL fue inhibida por un inhibidor específico AT1. Por ello, según estos autores (Bandow K. *et al*, 2007) AT1 podría jugar uno de los papeles esenciales en el metabolismo óseo como mecanoreceptor de osteoblastos.

5.-Pared torácica

5.1 Anatomía y función

El tórax humano está constituido por la conjunción de dos hemitórax, derecho e izquierdo, simétricos y con unos diámetros anteroposterior y transversal menores que el vertical. La caja torácica, con su elasticidad, permite los movimientos respiratorios; al tiempo que, con su estabilidad, protege los órganos contenidos en ella.

Los movimientos del tórax son el resultado de fenómenos activos y pasivos. Durante la inspiración, el tórax se ensancha por la contracción de una serie de músculos que determina el aumento de sus diámetros y, por tanto, de sus dimensiones. Esto tiene

como consecuencia la disminución de las presiones intratorácicas, intrapleural e intrapulmonar, lo que facilita la entrada del aire a los pulmones. La espiración, por el contrario, es un fenómeno pasivo. Disminuyen los diámetros del tórax, aumentando las presiones citadas, lo cual facilita la expulsión del aire, cargado de dióxido de carbono, al exterior. Para cumplir esta función, la pared torácica está dotada de una serie de músculos inspiratorios debidamente dispuestos. Su contracción sería inútil si la caja torácica fuera rígida. Para darle movilidad, las costillas se articulan con las apófisis transversas de las vértebras torácicas, por un lado, y con el esternón, por otro.

Durante la inspiración se ensancha el tórax en todas sus dimensiones. El aumento del diámetro anteroposterior se produce por el movimiento hacia arriba y hacia delante de la parte inferior del esternón. El diámetro transversal aumenta por el desplazamiento hacia arriba y afuera de las costillas, apreciándose sobremanera a nivel de la línea axilar media. El diámetro que más aumenta es el vertical, debido a la contracción del músculo diafragma, capaz de movilizar dos tercios del volumen corriente.

Cuando la presión intrapulmonar excede a la atmosférica se produce la espiración. En este momento la resistencia elástica de los pulmones es suficiente para, en su retracción, expulsar el aire al exterior. La espiración cesa cuando la presión intrapulmonar se iguala a la atmosférica (Pérez Casas A y Bengoechea M. E. , 1978).

5.1.1.- Partes blandas superficiales

La pared del tórax está cubierta por la piel y la fascia superficial. Contiene las glándulas mamarias en la mujer y las mamilas en el hombre. Los músculos llamados respiratorios se agrupan básicamente en: 1) extrínsecos o músculos auxiliares de la respiración; 2) intrínsecos o músculos respiratorios propiamente dichos.

Los músculos responsables de la inspiración son aquellos cuya contracción determina que las costillas roten hacia arriba y hacia atrás, elevando sus extremos anteriores. Estos músculos son los siguientes: diafragma, intercostales externos y medios, supracostales, escalenos y serrato dorsal craneal (Pérez Casas A y Bengoechea M. E. , 1978).

En la inspiración forzada intervienen algunos músculos auxiliares: esternocleidomastoideo, pectorales mayor y menor, dorsal ancho y serrato mayor. Por su parte, también trapecio, romboides y angular del omóplato pueden, en determinadas condiciones, ser considerados inspiratorios auxiliares.

La espiración *per se* no precisa de contracción muscular. La espiración forzada, en cambio, exige la contracción de los músculos de la pared abdominal e incluso de

otros. Todos ellos deprimen los extremos anteriores de las costillas. Son los músculos llamados espiratorios: intercostales internos, subcostales, serrato dorsal caudal, triangular del esternón, tracto lateral del erector del tronco, y músculos parietales del abdomen (Pérez Casas A y Bengoechea M. E. , 1978).

5.1.2.- Esqueleto y partes blandas inherentes

Además de por la porción torácica o dorsal del raquis, el armazón óseo está constituido por el esternón y los arcos costales.

El tórax comunica con el cuello a través del estrecho superior, cuyos límites son el manubrio esternal, la primera costilla a cada lado, y la primera vértebra torácica. El límite inferior del tórax está determinado por la apófisis xifoides, los cartílagos costales VIII a X fusionados, las costillas XI y XII, y el cuerpo de la duodécima vértebra torácica.

5.1.2.1.- Esternón

Hueso plano, alargado, de unos 15 a 20 cm de longitud, situado en la línea media anterior. En él se distinguen el manubrio, el cuerpo y la apófisis xifoides. Junto con los cartílagos adyacentes, constituye la pared anterior del tórax. El manubrio, cuyo borde superior es cóncavo (horquilla supraesternal) se articula con las dos clavículas y con el cartílago de la 1ª costilla a cada lado. Su articulación con el cuerpo del esternón es angulada, prominente (ángulo de Louis), situada a la altura de la 4ª ó 5ª vértebra dorsal. El cuerpo del esternón presenta unos bordes escotados, para articularse con los cartílagos costales 2ª a 7ª. En su extremo distal se articula con la apófisis xifoides, unión que se encuentra a nivel de la 10ª-11ª vértebras torácicas. La naturaleza de ese apéndice es cartilaginosa, osificándose en la edad adulta (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.1.2.2.- Costillas

En el humano existen doce costillas a cada lado. Las siete superiores se articulan directamente con el esternón por medio de los cartílagos costales. Los cartílagos de las costillas VIII a X se fusionan entre sí antes de articularse con el esternón, formando la arcada costal. Las costillas XI y XII son flotantes, terminando libremente en las partes blandas de la pared del tronco (Pérez Casas A y Bengoechea M. E. , 1978). La forma de las costillas varía según los diferentes niveles. Las más típicas son de la 3ª a la 9ª. Su longitud aumenta de la 1ª a la 7ª para disminuir posteriormente hasta la 12ª. En cada una se pueden distinguir extremo posterior, cuerpo y extremo anterior. En el extremo posterior han de considerarse cabeza, cuello y tuberosidad costal. La cabeza de cada costilla (salvo las dos últimas) se articula con dos cuerpos vertebrales contiguos y el disco intervertebral correspondiente. El cuerpo es en conjunto curvo, cóncavo hacia dentro, pudiendo apreciar en el mismo un arco anterior, otro medio y otro más posterior.

El borde superior es romo, mientras que el inferior es agudo, con un surco en su cara interna para los vasos y el nervio intercostales. Su extremo anterior es irregular, para unirse con el cartílago costal correspondiente. Existen diferencias entre las costillas. La primera es la más corta y ancha. La cara superior presenta un relieve (tubérculo de Lisfranc) para la inserción del escaleno anterior. Detrás del tubérculo existe un surco por donde pasa la arteria subclavia. En esta primera costilla se insertan de atrás hacia delante los músculos escaleno medio, escaleno anterior y la primera digitación del serrato anterior. En la segunda costilla se insertan los músculos escaleno posterior y digitaciones del serrato anterior (Netter F. H., 1984).

5.1.2.3.- Espacios intercostales

De gran importancia en la fisiología del tórax y desde el punto de vista quirúrgico, al constituir la vía de acceso más frecuente en la cirugía intratorácica. Cada espacio intercostal presenta tres planos musculares. Las fibras del intercostal externo son oblicuas hacia abajo y hacia delante (Figura 1). En su porción anterior, hasta alcanzar el esternón, las fibras musculares son sustituidas por una fascia. Las fibras musculares del intercostal interno llevan una oblicuidad opuesta y su porción posterior está sustituida igualmente por una fascia. Entre ambos músculos se encuentra el intercostal medio (Blevins Ch. E., 1994).

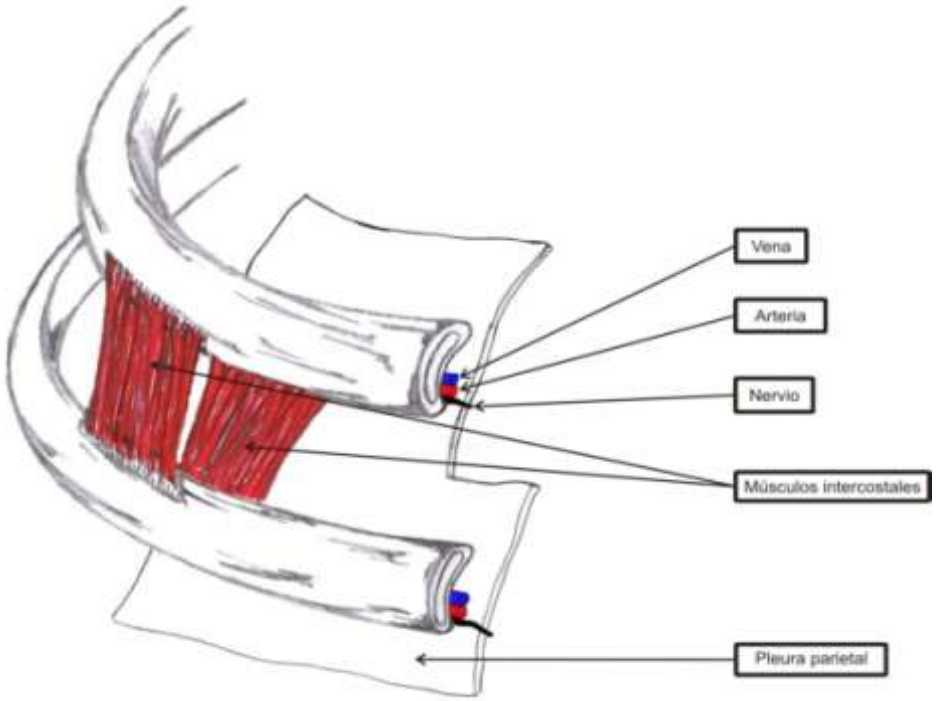


Figura 1. Anatomía del espacio intercostal. Se muestran las fibras del músculo intercostal externo e interno. El paquete neurovascular (vena, arteria y nervio) discurre por el borde inferior de cada costilla. Fuente: modificado de Martín Escribano *et al*. (2005). Pag: 16.

El paquete neurovascular discurre por dentro del plano muscular, en relación con el borde inferior de cada costilla, disponiéndose de arriba abajo la vena, la arteria y el nervio (Figura 1). Durante el abordaje quirúrgico, toracocentesis, etc., debe accederse sobre el borde superior de la costilla, a fin de evitar la lesión de esas estructuras neurovasculares.

Por dentro del intercostal interno, en la pared anterior del tórax, se encuentra el músculo triangular del esternón. Se trata de un músculo sumamente fino. Su aponeurosis se extiende diagonalmente hacia arriba, desde el cuerpo del esternón y la apófisis xifoides a los cartílagos costales de tercero a sexto. Sus fibras inferiores se continúan con el transverso de la pared abdominal (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.1.2.4.- Fascia endotorácica

Por dentro del plano muscular se encuentra la fascia endotorácica, quirúrgicamente importante por constituir «un plano de clivaje» con la pleura parietal subyacente.

5.1.2.5.- Vasos intercostales

Las dos primeras arterias proceden de la arteria subclavia, mientras que las siguientes proceden directamente de la aorta torácica. Las venas intercostales drenan los espacios hacia la ácigos y hemiácigos. El drenaje linfático de la pared torácica se dirige a los ganglios dispuestos siguiendo las arterias intercostales. La linfa procedente de los ganglios intercostales altos drena en el conducto torácico, mientras que la de los espacios inferiores lo hace en la cisterna de Pecquet.

5.1.2.6.- Nervios intercostales

La inervación de la pared torácica se realiza por los nervios intercostales, 12 pares de nervios espinales. Los superiores alcanzan la axila y la extremidad superior. Los inferiores aportan inervación a la pared abdominal (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2 Traumatismos torácicos

La frecuencia de los traumatismos aumenta progresivamente, siendo la tercera causa de mortalidad global y la primera en sujetos menores de 40 años. El incremento de lo accidentes de tráfico es su principal origen. Como los traumatismos torácicos aislados son poco frecuentes deben entenderse en el contexto de un

politraumatismo (Paris F. y García-Zarza A., 1988; Battistella F. y Benfield J. R., 1994; Rochon R. B. *et al*, 1994; Shields T. W. y Vanecko R. M., 1994).

5.2.1.- Etiopatogenia

Las causas más frecuentes de traumatismo son: 1) los accidentes de tráfico, que constituyen el 70% de las mismas; 2) las agresiones por arma blanca y arma de fuego, y 3) los aplastamientos y el impacto de ondas expansivas o elementos diversos. En los accidentes de tráfico, el tórax resulta lesionado en el 25% de los casos, con menor frecuencia que las extremidades (34%) y la cabeza y el cuello (32%), y mayor que el abdomen (15%).

Los mecanismos de producción de las lesiones son fundamentalmente tres:

1. *Aceleración y desaceleración*, típico de los accidentes de tráfico. Es el mecanismo más común. Las lesiones se producen por la diferente inercia de los órganos ante los cambios bruscos de velocidad.

2. *Compresión directa*, donde la fuerza aplicada (aplastamiento, onda explosiva) vence la resistencia de la caja torácica.

3. *Impacto de elementos a gran velocidad* (proyectiles de armas de fuego). Aquí, el agente traumático transfiere su energía al tórax, muchas veces estático, sobrepasando la resistencia de la zona afecta.

Otros mecanismos menos frecuentes son: impacto de objetos a baja velocidad (p. ej., agresiones con arma blanca), quemaduras, electrocución, etc. Con todo, se puede dar lugar a dos tipos de traumatismos torácicos: cerrados y penetrantes.

5.2.2.- Clasificación

5.2.2.1.- Traumatismo torácico cerrado

El traumatismo torácico cerrado, el más frecuente, ocurre cuando el agente agresor toma contacto con una amplia superficie de la pared del tórax, sin penetrar en su interior. La energía que transmite, sin embargo, es capaz de producir lesiones internas. Atendiendo a la clasificación de Wilson y Hall (Tabla II) este tipo de traumatismo puede dividirse en grados, con orden creciente de gravedad, en base a cuatro parámetros: lesión determinada, estado del parénquima pulmonar, gasometría y función respiratoria. Cada uno de los síntomas o signos que aparece tiene valor pronóstico, relacionándose la gravedad con la edad del paciente y su inclusión en los grupos III y

IV, que presentan lesiones torácicas bilaterales cuya mortalidad puede alcanzar el 50%. En los grupos I y II, la mortalidad es inferior al 2%.

5.2.2.2.- Traumatismo torácico penetrante.

En el traumatismo torácico penetrante, el impacto se produce en una superficie mucho menor, determinando una solución de continuidad en la pared torácica. Suele ocurrir por herida de arma blanca o arma de fuego.

Tabla II. Traumatismos torácicos cerrados.
Fuente: Martín Escribano *et al.* (2005). Pag: 1216.

Traumatismos torácicos cerrados. Clasificación de Wilson y Hall (1979)				
Grado	***I***	***II***	***III***	***IV***
Lesión mecánica	Fractura única	Fracturas múltiples Hemotórax Neumotórax	Inestabilidad parietal Hemotórax Neumotórax	Hemotórax Neumotórax bilateral
Estado del parénquima	No lesión	Atelectasia segmentaria Edema en 48-72 horas	Contusión pulmonar Edema en 24 horas	Contusión pulmonar severa Edema en 6 horas
Gasometría P_aO_2 P_aCO_2	80-100 35-45	70-80 50	60-80 45-55	30-40 50-60
Función respiratoria	Normal	Retención de CO_2 Discreta hipoxia	Retención progresiva de CO_2 Hipoxia	Cortocircuito pulmonar masivo

5.2.3.- Epidemiología

Los traumatismos suponen la tercera causa de mortalidad global y la primera en sujetos menores de 40 años (Calvo V. *et al*, 2000).

En Estados Unidos, el 30,6% de los pacientes con traumatismos recogidos en 60 hospitales presentaban afecciones torácicas. El 20% de todos los fallecimientos

postraumáticos se debe a lesiones torácicas, lo que supone también en los Estados Unidos unas 16.000 muertes por año. Los traumatismos torácicos son responsables directos del 12% de los fallecimientos por accidente de tráfico.

El 75% de los traumatismos torácicos son no penetrantes, presentando el resto lesiones penetrantes. En los traumatismos torácicos cerrados las fracturas costales son las lesiones más frecuentes (con una incidencia de 38,7%) y un indicador de la severidad del trauma (Sirmali M. *et al*, 2003). Algunos autores (Trunkey D. , 1986), reflejan la dificultad en determinar la verdadera incidencia de fracturas costales puesto que el 50% de las fracturas costales pueden pasar desapercibidas en una radiografía torácica estandar. Sin embargo, Ziegler y Agarwal informan que al menos el 10% de las admisiones hospitalarias por traumatismo no penetrante evidencian fracturas costales (Ziegler D. W. y Agarwal N. N., 1994). Las fracturas costales pueden ser también indicadoras de una lesión en un órgano sólido. La presencia de fracturas costales incrementa en 1.7 y 1.4 veces la incidencia de lesión esplénica y hepática respectivamente (Lee R. B. *et al*, 1990). Además, el 50% de los pacientes con lesión cardiaca no penetrante, presentan fracturas costales (Healey M. A. *et al*, 1990). En la mayoría de los casos, se fracturan de 4 a 9 costillas.

Por otro lado, las fracturas de las costillas superiores (1ª y 2ª costilla) normalmente conllevan un trauma severo complicado con lesiones de grandes vasos. Las fracturas de las costillas inferiores (9ª a 12ª costilla) pueden resultar en la laceración del bazo, el hígado o los riñones (Shorr R. M. *et al*, 1987; Harris G. J. y Soper R. T., 1990).

Uno de los principales problemas que provocan es el dolor torácico, que puede retrasar mucho la recuperación del paciente y asociarse a una mayor morbilidad y mortalidad (Holcomb J. B. *et al*, 2003; Sirmali M. *et al*, 2003). Pacientes mayores de 45 años con más de 4 fracturas costales presentan un mayor riesgo de permanecer más tiempo en la unidad de cuidados intensivos (UCI), estar más días con ventilación asistida y más días de hospitalización (Holcomb J. B. *et al*, 2003). Según diversos autores, el número de costillas fracturadas es un indicador de gravedad fiable y se relaciona directamente con la morbilidad y mortalidad, tanto por causas torácicas, como extrapulmonares (Sirmali M. *et al*, 2003; Flagel B. T. *et al*, 2005). La relación entre el número de fracturas costales y las complicaciones pulmonares es variable (Flagel B. T. *et al*, 2005). Cuando analizamos la mortalidad y morbilidad asociada al número de fracturas costales se deben tomar en cuenta multitud de variables. Estas incluyen la edad, otras lesiones torácicas, lesiones extratorácicas, y el tipo de analgesia. Es difícil interpretar la incidencia exacta sobre la morbilidad y mortalidad de las fracturas costales por si mismas sin tener en cuenta los efectos sinérgicos con estos otros factores.

Los resultados observados por Flagel *et al*. apoyan la idea de que cuando la energia cinética que soporta la pared costal es suficiente como para fracturar más de 5 costillas; el objeto (el volante de un coche o la puerta del copiloto) y la fuerza, no estarán limitados a la pared torácica sino que lesionarán el resto del tronco superior (Flagel B. T. *et al*, 2005). Los datos en estos estudios sugieren que los médicos deberían predecir un mayor riesgo de lesiones asociadas en pacientes que presentan más de 5 fracturas costales, debiendo considerarse el tratamiento en un centro con servicio de Cirugía Torácia y Traumatología. En relación a esto, otros autores sugieren además que el número de fracturas costales debería ser un criterio de selección para trasladar al paciente a un centro con estos servicios (Lee R. B. *et al*, 1990). Así mismo, se han realizado estudios (Lee R. B. *et al*, 1989), que demuestran que el número de fracturas costales es usado como criterio de selección para decidir la hospitalización de pacientes en la población estudiada. Pacientes con 3 o más fracturas costales cumplieron más criterios de selección (en un 93%, estadísticamente significativo) para su hospitalización y control de su sintomatología (Lee R. B. *et al*, 1989). Sin embargo en niños, el número de fracturas costales, es un indicador confuso de la severidad del trauma. Esto es debido a que las costillas en los niños son más flexibles comparadas con las de un adulto, por lo que las consecuencias de un traumatismo torácico pueden ser diferentes en niños que en adultos. En niños, un traumatismo simple puede lesionar una víscera intratorácica (Ceran S. *et al*, 2002).

5.2.4.- Clínica y diagnóstico

5.2.4.1.- Evaluación inicial y exploración física

Las medidas iniciales deben ir encaminadas al diagnóstico y tratamiento precoz del paciente, con especial atención a la permeabilidad de la vía aérea, la función cardiovascular y el nivel de conciencia, estableciendo la terapéutica adecuada para la profilaxis del shock. Cuando el estado clínico del paciente lo permita, se ha de intentar establecer el mecanismo traumático, que orienta hacia el tipo de lesiones que pueden encontrarse. Tras la exploración inicial del paciente (evaluación de la frecuencia cardiaca, tensión arterial, frecuencia y amplitud de los movimientos respiratorios), ha de llevarse a cabo la exploración específica del tórax.

Se observará el estado de la pared torácica, buscando lesiones o heridas que serán exploradas cuidadosamente: orificios de entrada y salida, hemorragia a su través, presencia de cuerpos extraños, amplitud y simetría de los movimientos torácicos (limitados en el lado de la lesión), movimiento paradójico de alguna zona de la pared (volet costal) y estado de las venas del cuello. En caso de enfisema subcutáneo se puede palpar crepitación, y en caso de fracturas múltiples movilidad anormal de la pared.

La transmisión de las vibraciones vocales disminuye cuando se ha producido un neumotórax o si hay ocupación líquida de la cavidad pleural; en este último caso la percusión es mate, pudiendo determinar el nivel que alcanza el derrame. A la auscultación, hay roce pleural si se trata de un derrame inicial, y el murmullo vesicular está disminuido e incluso abolido según sea la cuantía del derrame. Los tonos cardiacos se encuentran apagados en el taponamiento cardiaco (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.4.2.- Procedimientos diagnósticos

5.2.4.2.1.- Pruebas de imagen

- *Radiografía de tórax*

Se debe realizar en todo traumatizado, salvo que presente lesiones cutáneas mínimas. La contusión pulmonar, que implica generalmente hemorragia intersticial o alveolar por traumatismo no penetrante, da lugar a una imagen de infiltrado alveolar que aparece a las pocas horas del traumatismo, con desarrollo progresivo, que no corresponde a una localización anatómica definida y que desaparece en pocos días, dependiendo de su intensidad. Si se asocia a fractura costal, suele localizarse por debajo de ella. Generalmente es periférica y en ocasiones puede ocupar un pulmón entero.

Cuando se produce una laceración pulmonar, la lesión del parénquima puede no ser visible en la radiografía inicial por ocupación hemática de la cavidad pleural. Cuando ésta se resuelve puede apreciarse una cavidad llena de aire (neumatocele) o de sangre (hematoma). El hematoma puede cavitarse, disminuir de tamaño o permanecer inalterado durante meses.

En el neumotórax se aprecia hiperclaridad, con ausencia de trama pulmonar, aunque el diagnóstico radiológico puede estar dificultado en caso de enfisema subcutáneo importante. Los neumotórax pequeños pueden pasar desapercibidos en una radiografía en inspiración, y ponerse de manifiesto en una realizada en espiración: dato importante cuando el paciente va a ser intubado y sometido a ventilación mecánica. El neumotórax a tensión se caracteriza por desplazamiento mediastínico contralateral, con depresión diafragmática y ensanchamiento de los espacios intercostales. La existencia de una colección líquida en el espacio pleural, habitualmente hemática, provoca una imagen radiológica de opacidad, con ausencia de broncograma aéreo, que sobrepasa las cisuras sin borrarlas (a diferencia de los infiltrados) y que se inicia en el seno costofrénico posterior. Si el derrame es masivo, el mediastino se desplaza hacia el lado opuesto, a diferencia de lo que ocurre en las atelectasias.

En las fracturas costales (Figura 2), la imagen radiológica varía desde la fisura hasta la complejidad de las fracturas conminutas, cuyos fragmentos desplazados pueden lesionar el parénquima subyacente. Pueden no ser visibles cuando se trata de pequeñas

fracturas en los primeros días después del traumatismo. Ha de valorarse asimismo la posibilidad de una lesión diafragmática, que da lugar a la presencia de burbujas aéreas en la cavidad torácica (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

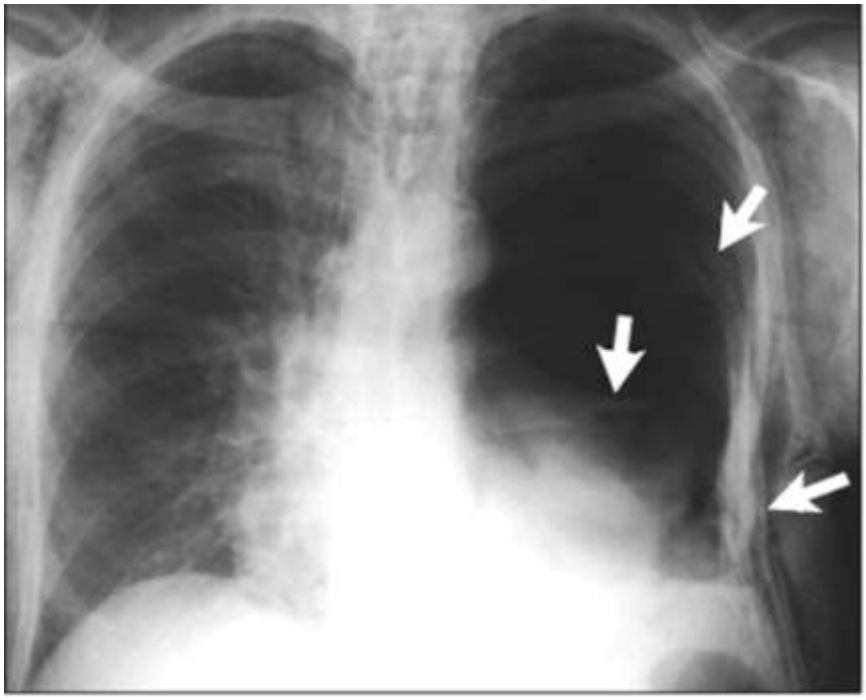


Figura 2. Fracturas costales izquierdas con neumotórax y enfisema subcutáneo.
Fuente: Martín Escribano *et al.* (2005). Pag: 1219.

- *Ecografía*

Indicada especialmente para concretar la naturaleza de una opacidad previamente visualizada en la radiografía dudosa por alguna característica especial, como es el caso de la existencia previa al traumatismo de adherencias pleurales; e indicada también para el diagnóstico del taponamiento pericárdico.

- *Tomografía axial computarizada*

Es el medio diagnóstico más fiable para evaluar el estado del parénquima pulmonar y de la cavidad pleural, así como de las estructuras mediastínicas, permitiendo una rápida clasificación y cuantificación de las lesiones torácicas. Su utilidad está limitada fundamentalmente por la situación clínica del paciente y en determinados casos por la disponibilidad hospitalaria.

5.2.4.2.2.- Broncoscopia

En la actualidad, las indicaciones de la endoscopia bronquial abarcan casi la totalidad de la patología respiratoria, con contraindicaciones prácticamente inexistentes (Ikeda S, 1974; Castella J. y Puzo Mª. C, 1982; Prakash UBS., 1993; Baldeyrou P., 2000). Los perfeccionamientos en la fabricación de broncoscopios (rígidos y flexibles) y en los métodos de anestesia (local con o sin sedación, general) aumentan continuamente las posibilidades de la broncoscopia y mejoran su tolerancia (Colt H. G. *et al*, 2000).

Sobre todo indicada en caso de hemoptisis, para localizar el nivel de la hemorragia y aspirar el contenido hemático, y en caso de traumatismo penetrante en la línea medioclavicular sobre todo si se observa emisión de aire, a fin de descartar una lesión de la vía aérea (Feinsilver SH y Fein AM, 1995; Honeybourne D. *et al*, 2001).

5.2.4.3.- Manifestaciones clínicas y diagnóstico

Por orden de frecuencia, las lesiones que se producen en un traumatismo torácico asientan en:

1) *La pared torácica* (50-70%); del 10% al 25% de ellas son traumatismos menores, un 34-35% son traumatismos mayores, y del 5% al 13% provocan un tórax inestable.

2) *Los pulmones* (20%); produciéndose neumotórax en el 20% de las ocasiones, y hemotórax en otro 20%.

3) *Otras estructuras intratorácicas* (18-20%); entre éstas, el corazón (7-9% de los casos), el diafragma (7%), el esófago (0,5-7%), la aorta y los grandes vasos (4%).

5.2.4.3.1.- Traumatismos de pared torácica

5.2.4.3.1.1. Fracturas costales

La lesión más frecuente es la fractura costal, que ocurre casi siempre en adultos, en los que tanto las costillas como los cartílagos costales han perdido elasticidad. El número de fracturas, el grado de desplazamiento y la lesión asociada de órganos internos dependen del lugar, la dirección y la fuerza del impacto. De este modo, las dos primeras costillas se fracturan en muy pocas ocasiones, al estar protegidas por la cintura escapular, y cuando ello ocurre se trata, generalmente, de un traumatismo muy grave acompañado con frecuencia de lesiones vasculares, traqueales o del plexo braquial. La

fractura de las costillas flotantes es también poco frecuente; cuando se produce hay que descartar la coexistencia de lesiones abdominales, hepáticas o esplénicas.

Clínicamente, las fracturas por si mismas son dolorosas, lo que conducen a una insuficiencia pulmonar secundaria y una convalecencia prolongada (Ziegler D. W. y Agarwal N. N., 1994). El dolor asociado a las fracturas costales incide negativamente sobre la función ventilatoria y aumenta la morbilidad pulmonar (Bulger E. M. *et al*, 2004). Este dolor puede ser más debilitante y perjudicial que la propia lesión por si misma (Mayberry J. C. *et al*, 2003). El dolor limita la capacidad para toser y respirar profundamente, ocasionando una retención de esputos, atelectasia, y una reducción de la capacidad funcional residual. Estos factores sucesivamente producen una disminución de la compliancia (distensibilidad) pulmonar, un desequilibrio entre ventilación/perfusión, hipoxemia, y dolor pleurítico. El hecho de no controlar el dolor, complicado con la presencia de contusión pulmonar, segmento móvil del arco costal afecto y otras lesiones, puede ocasionar graves complicaciones respiratorias (Karmakar M. K. y Ho A. M., 2003). Su diagnóstico se basa fundamentalmente, en la exploración clínica, con dolor a la palpación, y en la radiografía de tórax.

5.2.4.3.1.2. Tórax inestable

El tórax inestable o «volet costal» se produce cuando el traumatismo determina que un sector de la pared torácica pierda su continuidad con el resto de la caja torácica. Los «volets» de localización anterior o lateral son los más graves, dada su repercusión fisiopatológica. Desde el punto de vista clínico, aparece una respiración paradójica, en la que el segmento de pared independizado funcionalmente del resto se desplaza hacia dentro durante la inspiración y hacia fuera durante la espiración. El diagnóstico se basa en la radiografía de tórax y, sobre todo, en la exploración del paciente (con inspección y palpación del tórax), así como en la repercusión funcional que provoca y que se puede establecer mediante gasometría arterial (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.4.3.1.3. Fractura de esternón

La fractura de esternón no es frecuente, pero cuando se produce puede llevar asociadas lesiones de órganos intratorácicos como la aorta ascendente, vasos mamarios internos, cava superior y corazón. Clínicamente aparece un dolor transfixiante en la zona esternal, que aumenta con la palpación, pudiendo producirse también una deformidad en escalón. En el caso de fracturas costales asociadas se puede producir un gran volet anterior. El diagnóstico se basa en la radiografía lateral del tórax (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.4.3.2.- Lesiones pleuropulmonares

5.2.4.3.2.1. Contusión pulmonar

La contusión pulmonar se suele producir por un mecanismo de desaceleración o por impacto directo sobre la caja torácica. La fuerza traumática se transmite a los órganos intratorácicos, y entre ellos a los pulmones, ocasionando un aumento de la presión intrapulmonar que da lugar a hemorragia y edema intersticial, con alteración subsiguiente de la barrera alveolo-capilar. El colapso capilar determina un aumento de la resistencia vascular pulmonar con fallo cardiaco derecho, y el colapso alveolar un aumento de las resistencias aéreas. Todo ello condiciona insuficiencia respiratoria, con hipoxemia e hipercapnia. Clínicamente aparece también hemoptisis. El diagnóstico se basa en la radiografía de tórax y en la broncoscopia. En la radiografía se puede observar condensación pulmonar en parches, que en el 70% de los casos aparece a la hora del traumatismo. La precocidad de aparición de la imagen la diferencia de otras patologías como el distrés, la atelectasia o la neumonía (Martín Escribano P. *et al,* 2005).

5.2.4.3.2.2. Neumotórax traumático

El neumotórax traumático puede ser de origen diverso: herida pulmonar causada por un fragmento de costilla fracturada, aumento de presión alveolar con la glotis cerrada y, menos frecuentemente, rotura traqueobronquial o esofágica. El neumotórax puede ser parcial, a tensión, abierto, o cursar con enfisema subcutáneo o mediastínico. El neumotórax a tensión se produce por mecanismo valvular; el aire entra en la cavidad pleural durante la inspiración (desde el pulmón lesionado o desde el exterior si hay solución de continuidad en la pared torácica), y no sale en la espiración, provocando un colapso pulmonar creciente que acaba por desplazar el mediastino y colapsar el pulmón opuesto. Se llega así a la insuficiencia respiratoria y la disminución del retorno venoso. En el neumotórax abierto el aire entra en la cavidad pleural (a través de la brecha parietal) durante la inspiración y sale durante la espiración, con lo cual se altera también la mecánica del pulmón contrario, sobre todo cuando el diámetro de la herida torácica supera al de la laringe. En la clínica, según el grado y el tipo de neumotórax, puede aparecer desde dolor e insuficiencia respiratoria leve hasta insuficiencia respiratoria grave que pone en peligro la vida del paciente. El diagnóstico también se basa en la radiografía de tórax, en inspiración y espiración forzadas (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.4.3.2.3. Hemotórax traumático

El hemotórax traumático es una hemorragia en la cavidad pleural que ocurre en mayor o menor grado en casi todos los traumatismos torácicos diagnosticados. Oscila desde unos pocos mililitros, no visibles en la radiografía de tórax, hasta la ocupación

pleural masiva. Aunque la hemorragia puede provenir de cualquier estructura intratorácica, el origen más frecuente es la lesión de los vasos intercostales en los traumatismos cerrados y de los mamarios internos en los penetrantes. Suele asociarse a neumotórax (hemoneumotórax). El curso clínico va desde la ausencia de síntomas hasta el shock hipovolémico y la insuficiencia respiratoria. El diagnóstico también se realiza por estudios radiológicos (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.4.3.2.4. Traumatismos de tráquea y bronquios

Aunque su frecuencia no es fácil de establecer porque los pacientes pueden fallecer antes de llegar al hospital, parece que no es elevada. Generalmente se producen por traumatismos cerrados, siendo la teoría más aceptada el aumento de presión en las vías aéreas con la glotis cerrada en el momento del impacto. El aplastamiento del tórax tiende a separar los pulmones, lo cual determina el desgarro del bronquio. Las lesiones, más bien transversales, se localizan generalmente a unos 2,5 cm de la carina. En la tráquea, la lesión se suele localizar a nivel cervical. En los bronquios, se lesionan con más frecuencia los principales que los lobares. En caso de comunicación con la cavidad pleural, se asocia neumotórax importante con síncope. La colocación de un tubo endopleural y la aspiración a su través, determina a veces mayor disnea, cianosis y hemoptisis. El enfisema (mediastínico y subcutáneo) es con frecuencia importante y la ventilación se ve comprometida. En ocasiones, los tejidos peribronquiales mantienen la continuidad de la vía aérea, pudiendo la cicatrización ulterior determinar estenosis parciales o completas. El diagnóstico se basa en la radiografía de tórax con enfisema subcutáneo, mediastínico, a veces asociado a fractura de las primeras costillas. La broncoscopia es la prueba definitiva, aunque no todas las lesiones son visibles: así, sólo el 30% se diagnostica en las primeras 24 horas, el 50% en el primer mes y un 15% no es diagnosticado hasta los seis meses del traumatismo (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.4.3.2.5. Traumatismos del corazón y grandes vasos

Los dos mecanismos más frecuentes de producción son las heridas penetrantes y los accidentes de tráfico, con impacto contra el volante. En las heridas penetrantes, el 50% de los pacientes con lesión cardiaca llegan vivos al hospital, ya que el taponamiento que ocasiona el hemopericardio puede evitar la exanguinación. En el segundo caso, las lesiones más frecuentes son contusión miocárdica, rotura aórtica y rotura auricular. Clínicamente, los traumatismos cardiacos producen desde síntomas leves, como arritmias, hasta cuadros de taponamiento grave o exanguinación; es muy típica la tríada de Claude Beck con hipotensión refractaria a la administración de líquidos, aumento de la presión venosa central y tonos cardiacos apagados. Los traumatismos de la aorta suelen ser mortales por hemorragia masiva; sólo un 10% de los pacientes llega vivo al hospital. El diagnóstico de sospecha es fundamental, con la advertencia de arritmias en caso de contusión cardiaca y con la exploración del trayecto

seguido por el agente traumático en caso de heridas penetrantes. El electrocardiagrama y la determinación sérica de enzimas son muy similares a los de un infarto de miocardio. El ecocardiograma se utiliza para diagnosticar los casos de hemopericardio. La radiografía de tórax puede mostrar ensanchamiento mediastínico. La pericardiocentesis es diagnóstica en los casos de hemopericardio y la angiografía en las rupturas aórticas (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.4.3.2.6. Traumatismos del diafragma

Son más frecuentes en el lado izquierdo, con herniación de vísceras abdominales (estómago, bazo y colon) al tórax. Se suelen acompañar de fracturas costales. La clínica incluye insuficiencia respiratoria y síntomas digestivos. En el diagnóstico es fundamental la sospecha clínica, ya que muchos pacientes se diagnostican tardíamente. Radiológicamente, se puede observar elevación del hemidiafragma, irregularidad en su silueta y movimiento paradójico (en la fluoroscopia). El tránsito esofagogástrico y el enema opaco confirman el diagnóstico (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.4.3.2.7. Traumatismos del esófago

Son poco frecuentes y generalmente yatrogénicos, en el curso de una exploración endoscópica. Aunque pueden presentarse también en heridas cervicales, tras ingestión de cuerpos extraños o en el curso de dilataciones para tratamiento de estenosis previas. Si son asintomáticos en el inicio, desarrollan posteriormente un cuadro clínico de mediastinitis aguda con enfisema mediastínico y cervical, neumotórax o hidroneumotórax. El diagnóstico se basa en la exploración radiográfica con contraste no baritado, si bien otros métodos complementarios, como la tomografía axial computarizada (TAC), pueden ser de ayuda.

En resumen, sean cuales sean las lesiones que acontezcan, los trastornos fisiopatológicos que ocurren en un paciente con traumatismo torácico llevan (en los casos graves) a un deterioro de la perfusión tisular, con hipoxia y acidosis metabólica, debido tanto a alteraciones de la ventilación pulmonar como de la función cardiovascular (Figura 3).

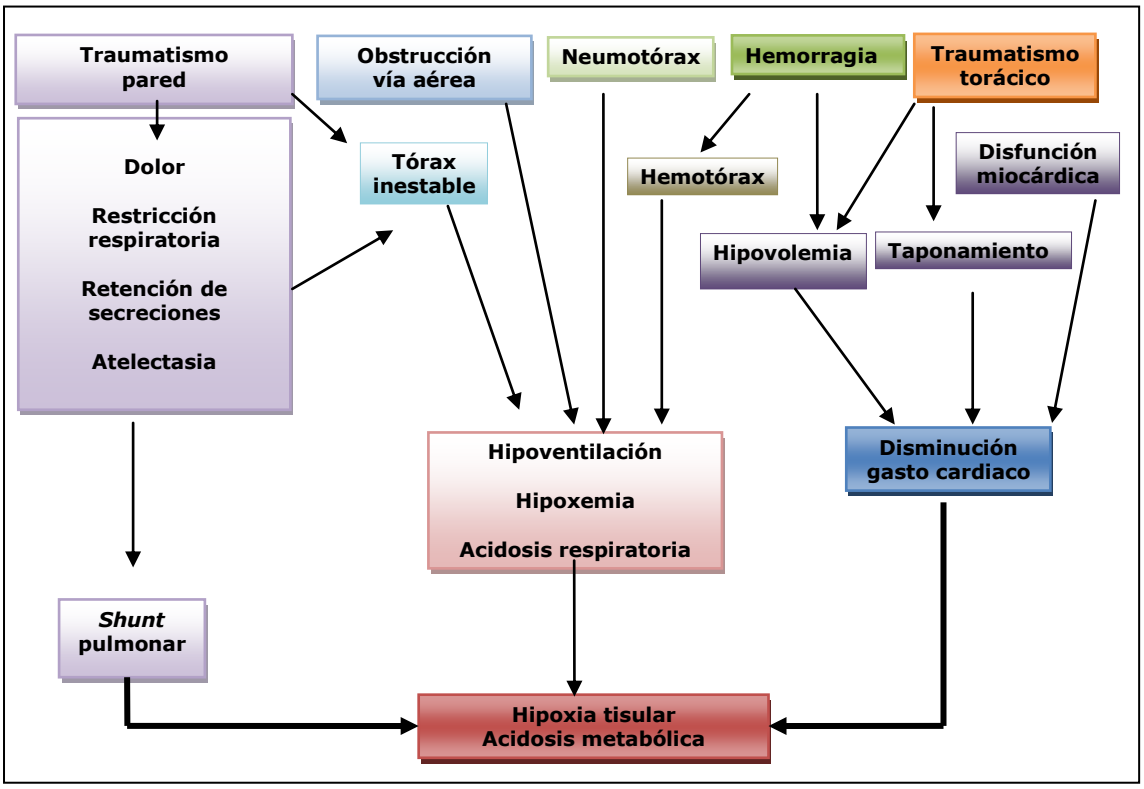


Figura 3. Fisiopatología respiratoria en traumatismos torácicos.
Fuente: Modificado de Martín Escribano *et al*. (2005). Pag: 1224.

5.2.5.- Tratamiento

El tratamiento actual de las fracturas costales es sintomático y se basa en el uso de analgésicos, la fisioterapia respiratoria y el tratamiento específico de las lesiones asociadas (Middleton C. *et al*, 2003), además de la evacuación de las secreciones pulmonares (Bulger E. M. *et al*, 2004). Hoy en día, la intubación traqueal y la ventilación mecánica en la UCI son sólo usadas selectivamente en pacientes con traumatismo torácico no penetrante.

El principio básico del tratamiento es conseguir un alivio efectivo del dolor. Las técnicas de analgesia para fracturas de múltiples arcos costales son el bloqueo intercostal, torácico paravertebral, epidural e intratecal, usando anestésicos locales con o sin opioides, u opioides vía sistémica y analgésicos orales (Karmakar M. K. y Ho A. M., 2003). A pesar del procedimiento invasivo, los bloqueos regionales tienden a ser más efectivos y deprimen menos el sistema nervioso central y el reflejo de la tos, pero necesitan una mayor experiencia para su utilización como terapia, ya que producen molestias en el paciente durante la producción del bloqueo y tienen otras potenciales complicaciones serias. Las fracturas costales se tratan en la mayoría de los casos sólo con analgésicos intravenosos y orales incluyendo narcóticos y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Mayberry J.C. y Trunkey D.D. , 1997).

En fracturas de múltiples arcos costales si está indicada la analgesia epidural con buenos resultados (Karmakar M. K. y Ho A. M., 2003; Bulger E. M. *et al*, 2004). La analgesia epidural provee un mayor alivio del dolor y mejora las pruebas de función pulmonar cuando se compara con la administración de opioides intravenosos en pacientes con fracturas costales (Mackersie R. C. *et al*, 1991; Moon M. R. *et al*, 1999; Wu C. L. *et al*, 1999). Bulger *et al*. demostraron que la analgesia epidural, cuando es factible, mejora los resultados en pacientes con dolor en la pared torácica asociado a fracturas costales múltiples. Sin embargo, el uso de esta terapia se limitó a pacientes con lesiones asociadas a las fracturas costales en la población estudiada (Bulger E. M. *et al*, 2004).

En los casos que presentan insuficiencia respiratoria y volet costal esta indicada la ventilación mecánica (Dittmann M. *et al*, 1982; Holcomb J. B. *et al*, 2003). Se están desarrollando nuevas terapias para fracturas costales (Sing R. F. *et al*, 2002) y varios estudios han informado que la fijación quirúrgica es efectiva para estabilizar la pared torácica (Ahmed Z. y Mohyuddin Z., 1995; Tanaka H. *et al*, 2002). Apoyando a esta idea, Kerr-Valentic *et al*. (Kerr-Valentic M. A. *et al*, 2003) evaluaron la morbilidad de las fracturas costales con evaluaciones seriadas del dolor, un estudio de incapacidad, y un recuento de días perdidos por no asistir al trabajo o no desarrollar la actividad diaria cotidiana. Su estudio se apoya en anticipar que el tratamiento quirúrgico de las fracturas costales podría justificarse basándose en una recuperación más rápida de estos pacientes. Estos investigadores confirman en su estudio, que las fracturas costales son una causa significativa del dolor postraumático y de la incapacidad, en pacientes cuyas fracturas son su lesión primaria y en muchos pacientes con otras lesiones graves. Concluyen diciendo que el manejo usual no quirúrgico de las fracturas costales no facilita el alivio del dolor o la rápida recuperación de la actividad normal.

Por otor lado, la utilización simultánea de fijación costal con faja no ha demostrado tener efectos beneficiosos consistentes, por lo que no se usa (Norcross K., 1980; Lazcano A. *et al*, 1989; Quick G., 1990).

En relación con la diversidad y disparidad en la idoneidad del tratamiento aplicado y según los resultados obtenidos en los estudios de Karmakar *et al*. (Karmakar M. K. y Ho A. M., 2003), es difícil recomendar un método único que pueda ser utilizado con seguridad y eficacia bajo todas las circunstancias en pacientes con fracturas múltiples de arcos costales. Por ello, el médico valorará de cada técnica las ventajas e inconvenientes, los beneficios y riesgos; y el manejo del dolor se realizará de forma individualizada basándose en el escenario clínico y la extensión del trauma (Karmakar M. K. y Ho A. M., 2003).

En la actualidad, no existe un tratamiento eficaz que altere la incapacidad funcional que producen durante varios meses y que supone un importante coste hospitalario, farmacéutico, laboral y social. El desarrollo de nuevas estrategias para tratar pacientes con fracturas costales que alivien el dolor y reduzcan esta incapacidad, podría conducir a un gran beneficio no sólo individual para cada paciente implicado sino también para toda la sociedad en su conjunto (Kerr-Valentic M. A. *et al*, 2003). Aunque todo traumatizado torácico grave ha de ser tratado según el tipo de lesiones que presenta, no hay que olvidar que la mayoría sufre un politraumatismo. De ahí que el tratamiento vaya dirigido, en una primera fase, a la atención prehospitalaria y, en una segunda, a la atención hospitalaria. Los objetivos: 1) salvar la vida, 2) limitar y reparar las lesiones, y 3) aliviar los síntomas.

5.2.5.1.- Atención prehospitalaria

En la primera fase, el factor que más influye en la supervivencia del paciente es el tiempo de traslado al hospital para su atención definitiva. El segundo factor, la gravedad de las lesiones ocasionadas. En el lugar del accidente, y durante el traslado, hay que atender: a) el control de la vía aérea (*Airway*), b) la eficacia de la respiración (*Breathing*), y c) el estado circulatorio (*Circulation*). Teniendo además que considerar muy especialmente las condiciones del transporte (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.5.2.- Atención hospitalaria

Una vez que el paciente se encuentra en el centro hospitalario, debe ser sometido a una evaluación inicial, completar su estudio, y proceder al tratamiento definitivo de las lesiones (Tabla III).

Tabla III. Fases de evaluación del traumatismo.
Fuente: Martín Escribano *et al*. (2005). Pág: 1224.

Lesiones potencialmente mortales	
Primera evaluación	***Segunda evaluación***
Obstrucción de la vía aérea	Laceración aórtica
Neumotórax abierto	Laceración traqueobronquial
Neumotórax a tensión	Contusión miocárdica
Hemotórax masivo	Desgarro diafragmático
Volet costal	Contusión pulmonar
Lesión-perforación esofágica	
Taponamiento cardiaco	

5.2.5.2.1.- Evaluación inicial

Encaminada a identificar y tratar las posibles lesiones que amenacen la vida; esto es, a conseguir una adecuada situación respiratoria y cardiovascular. Para ello es necesario mantener una vía aérea permeable (mediante intubación o traqueostomía), controlar las posibles hemorragias masivas mediante el aporte líquido suficiente, reexpandir los pulmones (con el drenaje pleural oportuno) si hay neumotórax, estabilizar un tórax inestable llegado el caso y, finalmente, descartar la existencia de un taponamiento cardiaco (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.5.2.2.- Exámenes complementarios

Se realizan una vez estabilizado el paciente en sus constantes vitales. Van dirigidos a confirmar el diagnóstico de sospecha de una lesión torácica determinada, o a excluir otras lesiones. Los métodos que se pueden emplear son, evidentemente, muy diversos. En esta fase, es importante disponer de una historia precisa del accidente, tipo de traslado y estado clínico previo del traumatizado (Martín Escribano P. *et al,* 2005).

5.2.5.2.3.- Tratamiento de las lesiones

El tratamiento definitivo sólo va a ser quirúrgico en el 15% de los casos. La mayoría de las lesiones se resuelve con el tratamiento inicial y con el drenaje pleural.

5.2.5.2.3.1.- Pared torácica

Las fracturas aisladas de las costillas y el esternón no precisan generalmente medidas especiales, siempre que no se produzca una inestabilidad parietal. Se tratan con analgesia, relajantes musculares, fluidificantes (para favorecer la expectoración y evitar atelectasias). La inmovilización está proscrita, pues dificultaría la ventilación, como ya se ha comentado. En caso de volet costal, si el sector parietal afectado es pequeño, el tratamiento es el mismo que el de las fracturas costales. Cuando por su localización o por su tamaño, tiene repercusión respiratoria, se puede tratar teóricamente mediante tracción continua externa, estabilización interna o síntesis quirúrgica. El primer método, que trata de impedir el movimiento paradójico, apenas se utiliza en la actualidad. Como complicaciones asociadas al mismo se han descrito las fracturas en las «costillas de apoyo» y la infección local.

El segundo método, más utilizado, consiste en la intubación traqueal y la ventilación asistida durante cinco a diez días. Los problemas asociados incluyen la necesidad de traqueostomía si la intubación se prolonga, las infecciones respiratorias y la posibilidad de neumotórax yatrogénico.

Por último, la estabilización quirúrgica mediante cualquier tipo de osteosíntesis está indicada en casos muy seleccionados, en pacientes con buen estado general, que presumiblemente no van a necesitar respiración asistida tras la intervención, o bien en pacientes que han de ser intervenidos quirúrgicamente por otra lesión asociada. Las fracturas esternales sólo se intervienen ante la sospecha de un traumatismo cardio-vásculo-pulmonar severo con alteraciones mediastínicas, y cuando, en ausencia de lesiones asociadas, la fractura altera de forma importante la dinámica respiratoria (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.5.2.3.2.- Contusión pulmonar

La hemorragia y el edema que aparecen en las contusiones pulmonares tienden a remitir paulatinamente, salvo que se produzca una sobreinfección o una sobrecarga de líquidos. Cuando la contusión pulmonar se diagnostica en el curso de una intervención quirúrgica, hay que ser conservador en lo que se refiere a la resección del parénquima pulmonar. El tratamiento, una vez hecho el diagnóstico, se basa en la oxigenoterapia por vía intranasal o por ventilación mecánica si la gasometría muestra una PaO_2 inferior a 60 mmHg. Se restituye asimismo el equilibrio hidroelectrolítico, evitando la sobrecarga de líquidos (como ya hemos comentado), y se corrige la anemia en su caso. Es importante además el tratamiento del dolor con la analgesia adecuada, ya que el dolor limita la amplitud de los movimientos respiratorios y dificulta la correcta ventilación. Se suelen administrar corticoides, aunque ello se vea limitado por los efectos secundarios de un uso prolongado. A todo hay que añadir la fisioterapia respiratoria y la aspiración de secreciones capaces de obstruir la vía aérea (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.5.2.3.3.- Neumotórax

Se trata colocando un drenaje pleural conectado a un sistema de sello de agua y, generalmente, con aspiración continua. Se suele colocar en el segundo espacio intercostal o en el quinto, si hay derrame pleural asociado. En el caso concreto de neumotórax a tensión, hay que observar la cantidad de aire que sale por el drenaje, a fin de escartar una lesión traqueobronquial. En estas ocasiones se observa que todo el aire inspirado por el paciente es eliminado a través del tubo, a la par que se observa un ruido de succión procedente de la boca del paciente. Aparece una anoxia grave, acompañando a un enfisema mediastínico que se extiende a la región cervical. Puede ser entonces necesaria la realización de una broncoscopia para localizar la lesión y orientar su corrección quirúrgica. También puede ser necesaria la toracotomía cuando se produce un escape masivo y continuo de aire a través del tubo de drenaje, con falta de reexpansión pulmonar. Por último, en caso de neumotórax abierto, es preciso transformar éste en un neumotórax cerrado, cubriendo la herida y colocar un drenaje pleural (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.5.2.3.4.- Hemotórax

Su tratamiento está basado en el drenaje pleural y la reposición de la volemia. La reexpansión pulmonar puede facilitar el cese de la hemorragia. Sólo se interviene quirúrgicamente cuando por el drenaje se evacúan inicialmente de 1.000 a 1.500 ml o cuando el débito es de más de 200 ml por hora durante 4 horas consecutivas. El hemotórax ha de ser drenado por la importante limitación de la amplitud de movimientos respiratorios que se produce cuando se cronifica, y por la posibilidad de infección (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.5.2.3.5.- Lesiones de tráquea y bronquios

El tratamiento ha de ir dirigido en primer lugar a mantener la oxigenación y una vía aérea permeable. Cuando la lesión se localiza en la tráquea cervical, la corrección quirúrgica ha de ser también por vía cervical. Si se localiza en el tercio medio, se puede intervenir por cervicoesternotomía, y si la lesión asienta en la tráquea torácica, a través de toracotomía derecha.

En el caso de lesiones bronquiales, el abordaje quirúrgico depende de las características de las mismas, aunque incluso el bronquio principal izquierdo puede ser reparado por toracotomía derecha. El método quirúrgico consiste en la sutura primaria de la lesión, con pleuroplastia o mioplastia, y ocasionalmente con traqueostomía asociada. Si el diagnóstico se realiza de forma tardía, puede ser necesaria la resección del sector afecto por la existencia de una estenosis, con reconstrucción del eje bronquial, o la resección pulmonar si el parénquima distal ya no es recuperable (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.5.2.3.6.- Lesiones del corazón y grandes vasos

El tratamiento quirúrgico ha de ser urgente cuando se trata de lesiones penetrantes cardiacas o rotura aórtica. En el primer caso la vía de abordaje es la esternotomía media, o la toracotomía anterolateral izquierda si hay duda diagnóstica. Los puntos de sutura han de ser reforzados con parches que impidan el desgarro, siendo preciso tener en cuenta la vascularización coronaria por si es necesario algún tipo de reparación. Cuando se trata de una rotura aórtica, es preferible intervenir bajo circulación extracorpórea, aunque en determinados casos se puede realizar bajo by-pass parcial y clampaje aórtico. La reparación de la lesión se lleva a cabo mediante sutura término-terminal directa o con interposición de un injerto (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.5.2.3.7.- Rotura del diafragma

Debe ser intervenida en cuanto se diagnostica. Si se trata de un traumatismo reciente, la vía de elección es la abdominal con sutura directa en dos planos, con material irreabsorbible, y tratamiento de las posibles lesiones abdominales asociadas, hecho que ocurre con frecuencia. El abordaje torácico se lleva a cabo en lesiones de diagnóstico tardío, en las cuales ya se han producido adherencias pleurales o cuando hay lesiones torácicas asociadas (Martín Escribano P. *et al*, 2005).

5.2.5.2.3.8.- Lesiones esofágicas

Su tratamiento ha de ser quirúrgico, una vez diagnosticado y estabilizado el paciente. No obstante, el reposo digestivo, la antibioterapia y el drenaje pueden ser eficaces en caso de lesiones mínimas diagnosticadas precozmente (Wisner D. H., 1995).

5.2.6.- Pronóstico

La mortalidad global de los pacientes con traumatismo torácico oscila alrededor del 18%. Entre las causas que la provocan destacan el síndrome de distrés respiratorio del adulto (Watts R.W. y Besson A. , 1991), que consiste en una insuficiencia respiratoria con hipoxemia refractaria al tratamiento con oxígeno a altas concentraciones. Su etiopatogenia es multifactorial, aunque la afectación básica radica en la membrana alveolo-capilar, con edema, aumento de neutrófilos y alteración del surfactante. Clínicamente, cursa con hipoxia y su tratamiento consiste en soporte ventilatorio. Otras complicaciones asociadas a los traumatismos son la atelectasia, la infección respiratoria, el tromboembolismo, las arritmias y el fallo cardiaco.

5.2.7.- Complicaciones

En personas de edad avanzada la mortalidad y morbilidad torácica es el doble que en pacientes jóvenes con lesiones similares. Por cada fractura costal adicional en pacientes de edad avanzada, la mortalidad se incrementa un 19 % y el riesgo de neumonia un 27% (Bulger E. M. *et al*, 2000), sobre todo por las complicaciones respiratorias (Bulger E. M. *et al*, 2000 ; Brasel K. J. *et al*, 2006). No obstante, la mortalidad por neumonia en pacientes traumáticos es controvertida. Aunque existen estudios que presentan un incremento de mortalidad con neumonia asociada al ventilador, en los estudios caso-control realizados no existen diferencias en la mortalidad (Papazian L. *et al*, 1996; Heyland D. K. *et al*, 1999; Cocanour C. S. *et al*, 2005). En el estudio del Dr. Brasel *et al*., la neumonía fue asociada tanto a un incremento de la edad como a la severidad de la lesión (Brasel K. J. *et al*, 2006). Mientras que la neumonía no fue asociada con la mortalidad en pacientes con lesiones

múltiples sí lo fue en pacientes con lesiones torácicas aisladas. El incremento en el número de fracturas costales fue también relacionado con el incremento de mortalidad, especialmente en pacientes con lesiones torácicas aisladas, confirmándose así los descubrimientos de otros (Bulger E. M. *et al*, 2000 ; Bergeron E. *et al*, 2003). Sorprendentemente, en los datos del Dr. Brasel *et al*., el número de fracturas costales no se relaciona con neumonía. En relación a estas diferencias, existen estudios que revelan que un control agresivo del dolor mejora estas lesiones (Wisner D. H., 1990).

Se precisa de un cuidado exhaustivo en aquellos pacientes de edad avanzada con fracturas costales, incluyendo una especial atención en aquellos con comorbilidades asociadas (Cocanour C. S. , 2006).

6.- ULTRASONIDOS

Durante los últimos 50 años se ha hecho un intenso esfuerzo para aumentar la curación de las fracturas utilizando métodos físicos y biológicos (Ziskin M. C., 1987). Los métodos físicos incluyen el uso de estimulación mecánica (Goodship A. E. y Kennwright J., 1985), campos electromagnéticos (Trock D. H., 2000) y los LIPUS. LIPUS es una forma de energía mecánica que se transmite a través y dentro de los tejidos biológicos como una onda de presión acústica y ha sido utilizada ampliamente en medicina como una herramienta diagnóstica y terapéutica (Ziskin M. C., 1987).

En medicina física y rehabilitación (Bly N. N. *et al*, 1993), las intensidades de energía ultrasónica empleadas están en el rango de 1 a 3 W/cm^2. En procedimientos quirúrgicos y en la terapia por hipertermia, los niveles de intensidad van de 5 a más de 4000 W/cm^2 para producir entre otros efectos, ablación e incluso la evaporación de tejidos (Smith N. H. y Hynynen K., 1998). En las aplicaciones de imágenes diagnósticas las intensidades son mucho más bajas, de 0.5 a 50 mW/cm^2 y en la práctica no tienen efectos térmicos (Brown B. S. , 1984).

Diferentes intensidades de ultrasonido (US) pulsátil tienen distintos efectos biológicos sobre los procesos de mineralización *in vitro* (Reher P. *et al*, 1997; Parvizi J. *et al*, 2002; Reher P. *et al*, 2002; Harle J. *et al*, 2001) o *in vivo* (Yang K. H. *et al*, 1996; Lyon R. *et al*, 2003). Los US de intensidades relativamente elevadas (<0.5 W/cm^2) producen un considerable calentamiento en los tejidos vivos (Young S. R. y Dayson M., 1990; Telfah H., 1995) y son utilizados para terapia física y alivio del dolor. En contraste, intensidades bajas [30-120 mW/cm^2 promedio espacial, promedio temporal (*Spatial-Average, Temporal-Average,* SATA)] de US pulsátiles (LIPUS: 200 ms de ráfaga de 1.5-MHz con ondas senoidales repetidas a 1 KHz) son considerados no térmicos y son usados clinicamente como aceleradores de la curación de fracturas (Pilla A. A. *et al*, 1990; Heckman J. D. *et al*, 1994; Azuma Y. *et al*, 2001).

6.1 Concepto e historia

6.1.1.- Concepto

El sonido consiste en vibraciones mecánicas en un medio elástico. Estas ondas sónicas u ondas de presión acústicas se clasifican por su frecuencia en:

- Infrasonidos: ↓ 16 vibraciones x seg. o ↓ 16 Hz.
- Sonidos: entre 16 – 16000 Hz (espectro de sonidos que son captados por ser humano).
- Ultrasonidos: ↑ 16000 Hz.

El ultrasonido se define como una onda longitudinal asociada con el sonido, de naturaleza mecánica y con una frecuencia superior a 16.000 Hz. Una onda es una perturbación que se produce en un lugar y se transmite o comunica a otro sin conllevar esto un transporte de materia. Es una vibración que causa una compresión y dilatación momentáneas por el medio por el cual se transmite. Ondas mecánicas son aquellas que necesitan un medio material para propagarse, ya sea gaseosos, líquido o sólido. El paso de estas ondas de US desde el transductor a los tejidos hacen que el medio oscile, transmitiendo movimientos ondulatorios o vibraciones que generan energía y que llegan al organismo (efecto mecánico de vibración molecular). Estas vibraciones dependerán de la composición del tejido que atraviesan (densidad y elasticidad) y de la impedancia (la capacidad de un determinado medio a impedir el paso del US) que éstos producen a su paso. Llamamos intensidad (W/cm^2) a la cantidad de US que llega a la zona tratada, y según la intensidad que se utilice, es el uso que se le da en medicina. La forma de aplicación ultrasónica sobre el paciente se obtiene mediante un cabezal de contacto directo que sirve de transmisor entre el generador y el paciente.

Físicamente hablando, las oscilaciones de una onda sonora de alta frecuencia son compresiones y dilataciones periódicas de la materia que se encuentra en su camino y que se propagan a través de la misma a una velocidad determinada y de acuerdo con el generador de alta frecuencia que las origina. El ritmo de estas variaciones de compresión y dilatación estará en función de la frecuencia del generador; la rapidez en la sucesión de los impulsos presión expansión nos determinará la longitud de onda; por último, el medio acoplado con la onda sónica oscilará rítmicamente al unísono con la energía generada. Siendo el medio receptor el cuerpo humano se aplicará la energía ultrasónica como un masaje de alta frecuencia y según la fuerza de propagación, puede

llegar en forma muy intensa a los tejidos musculares. De aquí nació la idea general de aplicar los US en la Medicina Física (Jane Boada J., 1982).

6.1.2.- Historia

Las primeras aplicaciones empíricas de ultrasonidos terapéuticos se llevaron a cabo durante la Edad Media, época en la que se utilizaba el campo de resonancia de un cristal, puesto en vibración, para el tratamiento de algunas afecciones neurológicas. Hacia finales del siglo XVIII, los estudios realizados por biólogos demuestran que ciertos animales utilizan este tipo de vibración acústica para orientarse. Tal es el caso de murciélagos y de algunos cetáceos. Las ondas sónicas de alta frecuencia comienzan a estudiarse entonces experimentalmente mediante diversos artificios capaces de producirlos, como son el silbato de F. Galton y el diapasón de B. Konig. En 1847, J. P. Joule descubre la magnetostricción, y en 1880, Pierre y Jacques Curie la piezoelectricidad, y, poco después, G. Lipmann halla la reciprocidad de este efecto, bases de la producción de ondas sónicas de alta frecuencia. La primera aplicación práctica de este descubrimiento tuvo lugar durante la primera guerra mundial al utilizarse para la detección de submarinos y se designó con el nombre de "SONAR" (*Sound Navigation and Ranging*). En 1917, P. Langevin realiza los primeros estudios sobre los efectos biológicos producidos por los ultrasonidos; y en 1927 R. Wood y A. Loomis inician una serie de investigaciones referentes a la acción ultrasónica sobre bacterias, sangre, etc. Así pues, antes de la segunda guerra mundial se conocieron ya muchos datos importantes sobre el ultrasonido en el campo biológico. Para su aplicación en la medicina humana como terapia sólo faltaban aparatos adecuados, potentes y seguros. Este defecto lo venció T. Pohlmann, en 1939, construyendo un aplicador terapéutico que reunía todas las cualidades deseadas (Malizos KN *et al*, 2006) con éxitos terapéuticos en el tratamiento de mialgias y neuralgias. Apartir de la década de 1950 empieza a aplicarse esta forma de terapia sólo como diatermia, y una década después se introduce la forma pulsatil, mucho más utilizada al prescindir de los efectos térmicos (Staff V. V. *et al*, 2003; Moreno de la fuente J L., 2006).

6.2 Efectos biofísicos de los ultrasonidos

La energía captada por el transductor a través de su cristal piezoeléctrico, se transmite al cuerpo del paciente en forma de vibración mecánica. Las presiones y expansiones logradas por la vibración del cristal son de la misma longitud de onda o frecuencia del oscilador de Alta Frecuencia que las origina. Según el tipo de cristal empleado en el transductor, las frecuencias pueden variar entre 800 y 1000 Kc/s (0.8-1 MHz).

6.2.1.- Efecto mecánico

Uno de los conceptos fundamentales en Ortopedia es el conocimiento de como el entorno mecánico del sitio de una fractura influye en el patrón de reparación ósea (Wu J. *et al*, 1984; Cunningham J. L. *et al*, 1990; Tencer A. F. *et al*, 1993; Turner C. H. y Burr D. B., 1993; O'Sullivan M. E. *et al*, 1994; Duncan RL. y Turner CH., 1995; Claes L. E. *et al*, 1998; Nunamaker D. M., 1998).

Lo primero que ocurre cuando pasamos el cabezal ultrasónico por el cuerpo del paciente, es que propagamos un movimiento mecánico dentro de los complejos celulares del tejido adiposo, llegando hasta el interior de los tejidos musculares. Esta acción mecánica de compresión y expansión produce una hiperpresión que supone un masaje muy intenso. Además si tenemos en cuenta que el tejido adiposo está formado por un 70% de agua, entonces debemos considerar en estas aplicaciones el fenómeno tan característico de la "cavitación". Considerando esta pequeña región a través de la cual se propagan la sondas sónicas, durante la mitad negativa del ciclo de presión se encuentra sometida a un esfuerzo tensional y durante la mitad positiva del ciclo a una compresión. Las burbujas que están presentes por estas presiones, se expansionarán y contraerán alternativamente y si la amplitud de la onda es suficientemente elevada la burbuja se deshará bruscamente durante la compresión. A esta amplitud mínima requerida para producir la cavitación se la denomina: "umbral de cavitación". Este umbral es el que nos determina la dosis de aplicación. Como resultado de esta acción mecánica, concretada con el fenómeno natural de la cavitación (Hill C. R., 1971), las partículas celulares sufren una aceleración entre la presión positiva y la negativa, llegando a ser muy superior a la que se lograría en un medio normal de propagación (Watson T., 2000).

Estas diferencias de presión tienen las consecuencias siguientes:

- Cambios en el volumen de las células corporales alrededor del 0,02%.
- Cambios en la permeabilidad de las células y las membranas tisulares (Dyson M. y Brookes M., 1983; Dinno MA. *et al*, 1989; Ryaby JT. *et al*, 1989; Rawool NM. *et al*, 2003).
- Un intercambio mejorado de productos metabólicos (Dyson M., 1973).

Por todo lo explicado, el efecto mecánico ultrasónico puede llegar a producir una separación muy compleja de los tejidos celulares internos y por tal motivo, podemos hablar de un "micro masaje celular en profundidad".

Las presiones micromecánicas producidas por estas ondas de presión en el tejido vivo puede resultar en eventos bioquímicos a nivel celular (Binderman I *et al*, 1988; Buckley MJ *et al*, 1988; Rubin J. *et al*, 1997).

6.2.2.- Efecto térmico

El micromasaje de los tejidos conduce a la generación de calor por fricción. Este efecto térmico se ha descrito con frecuencia en la literatura y es la acción más conocida de los US. A los veinte o veinticinco segundos de aplicar el cabezal, la superficie tratada alcanza temperaturas máximas dentro del tejido vivo y solamente están limitadas por el equilibrio existente entre la absorción de la energía sonora y la afluencia térmica del transporte sanguíneo (Claes L. y Willie B., 2007). Debido a las diferencias en el coeficiente de absorción; como consecuencia de la reflexión en los límites tisulares y; como resultado de los picos y valles de interferencia, la generación de calor en el campo ultrasónico no será uniforme. Al mantener en movimiento la cabeza de tratamiento se intenta minimizar esta desuniformidad. Gracias a este efecto tan decisivo (Dyson M., 1973), se tiene la posibilidad de provocar en forma local (Chang W. H. *et al*, 2002), elevaciones térmicas en las superficies limítrofes de los tejidos vivos y constituye una razón más que eficiente, para preferir esta técnica a otras que actúan de forma más generalizada y normalmente, muy mal distribuida (onda corta y la termoterapia). El calor se genera especialmente en el tejido óseo, el cartílago, los tendones, el tejido muscular y la piel. Puesto que el haz ultrasónico es casi paralelo, el área donde ocurre el efecto térmico corresponderá aproximadamente al tamaño de la cabeza de tratamiento (ERA). Lehmann ha demostrado que el aumento de temperatura es un factor importante en el desarrollo de algunos procesos fisiológicos (Lehmann J. F., 1982).

Las intensidades de US son altas para aplicaciones quirúrgicas y terapéuticas (1-50 W/cm^2) y son diseñadas para producir un calentamiento del tejido significante (Wells PNT, 1985). Los US diagnósticos emplean intensidades mucho más bajas (1-50mW/cm^2), que son elegidas especificamente para evitar el calentamiento tisular (Ziskin M. C., 1987).

Los US producen hipertermia (Benkeser P. J. *et al*, 1990), Azuma et al, utilizaron en su experimento LIPUS (30 mW/cm^2) que tienen un efecto térmico pequeño y que producen una cavitación y propagación ondulante estable (Azuma Y. *et al*, 2001). Otros autores afirmaron como la aplicación de US en modo continuo de 1 Mhz con I_{SATA} de 0,312 o 0,692 W/cm^2 eran consideradas no térmicas (Feril L. B. Jr. y Kondo T., 2004).Como igualmente había indicado Duarte, que con una intensidad de US pulsatil de 49,6 mW/cm^2 y 57 mW/cm^2 de SATA el efecto no era térmico (Duarte L. R., 1983) e igualmente Reher *et al*. (Reher P. *et al*, 1997) en otro estudio, vieron como con 0.1 W/cm^2 I_{SATA} los efectos obtenidos no eran térmicos. Estos aplicaron US de 0.1 W/cm^2 I_{SATA} en cultivo de hueso de calvarie de ratón y demostraron como se estimulaba

significativamente la formación ósea (síntesis de colágeno y proteína nocolagenosa). Sin embargo, US pulsátiles a dosis elevadas (1.0-2.0 W/cm^2 I_{SATA}) inhibían significativamente la síntesis de ambos; colágeno y proteína nocolagenosa.

En el estudio de Nahirnyak *et al*, en el que evaluaron *in vitro* la elevación térmica en el peor de los escenarios en hueso temporal humano y coágulos sanguíneos de humano y porcino; expuestos a la máxima intensidad aplicada de 0.4 W/cm^2 (duty cycle 80%) y 1 MHz, observaron como la temperatura más elevada alcanzada era de 1ºC en el hueso del cráneo. Además, observaron como la temperatura era menor de lo que se esperaba por modelos teóricos matemáticos. Debido a esto, vieron como los cálculos matemáticos estaban sobreestimando el incremento real de temperatura en el tejido con la aplicación de US. Esta predicción en los incrementos de temperatura en el hueso del cráneo y en los coágulos sanguíneos expuestos a ultrasonidos pulsátiles podría ser de ayuda para dirigir el desarrollo de los ultrasonidos hacia el uso de intensidades más elevadas, e incluso hacia otras aplicaciones terapeúticas que las utilizadas habitualmente (Nahirnyak V. *et al*, 2007). En otros estudios anteriores para mejorar la trombolisis que aplicaban US transcraneales en ratas, también afirmaron como en la dosis más alta de Intensidad aplicada por ellos (7 W/cm^2) durante 30 minutos tan solo obtenían un moderado incremento de temperatura (0,9º C), sin encontrar en su estudio histológico efectos adversos deletéreos (Fatar M. *et al*, 2006).

6.2.3.- Efecto biológico

Como ya hemos comentado, los efectos de la terapia ultrasónica constituyen un resultado del micromasaje (efecto mecánico). Dependiendo de la forma, continua o pulsátil, este micromasaje conduce a un predominio del efecto térmico o de otros efectos. Los siguientes efectos biológicos pueden considerarse una respuesta fisiológica a las acciones mecánicas y térmicas mencionadas (Hogan R. D., 1982).

La absorción de la energía ultrasónica origina un efecto térmico y el cuerpo responde con vasodilatación. La vasodilatación a consecuencia del tratamiento con ultrasonidos puede considerarse en parte como un fenómeno protector destinado a mantener la temperatura corporal dentro de los límites más estrechos posibles.

La vasodilatación esta causada por:

~*Liberación de estimulantes tisulares*. Esto es una consecuencia del daño celular causado por la vibración mecánica.

~*Estimulación*, posiblemente directa, de las fibras nerviosas aferentes. Esto conduce a depresión postexcitatoria de la actividad ortosimpática.

~*Reducción del tono muscular* como resultado del mecanismo sobredicho.

Aunque varios autores han demostrado un efecto reflejo de los US, todavía no esta claro cuales son las fibras aferentes estimuladas (Hogan R. D., 1982).

El aumento del tono muscular conduce a dificultad de la circulación sanguínea con elevación simultánea de las demandas de energía por el tejido hipertónico. Así pues, la concentración de estimulantes tisulares aumenta con bastante rapidez, elevando la actividad aferente nociceptiva de las fibras nerviosas finas. Las consecuencias de esto son: aumento del dolor, aumento del tono muscular y mayor trastorno de la circulación. Para romper este círculo vicioso, el favorecer la circulación será evidente en un paso importante hacia la recuperación. Becker *et al*., entre otros autores, ha demostrado la posibilidad de favorecer la circulación sanguínea por vía refleja utilizando los US. Describieron una circulación mejorada, sobre todo en los vasos sanguíneos distales de pacientes con desórdenes vasculares, a consecuencia de la terapia ultrasónica aplicada segmentariamente (Becker S., 1969). Por otro lado, el efecto de los US sobre los vasos sanguíneos ha sido objeto de controversia. En la mayoría de los tejidos, las arteriolas no están en reposo bajo condiciones fisiológicas normales, sino que muestran movimientos peristálticos lentos (2-3 por minuto). Con la aplicación de ultrasonidos pulsátiles, la frecuencia de este movimiento vascular aumenta mucho (hasta 31 por minuto). Un hallazgo interesante radica en que la frecuencia de estos movimientos vasculares apenas aumenta (7-8 por minuto) con el calentamiento ordinario de los tejidos. Los autores señalan que tales movimientos de las paredes arteriolares tienen más importancia para la nutrición de los tejidos que la dilatación arteriolar sola.

Los LIPUS solo pueden causar ondas de presión extremadamente bajas que penetran de forma proporcional a la densidad del tejido. Los LIPUS son principalmente reflejados en los bordes del tejido blando y duro, tejido similar al tejido conectivo y hueso cortical. Esta podría ser el motivo de por qué los LIPUS no tienen capacidad para estimular la osteogénesis en hueso intacto (Wimsatt J. *et al*, 2000; Warden S. J. *et al*, 2001)o el callo en la fase de remodelado (Pilla A. A. *et al*, 1990; Wang S. J. *et al*, 1994; Hantes M. E. *et al*, 2004). La diferente absorción de LIPUS podría establecer un gradiente de tensión mecánica en el callo en curación que estimula la formación de hueso perióstico (Gross T. S. *et al*, 1997; Rubin C. *et al*, 2001). Esto permite un mejor entendimiento de cómo los LIPUS podrían influir en las fases de inflamación y formación del callo blando de la curación de fracturas. A pesar de los extensivos estudios clínicos y experimentales para encontrar el efecto de LIPUS sobre el incremento de la regeneración ósea, aún permanecen sin aclararse los mecanismo biofísicos implicados en el complejo proceso de la curación de fracturas y se requieren más investigaciones en el futuro (Claes L. y Willie B., 2007).

6.3 Características de los ultrasonidos

6.3.1.- Ultrasonidos con impulsos modulados

El sistema de los "pulsos", surgió para permitir aplicar los US sin peligro, en los casos agudos y en los pacientes con implantes metálicos en su cuerpo. Este sistema consiste en enviar a un receptor un tren corto de onda sonoras producidas por el transductor, a través del medio. Utilizando un reflector para hacer regresar los pulsos, se obtenía un sistema práctico de cálculos de medición. La ventaja principal de éste método pulsátil en forma de "eco" es que la energía pasa durante sólo una pequeña fracción del tiempo de aplicación y gracias a ello, resulta posible la propagación de las ondas mecánicas con densidades de energía elevadas sin calentamiento apreciable del medio. El aparato es accionado por medio de un pulsador electrónico que activa el control de la base de los tiempos del generador principal. Las pulsaciones se producen a intervalos regulares con una frecuencia de repetición que puede estar comprendida entre los 50 y los 100 c/s. A esta frecuencia en que se originan las interrupciones de la emisión del generador, se le llama de "impulsos modulada".

Por lo tanto la técnica púlsatil nos ofrece dos ventajas terapéuticas bien definidas:

~Anular el calor de reacción del organismo.

~Combinar dos terapias a la vez: la antiinflamatoria de la onda portadora normal y la correspondiente a la frecuencia modulada de la pulsación.

6.3.2.- Parametros de los ultrasonidos pulsátiles

La oscilación de alta frecuencia se aplica al paciente a través de transductores o cabezal aplicador, compuesto por cristales piezoeléctricos. Otra parte importante del aparato de ultrasonido a la que dedicaremos mención es el selector de potencia, necesario para establecer diferentes dosis o potencias de aplicación. La intensidad o potencia, en el caso de los ultrasonidos, es la energía que pasa por segundo y cm^2 de una superficie puesta perpendicularmente a la dirección de su emisión. Su unidad es el Watio/cm^2. Los valores homologados son: 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 1.5, 2, 3, y 4 W/cm^2. Modernamente, el valor máximo de 4 W/cm^2 ha sido eliminado por considerarse en la práctica una potencia demasiado elevada y con peligro de producir eritemas y quemaduras.

Con el objetivo de determinar los US que son necesarios aplicar para el tratamiento de las fracturas, se han efectuado estudios para examinar diferentes intensidades bajas y frecuencias. Yang *et al*, compararon directamente diferentes intensidades de LIPUS (50-100 mW/cm^2) para restaurar las propiedades mecánicas del femur de rata después de una fractura. Estos autores midieron un incremento en el máximo de par de tensión y una disminución ligera de la rigidez a la torsión utilizando 50 mW/cm^2 en comparación con 100 mW/cm^2. También observaron que los animales no tratados tenían un máximo de par de tensión y una rigidez a la torsión significativamente más baja comparado con los animales en los que se había tratado el fémur con 50 mW/cm^2 (Yang K. H. *et al*, 1996), sin embargo no compararon los controles con los tratados con 100 mW/cm^2 (Claes L. y Willie B., 2007). Como determinaron en su estudio en fíbulas fracturadas de conejos Tsai *et al.*, los US a 0.5 W/cm^2 eran estimuladores de la reparación ósea, si se daban durante 15 minutos al día y fueron recomendados para futuros ensayos clínicos. Sin embargo, los ultrasonidos a intensidades de 1.0 W/cm^2 suprimian la formación ósea (Tsai C. L. *et al*, 1992).

Además de la intensidad, la frecuencia de la señal ultrasónica también ha sido investigada para estimular la osteogénesis ósea. Dyson *et al*. (Dyson M. y Brookes M., 1983) demostraron que utilizando una intensidad más elevada de US pulsátil (500 mW/cm^2) un 78,6 % a 1.5 MHz y el 56,2 % a 3.0 MHz de las fractura de fíbula de ratas tratadas presentaba más avanzada la curación tanto en el estudio radiográfico como histológico que en los no tratados. Tsai *et al*. obtenían unos índices de deposición mineral significativamente más elevados a las 2 y 3 semanas postfractura en fíbula de conejos que habían sido tratados con frecuencias de 1.5 MHz comparadas con 3 MHz, utilizando ambos una intensidad de 500 mW/cm^2 (Tsai C. L. *et al*, 1992). La frecuencia de 1.5 MHz se ha utilizado más comúnmente para estimular la osteogénesis tanto de manera experimental como clínica (Claes L. y Willie B., 2007).

El tiempo de aplicación del tratamiento con US en el estudio de Azuma *et al* realizan el experimento *in vivo* sobre femur de rata durante un tiempo de 25 días después de la fractura, diviendo en 3 periodos este tiempo (de 1 a 8 días después de la fractura, de 9 a 16 días después de la fractura y de 17 a 24 días despues de la fractura) (Azuma Y. *et al*, 2001), cada una de las cuales implica diferentes reaciones esenciales para la curación de fracturas (Jingushi S. *et al*, 1992), aunque Azuma *et al* investigaron la relación entre el tiempo del tratamiento con LIPUS parcial y la eficiencia en el proceso de aceleración de la curación mediante la estimación de propiedades mecánicas, masa ósea, histología, y la microestructura del callo, con el más novedoso uso de la técnica tridimensional de tomografía computadorizada de rayos X microfocal (Azuma Y. *et al*, 2001). Wang *et al*., realizaron su estudio in vivo en ratas evaluando sus resultados a los 21 días (Wang S. J. *et al*, 1994).

Déniz *et al*., determinaron que el tiempo diario de tratamiento debe calcularse en función del área total a tratar y que el efecto del ultrasonido a la dosis de 0,1 W/cm^2 sobre la reparación de las fracturas no es mediado por cambios sistémicos en parámetros de remodelación ósea, con los resultados de este estudio corroboraron el papel favorecedor del ultrasonido en la reparación de las fracturas y delimitaron los valores de parámetros básicos como son la intensidad y el tiempo de tratamiento que deben ser utilizados para que este efecto sea óptimo (Déniz A.S. *et al*, 1998).

6.4 Efectos de los ultrasonidos en las fracturas

La aplicación de US para la curación de fracturas recientes fue introducido por Duarte (Duarte L. R., 1983). Los US también han sido beneficiosos en acelerar la consolidación ósea en pacientes sometidos a alargamientos óseos (Middleton C. *et al*, 2003), osteosíntesis (Bulger E. M. *et al*, 2004) y en fusiones espinales (Karmakar M. K. y Ho A. M., 2003).

Los efectos producidos por los US pulsatiles de baja intensidad en las fracturas se mencionan a continuación:

- Acortamiento del tiempo total del proceso de regeneración, es decir post-fractura (Van den Berg W. B. *et al*, 2001; Sena K. *et al*, 2005).

- Aumento de la irrigación de la zona cercana a la fractura por la modulación de la expresión génica de los 2º mensajeros que influencian la actividad angiogénica (producción de nuevos vasos sanguíneos). Estos a su vez repercuten en la rapidez del proceso de regeneración y remodelacióndel callo óseo (Sthepen B. *et al*, 1996; Sena K. *et al*, 2005; Simpson A. H. R. W. *et al*, 2006).

- Aumento de la velocidad de proliferación y diferenciación de los osteoblastos y los condrocitos hipertróficos en el proceso de osificación (Sthepen B. *et al*, 1996; Okazaki R. *et al*, 2001; Sena K. *et al*, 2005; Simpson A. H. R. W. *et al*, 2006).

- Estimulación de la producción de colágeno con mayor nivel de empaquetamiento mediante cross links y por lo tanto más formación de colágeno insoluble de fácil depósito (Sthepen B. *et al*, 1996; Okazaki R. *et al*, 2001; Sena K. *et al*, 2005) en el sitio de fractura.

- Producción del proceso de regeneración en forma más fisiológica y con menor pérdida del trabeculado normal presente en el hueso sano (Ibarra C. *et al*, 2007).

- Mejoramiento de la rigidez axial del hueso tratado (Sena K. *et al*, 2005; Simpson A. H. R. W. *et al*, 2006).

Algunos autores (Azuma Y. *et al*, 2001) sugieren que los LIPUS actuan sobre algunas reacciones celulares implicadas en cada fase del proceso de curación, tales como; la reacción inflamatoria, angiogénesis, condrogénesis, osificación intramembranosa, osificación endocondral, y remodelamiento óseo. Estudios de Sakurakichi *et al*., que investigaron los efectos de LIPUS sobre el tiempo de tratamiento en el alargamiento óseo en conejos, sugieren que los efectos de los ultrasonidos se producen vía endocondral, concluyendo que los LIPUS estimulan la formación de hueso en el alargamiento óseo y son más efectivos durante la fase de alargamiento (Sakurakichi K. *et al*, 2004). Estos estudios demostraron la existencia de más condrocitos en la sección tratada que en la no tratada, pareciendo que los LIPUS estimulan a las células mesenquimales en su diferenciación a condrocitos. No hubo ninguna diferencia entre el grupo control y el grupo tratado de la fase de espera (cuando se dejaba de administrar LIPUS). Por consiguiente, el efecto de LIPUS sobre las células durante la fase de espera es muy pequeño. En la fase de alargamiento, las células madre mesenquimales multipotenciales y las células de la médula ósea se diferencian a células osteogénicas diferenciadas (Sakurakichi K. *et al*, 2004).

Los LIPUS en la fase de alargamiento son más efectivos en acelerar la maduración del alargamiento óseo, como confirmaron Sakurakichi *et al*. mediante radiografía, densidad mineral ósea, tomografía computadorizada tridimensional y resultados mecánicos. Estos resultados sugieren que las células mesenquimales más maduras, osteoblastos o condrocitos son más afectados por los LIPUS que las células inflamatorias o células mesenquimales inmaduras (Sakurakichi K. *et al*, 2004). La osificación endocondral, en particular, fue acelerada por LIPUS. Diversos estudios adicionales han demostrado la eficacia del ultrasonido para la estimulación de la fractura ósea, tanto en modelos *in vivo* como en pruebas clínicas (Klug W. *et al*, 1986; Wang S. J. *et al*, 1994; Kristiansen T. K. *et al*, 1997). En 1983 Dyson y Brookes, efectuaron un estudio con el objetivo de investigar los efectos del ultrasonido en el proceso de reparación ósea (Dyson M. y Brookes M., 1983). Con este propósito emplearon un modelo placebo controlado de fracturas bilaterales de peroné en ratas. En este sentido usaron señales ultrasónicas pulsadas de 1 y 3 MHz, 500 mW/cm^2 de I_{SATA} aplicadas por vía transcutanea durante 5 minutos sobre el sitio de la fractura. El estudio obtuvo como resultado una aceleración de la curación de las fracturas que fueron tratadas con ultrasonidos.

Estudios clínicos realizados por Xavier y Duart, Kristiansen y Heckman *et al*., concluyeron que el ultrasonido de baja intensidad (en el rango diagnóstico) aceleraba el proceso de reparación de las fracturas en humanos (Xabier C. A. M. y Duarte L. R., 1983; Kristiansen T. K., 1990; Heckman J. D. *et al*, 1994).

6.5 Mecanismo de acción

Aunque estudios en animales y en humanos han confirmado la capacidad de los US para aumentar la curación de fracturas, aún no se ha establecido el mecanismo físico exacto que lo produce. *In vitro*, el US de baja intensidad tiene efectos directos sobre la fisiología celular. Entre las respuestas encontradas en el tejido biológico como consecuencia de la aplicación de este estímulo mecánico de alta frecuencia y que bien pudieran estar en la base de la acción estimuladora del ultrasonido sobre el proceso de reparación ósea, podemos citar las siguientes:

- Incremento de la absorción intracelular de calcio (Ryaby JT. *et al*, 1989; Parvizi J. *et al*, 2002).

- Estimulación de la expresión de numerosos genes implicados en el proceso de curación; incluyendo agregan, IGF y TGF-ß (Hadjiargyrou M. *et al*, 1998).

- Estimulación de la producción del factor de crecimiento PDGF-AB (Young S. y Dyson M., 1990).

- Estimulación de la angiogénesis (Young S. y Dyson M., 1990).

- Incremento de la vascularidad (Rawool NM. *et al*, 2003) en el sitio de la fractura.

La exposición al US incrementa la formación de callo blando y produce un comienzo más precoz de la osificación endocondral, sugiriendo que el efecto más destacado tiene lugar sobre la población condrocítica (Pérez Casas A y Bengoechea M. E. , 1978; Netter F. H., 1984; Wu J. *et al*, 1984; Rubin C. T. y Lanyon L. E., 1985; Kenwright J. y Goodship A. E., 1988; Ryaby JT. *et al*, 1989; Tencer A. F. *et al*, 1993; Blevins Ch. E., 1994; O'Sullivan M. E. *et al*, 1994; Wallace A. I. *et al*, 1994; Wang S. J. *et al*, 1994; Duncan RL. y Turner CH., 1995; Yang K. H. *et al*, 1996; Heckman JD. y Sarasohn-Kahn J., 1997; Claes L. E. *et al*, 1998; Chao E. Y. *et al*, 1998; Einborn T. A., 1998; Goodship A. E. *et al*, 1998; Hadjiargyrou M. *et al*, 1998; Hannouche D. *et al*, 2001).

Existen diferentes vías de transducción para campos electromagnéticos pulsátiles y estimulación ultrasónica. Como la estimulación con US además de ejercer presión mecánica conduce a un incremento de calcio citosólico y una activación de calmodulina citoesquelética. La ruta dominante de la estimulación con US incrementa la viabilidad osteoblática, probablemente a través de la señal de transducción de Óxido Nítrico (NO), no siendo así con campos electromágnéticos pulsátiles. Sin embargo, Li *et al*. expresaron las limitaciones de su estudio in vitro para valorar el mecanismo por el cual los US llegan al lugar donde actúan; siendo conscientes de que las mismas células en su entorno natural in vivo están expuestas a miles de señales de regulación, y por ello, podrían responder de modo diferente a lo que estos autores describen en su estudio (Li J. K. *et al*, 2006).

Se ha estudiado como LIPUS estimula un incremento transitorio en la expresión de genes de respuesta temprana, c-jun, c-myc, COX-2, Egr-1 y TSC-22, además de genes marcadores de diferenciación ósea, osteonectina y osteopontina, en células osteoblásticas derivadas de médula ósea. La naturaleza transitoria de la respuesta implica que la elevación sostenida de la expresión de los genes sensibles a LIPUS podría requerir estimulaciones repetitivas. Aunque son necesarios más trabajos para aclarar completamente la expresión de genes de respuesta temprana, estas observaciones podrían ser cruciales para ayudar a explicar los mecanismos de LIPUS en la curación de fracturas óseas (Sena K. *et al*, 2005).

7.- Aplicación de la Biología Molecular a nuestro estudio. Reacción en cadena de la polimerasa

7.1 Introducción

Ideada por el científico Kary Mullis en 1983 y más conocida como **PCR** (acrónimo inglés de *Polymerase Chain Reaction*, **reacción en cadena de la polimerasa**) (Mullis KB. y Faloona FA., 1987), la reacción en cadena de la polimerasa ha cambiado el curso de las ciencias biológicas y biomédicas más que cualquier otra técnica inventada durante el siglo XX. El gran éxito científico de la PCR reside en que permite obtener in vitro un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN, basándose en un principio muy sencillo: la utilización de mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular.

Habitualmente la reacción se diseña para permitir la amplificación selectiva de una o varias secuencias diana de ADN presentes en una mezcla compleja de secuencias (por ejemplo ADN genómico total o una población compleja de cADN). Para que la

amplificación selectiva sea posible, es absolutamente necesario disponer de un mínimo de información sobre la secuencia de la diana. Esta información permite la construcción de dos oligonucleótidos, habitualmente de 15 a 30 nucleótidos de longitud, que actúan como *primers* (iniciadores, en inglés *primers*) en la reacción. Estos oligos reciben el nombre de amplímeros. Los amplimeros están diseñados para que puedan iniciar la reacción de síntesis de ADN en presencia de una ADN polimerasa termoestable adecuada y de los precursores de ADN (los cuatro desoxinucleótidos trifosfato, dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Cada amplímero servirá para iniciar la síntesis de una hebra de ADN complementaria a una de las hebras del segmento de la diana, y las dos hebras de nueva síntesis serán complementarias entre sí (Strachan T. y Read A. P., 1999). Básicamente la PCR, consiste en someter al ADN a un ciclo de temperaturas siguiéndose estos pasos: (i) desnaturalización, (ii) alineamiento de los cebadores y (ii) extensión (Kawai J., 2001).

7.2 PCR cuantitativa en tiempo real

Una evolución importante de esta tecnología ha sido el desarrollo de la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). La qRT-PCR sigue el principio de la PCR convencional, pero con una serie de ventajas. Igualmente se necesita un ADN (cADN), una polimerasa, unos cebadores y unos fluorocromos (Jelinsky S. A., 2000). Debido a que cada nuevo fragmento sintetizado lleva incorporado fluorocromos, es posible saber exactamente y en cada ciclo la cantidad de moléculas sintetizadas, que será proporcional a la señal de fluorescencia emitida. La cinética de la reacción de amplificación es por tanto conocida y registrada. Un algoritmo específico convierte la señal luminosa en un número que es usado por nosotros para saber cuánto se está generado en un determinado pocillo y en un determinado momento. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en esta técnica son de dos tipos; agentes intercalantes (SYBR Green) y sondas específicamente diseñadas que tienen incorporados los fluorocromos (Taqman). En esta Tesis Doctoral se ha hecho uso del primero de los sistemas. Esta técnica es muy rápida y fiable, y permite hacer estudios de expresión génica con facilidad, especificidad y elevada sensibilidad (Feng X., 2000; Gunther E.C., 2003).

Objetivos

I.-"Valorar el efecto de los ultrasonidos pulsátiles sobre la consolidación de las fracturas costales mediante radiología e histología en un modelo experimental en ratas".

II.-"Determinar la dosis y tiempo de aplicación más óptimos de los ultrasonidos pulsátiles para acelerar la reparación de las fracturas costales".

III.-"Cuantificar, mediante PCR en tiempo real, la expresión de algunos genes potencialmente implicados en los mecanismos moleculares de la osteogénesis inducida por los ultrasonidos pulsátiles in vivo".

Material y método

Hemos realizado un estudio experimental con un modelo in vivo de fracturas costales en rata, para valorar el tratamiento con ultrasonidos pulsátiles. Este proyecto se ha realizado en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. En una primera fase se han utilizado 88 ratas para el estudio histológico y radiológico; en una segunda fase 48 ratas para el análisis de expresión génica y la última fase comprende el examen estadístico.

Para el desarrollo del modelo experimental de fractura costal, tratamiento con USP, estudio radiológico y seguimiento clínico de los animales, se ha utilizado el quirófano I para animales inmunocompetentes con nivel de contención biológica II y las salas de preoperatorio y postoperatorio de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

El estudio histológico ha sido efectuado en el laboratorio del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

El análisis génico ha sido llevado a cabo en el laboratorio del Departamento de Fisiología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y en el laboratorio 4 de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

El análisis estadístico se ha realizado en la unidad de Epidemiología de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

1.- Animales y hábitat

Se han utilizado ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley de 4ª generación, machos, de 5 meses de edad y pesos que han oscilado entre los 300-320 gr. Esta generación de animales se ha obtenido en el bioterio de la Unidad de Investigación (Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín) a partir de una colonia de reproductores (1ª generación) procedente del Centro de producción Animal de Harlan Interfauna Ibérica SL (Barcelona, España).

Los animales han sido destetados a los 21 días de edad y se han ubicado en jaulas de Makrolón III de 20 x 35 x 55 cm (Allentown Inc., Panlab S.L., Barcelona, Spain) con 4 animales por jaula {Baumans V. , 2005}.

El ciclo de luz ha sido de 12h/12h (luz/oscuridad), con una intensidad de 270 lux. Se ha mantenido una temperatura ambiental de 21$\pm$1º C, una humedad relativa de 50$\pm$5 % y un sistema de ventilación de 15-20 renovaciones/h.

Los animales han sido alimentados *ad libitum* con una dieta comercial de mantenimiento en pellets con la siguiente composición: 14% proteína bruta, 4% grasa bruta, 4% celulosa bruta, 5% cenizas brutas, 12 mg/Kg CuO, 15000 UI/kg Vitamina A, 1500 UI/kg Vitamina D3 y 80 mg/kg Vitamina E (R.02-E Standard Diet, Prolabor, Spain). El agua de bebida también se ha administrado *ad libitum* y se ha purificado por un sistema de ósmosis inversa (Edstrom Industries, Waterford, WI, USA).

La monitorización microbiológica de rutina, de acuerdo a las recomendaciones de la Federación Europea de Asociaciones de Animales de Laboratorio (*Federation of European Laboratory Animal Associations*, FELASA), no ha revelado presencia de patógenos en ratas durante el periodo del estudio experimental {Nicklas W. *et al*, 2002}.

Siguiendo las recomendaciones de FELASA, se ha supervisado en todo momento la conducta, el estrés y el bienestar de los animales {Zuñiga J.M. *et al*, 2001}. De este modo se han valorado signos fisiológicos oculares (hematoporfirina y hundimiento del globo ocular), respiratorios (estornudo, flujo nasal y frecuencia respiratoria), aspecto externo (piloerección, lordosis, deshidratación y perdida de peso) y signos de actividad anormal (somnolencia, anorexia, automutilación y vocalización).

Los protocolos quirúrgicos, terapéuticos, de manejo y eutanasia en los animales, se han ajustado en todo momento a las exigencias legales y recomendaciones internacionales y nacionales: Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos {*National Research Council*, 1996}, Directiva del Consejo Europeo 86/609 {Directiva- Comisión de las Comunidades Europeas, 1986}, Real Decreto Español 1201/2005 {Ministerio Presidencia, 2005} y la Ley 32/2007 {Cortes Generales, 2007}.

2.- Grupos de estudio

Se han utilizado 88 animales para el estudio radiológico e histológico y otros 48 para el estudio de expresión génica.

2.1 Estudio radiológico e histológico

Para el estudio radiológico e histológico, los 88 animales han sido distribuidos aleatoriamente en 4 grupos.

1. *Un grupo control (n=40):* animales con fractura costal sin ningún tipo de tratamiento con USP.

2. *Un grupo USP 10% (n=16):* animales con fractura costal sometidos a tratamiento con USP al 10%.

3. *Un grupo USP 20% (n=16):* animales con fractura costal sometidos a tratamiento con USP al 20%.

4. *Un grupo USP 50% (n=16):* animales con fractura costal sometidos a tratamiento con USP al 50%.

Cada grupo de tratamiento con USP ha sido subdividido en 4 subgrupos de 4 animales cada uno en función del tiempo de tratamiento: 2, 10, 20 y 28 días. Así mismo, el grupo control se ha subdividido en 4 subgrupos de 10 animales cada uno en función de estos mismos tiempos establecidos.

2.2 Estudio de expresión génica

Para el estudio de expresión génica, los 48 animales han sido distribuidos aleatoriamente en 4 grupos:

1. *Un grupo control (n=12):* animales con fractura costal sin ningún tipo de tratamiento con USP.

2. *Un grupo USP 10% (n=12):* animales con fractura costal sometidos a tratamiento con USP al 10%.

3. *Un grupo USP 20% (n=12):* animales con fractura costal sometidos a tratamiento con USP al 20%.

4. *Un grupo USP 50% (n=12):* animales con fractura costal sometidos a tratamiento con USP al 50%.

Todos los grupos han sido subdivididos a su vez en 2 subgrupos de 6 animales cada uno, en función de los tiempos establecidos: 10 y 28 días.

3.- Modelo experimental

Para la anestesia de los animales se ha utilizado un protocolo de combinación de un α-2 agonista (medetomidina) y un agente disociativo (ketamina) por vía parenteral {Hedenqvist P. *et al*, 2000}. De este modo se ha procedido a la premedicación con 0,25 mg/kg sc de medetomidina (Domtor® Pfizer, Madrid, España), tras 5 minutos y una vez comprobada la sedación del animal se ha inyectado 50 mg/kg ip de ketamina (Ketolar 500®, Pfizer, Madrid, España). Finalmente se ha inyectado 0,02

mg/kg im de atropina (Atropina® Braun, España) a los 3 minutos de administrar la ketamina (Figura 4).

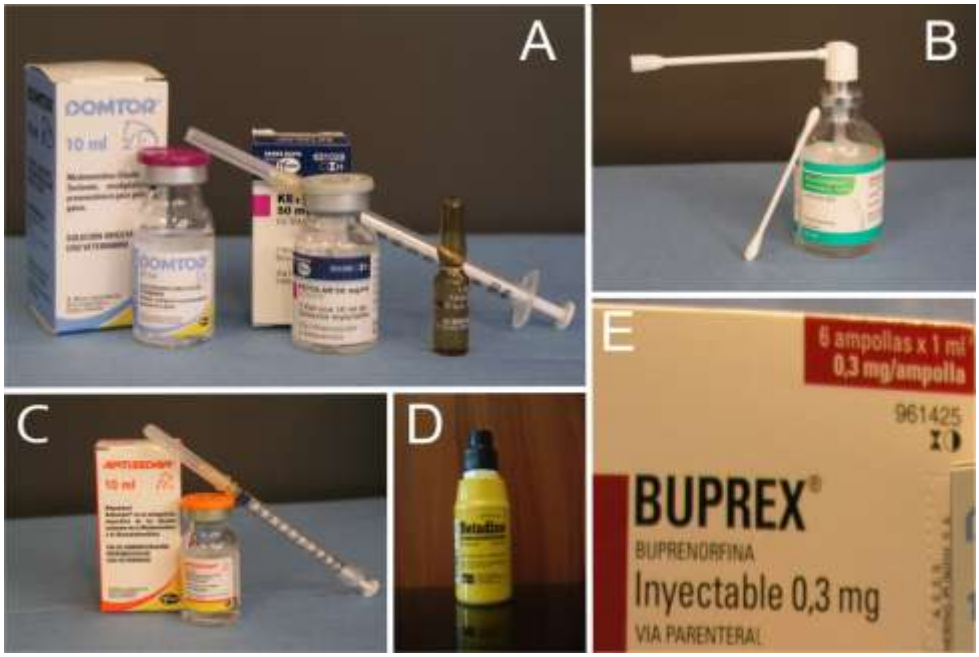


Figura 4. Fármacos utilizados. A: Domtor®, Ketamina® y atropina®. B: Xilonibsa®. C: Antisedan®. D: Betadine®. E: Buprex®.

Transcurridos 10 minutos de la inducción anestésica se ha procedido al rasurado de la piel del hemitórax izquierdo. Tras esto, se ha realizado la intubación orotraqueal del animal (Figura 5) según la técnica descrita por Weksler *et al*. {Weksler B. *et al*, 1994}.

Figura 5. Intubación orotraqueal. Técnica descrita por Weksler *et al*. {Weksler B. *et al*, 1994}.

Para prevenir el espasmo de la musculatura laringea, se ha aplicado al final de la faringe lidocaína 2% (Xylonibsa®, Inibsa, Barcelona, España) (Figura 4) con una torunda de algodón impregnada. Para localizar los cartílagos aritenoides, se ha deprimido la base lingual con otra torunda de algodón y se ha introducido entre dichos cartílagos una guía de teflón de punta roma en el interior de la laringe hasta una profundidad aproximada de 0,7 cm. A través de la guía mencionada, se ha introducido un cateter intravenoso de 16 G x 51 mm (Abbocath®-T, Abbot Ireland Ltd., Sligo, Irlanda) en la traquea y se ha deslizado sobre la guía hasta una distancia de 3-5 mm cranealmente a la carina. Tras retirar la guía de la boca del animal, el cateter se ha asegurado al maxilar superior para evitar su desplazamiento durante la intervención.

El animal se ha posicionado en decúbito lateral derecho y se ha fijado el miembro torácico izquierdo en extensión completa aplicando tensión con una ligadura alrededor del carpo (Figura 6).

Figura 6. Posición del animal.

Se ha ventilado al animal con un ventilador SERVO 900 (Siemens S.A., Madrid, España) (Figura 7) con un volumen corriente de 1 ml/100 g., concentración fraccional de oxígeno de 0.21, presión final espiratoria de 2cm de H_2O, frecuencia respiratoria de 60 resp./minuto y tiempo inspiratorio de 0.4 seg.

Figura 7. Ventilador SERVO 900.

Una vez comprobada la estabilidad respiratoria del animal y la consecución de un adecuado plano anestésico (ausencia de movimientos voluntarios respiratorios, no presencia de distrés respiratorio, coloración de mucosas normales y la ausencia de reflejo parpebral y patelar), se ha realizado una toracotomía posterolateral izquierda. Para ello con bisturí número 20, se ha realizado una incisión en la piel de 4 cm a la altura del 4-5º espacio intercostal (aproximadamente 3 cm en dirección craneal a partir del borde costal). Con tijeras de Mayo se ha realizado una disección roma del plano subcutáneo hasta visualizar el *latíssimus dorsi* y los músculos *serratus dorsalis y ventralis*, los cuales se han seccionado exponiéndose de este modo las costillas y la musculatura intercostal (Figura 8).

Figura 8. Toracotomía posterolateral izquierda. Disección por planos exponiéndose costillas y musculatura intercostal.

En la musculatura intercostal, a nivel del 4º y 6º espacio intercostal, se han realizado 2 incisiones de 3mm a modo de ojales con una microtijera de Müller (Figura 9). A través de estos ojales se ha introducido una tijera de baby-Metzenbaum con la que se ha fracturado el 5º y 6º arco costal dejando una separación de 3-4 mm entre los bordes superior e inferior de cada arco costal fracturado. Los dos fragmentos costales se han retirado en bloque, junto con la porción de musculatura intercostal, con unas pinzas de Adson.

Figura 9. Realización de segunda incisión. Incisión de 3 mm con microtijera de Müller en el 4º espacio intercostal.

Tras la retirada del bloque (porción muscular y ósea seccionada), se ha originado una ventana en la parrilla costal de aproximadamente 4x4 mm (Figura 10). A través de la cual y tras tunelizar 2 cm el espacio subcutáneo del animal, se ha introducido un tubo de drenaje pleural de 8 french en el interior de la cavidad torácica (Figura 11).

Figura 10. Ventana en pared torácica. Separación de 3-4 mm entre los bordes de la fractura.

Figura 11. Colocación del drenaje pleural.

Se ha realizado una sutura continua de los planos musculares con sutura absorbible 4/0 polyglactin 910 (Vicryl®, Ethicon, Inc, Johnson and Johnson Intl, Brussels, Belgium) y una sutura de puntos simples de la piel con sutura no absorbible de 3/0 (Silkan®. B. Braun Surgical S.A. España).

Para revertir el plano anestésico se ha administrado 0,25 mg/kg im de atipamezol (Antisedan®, Pfizer, Madrid, Spain) (Figura 4). Con una jeringa de 10 ml, se ha aspirado a través del tubo de drenaje (Figura 12), creándose de este modo la presión negativa necesaria en la cavidad torácica. Cuando el animal ha presentado respiración espontánea, se ha procedido a retirar el drenaje y se ha suturado la piel de la zona de salida del mismo con un punto en U. Se ha efectuado la antisepsia de las incisiones realizadas en la piel con aplicación tópica de povidona yodada (Betadine®. Laboratorios Asta Médica, Madrid, España) (Figura 4). Finalmente y como analgésico, se ha administrado a todos los animales 0,03 mg/Kg/12h sc de buprenorfina (Buprex®,

Schering-Plough, Madrid, España) (Figura 4) durante las primeras 48 horas, administrando la primera dosis una hora después de la inyección de atipamezol.

Figura 12. Empleo del tubo de drenaje para lograr la presión negativa de la cavidad torácica.

4.- Evolución clínica en el periodo postoperatorio

Para valorar el estado de bienestar/dolor que han presentado los animales, se ha seguido el método objetivo de cuantificación de conductas indicadoras de dolor según Roughan J.V. y Flecknell,P.A. {Junqueira L. C. y Carneiro J., 2005}. Se ha calculado el índice de Valoración Conductas de Dolor (VCD) sumando el número de contracciones nerviosas o movimientos espasmódicos (*Twitch*) y las perdidas de equilibrio o caída (*Fall*) que han presentado los animales. Para ello, 3 animales de cada grupo han sido aleatorizados y se les ha observado diariamente durante 10 minutos a lo largo de los diferentes tiempos de estudio. Por otro lado, se han determinado las complicaciones quirúrgicas de los animales intervenidos valorando la presencia de dehiscencia precoz de la toracotomía (primeras 72 horas), infección de herida quirúrgica, neumotórax quirúrgico, edema pulmonar y hemotórax.

5.- Aplicación de ultrasonidos

Una vez transcurridas 24 horas de la fractura costal, los animales de los grupos de tratamiento han recibido USP con un emisor de ultrasonidos Sonopuls 490 (Enraf-nonius, Holanda). Se ha empleado una frecuencia de 3MHz, con un ERA de 0,5 cm^2 y un coeficiente de no uniformidad del haz (Beam non-uniformity Ratio: BNR) de 6. Ha sido aplicada un promedio de *peak* intensidad temporoespacial (SATP) de 0,5 W/ cm^2. Se han aplicado 3 tipos de energía ultrasónica pulsátil, denominándolo "3 dosis de USP": impulsos de 1 milisegundo (ms) cada 9 ms de pausa cuando se aplica USP con un 'Duty cycle' 10% (relación 1:10 y una intensidad resultante de 50 mW/ cm^2 I_{SATA}), 2 ms de impulso cada 8 ms de pausa cuando se aplica USP con un 'Duty cycle' 20 % (relación 1:5 y una intensidad resultante de 100 mW/ cm^2 I_{SATA}) y pulsos de 5 ms con 5 ms de pausa cuando se aplica USP con un 'Duty cycle' 50% (relación 1:1 y una

intensidad resultante de 250 mW/ cm^2 I_{SATA}). El tiempo total de administración diaria en cada animal ha sido de 3 minutos, 1 min/cm^2 de superficie al día, en sesión única de tratamiento hasta el momento de eutanasia. Denominamos en nuestro estudio a toda esta combinación de parámetros: USP (cuando agrupamos todas los tipos de duty cycle), USP10% cuando utilizamos un duty cycle 10%, USP20% para duty cycle 20% y USP50% con un duty cycle 50%. Para su administración, se han aplicado 4 ml de gel para transmisión de ultrasonidos (O.L.G. Suministros clínicos. Gran Canaria, España) en el transductor y se ha masajeado de manera circular una superficie de 3 cm^2 de la zona de la herida del animal (Figura 13).

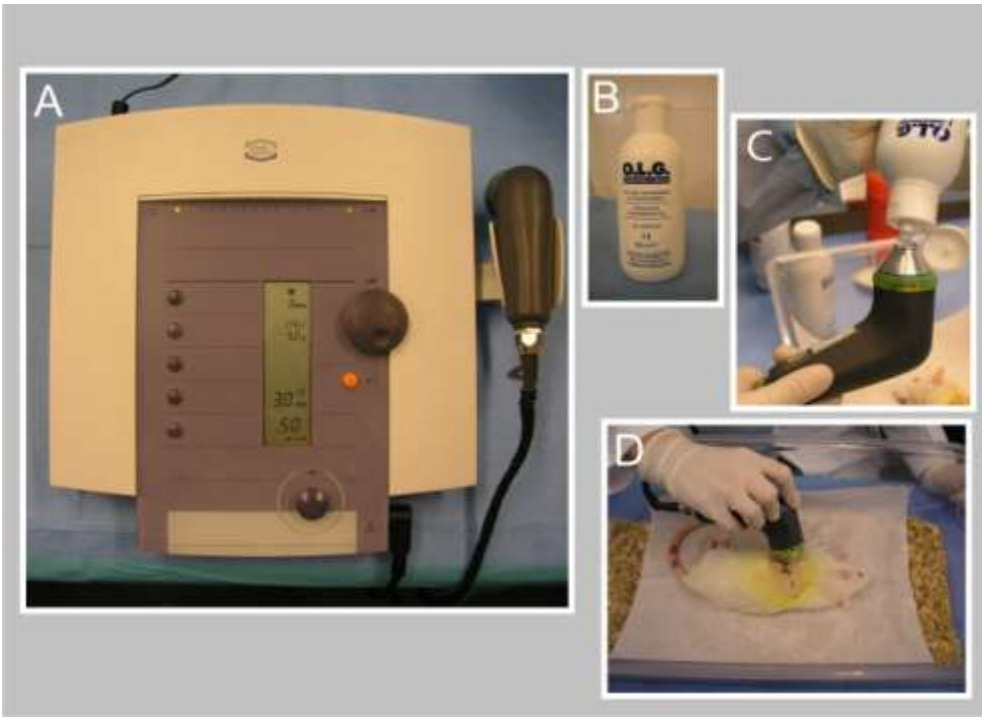


Figura 13. Aplicación de USP. A: Emisor de ultrasonidos Sonopuls 490. B: Gel transmisor de ultrasonidos. C: Aplicación de gel en el transductor. D: Administración de US en la rata

6.-Estudio radiológico e histológico

Cada animal de los subgrupos descritos en el apartado 2.1. ha sido anestesiado y se le ha extraido la parrilla costal izquierda para efectuar una radiografia latero-lateral de la misma y posterior toma de la muestra para su estudio histológico.

6.1 Estudio radiológico

Para ello, se ha procedido a la premedicación con 0,25 mg/kg sc de medetomidina. Tras 5 minutos y una vez comprobada la sedación del animal se ha inyectado 50 mg/kg ip de ketamina.

Tras comprobar un plano anestésico adecuado y con el animal en posición supina, se ha procedido a realizar una traqueotomía. Se ha realizado una sección a modo de ojal en la piel de la zona ventral del cuello. Se ha procedido a la disección de los planos musculares de la zona ventro-cervical, localizándose los dos músculos esternomastoideos. Tras separar dichos músculos se ha seccionado con una microtijera de Mayo los músculos esternohioideos, localizándose la cara ventral de la traquea. Se ha efectuado una disección roma de la traquea y entre dos anillos traqueales se ha efectuado una incisión por la que se ha introducido un cateter de 16 G x 51mm que se ha fijado con una ligadura a la pared traqueal.

Tras esto, se ha realizado una esternotomía media y una incisión paralela al borde costal desde la apófisis xifoides hasta los cuerpos vertebrales. Se ha seccionado el diafragma hasta la línea vertebral y se han desinsertado todas las costillas de dicho hemitorax a nivel de la articulación costo-vertebral. Se obtiene de este modo una parrilla costal que incluye las fracturas realizadas. Finalmente, los animales han sido eutanasiados mediante exanguinación por sección ventricular izquierda.

La parrilla, sobre una gasa húmeda con suero fisiológico, se ha colocado sobre un chasis (Ortho regular. Curix screens Agfa, Alemania) con película radiográfica (Ortho CP-G plus. Agfa-Gevaert N.V. Bélgica). A dicha parrilla costal se le ha efectuado una radiografía en proyección latero-lateral con un equipo portátil de rayos X Siemens Mobilett II (Siemens S.A., Madrid, España) (Figura 14). Los parámetros de exposición radiográfica han sido 55 Kv y 3,2 mAs, con una distancia focal de 100 cm.

La valoración radiológica se ha efectuado a doble ciego. Las imágenes obtenidas han sido clasificadas en función de la densidad de tejido óseo, la alineación y acercamiento de los fragmentos, así como la existencia o no de reacción perióstica, en 3 categorías:

a) *No callo*: ausencia de zona radiodensa (se objetiva una imagen lineal negra) en los márgenes de la fractura, así como separación y/o no aposición de los fragmentos de la fractura.

b) *Callo incipiente*: presencia moderada de zona radiodensa (aumento de densidad grisácea) y reacción perióstica con moderado acercamiento de los fragmentos.

c) *Callo formado*: presencia manifiesta de zona radiodensa (aumento de densidad blanca de similar densidad al hueso sano) y reacción perióstica con manifiesto acercamiento de los fragmentos.

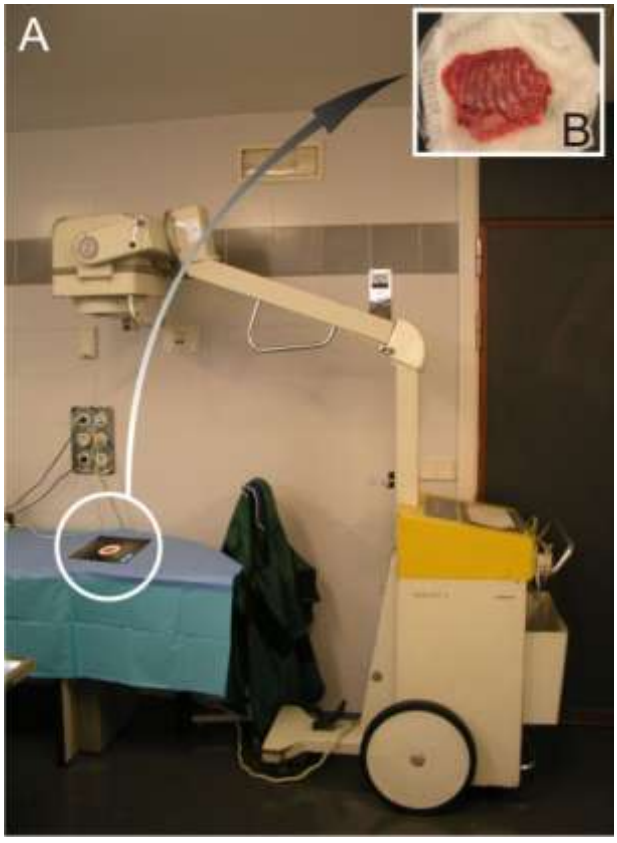


Figura 14. Toma radiográfica.
A: Equipo portátil de rayos X: Siemens Mobilett II
B: Detalle ampliado de parrilla costal en placa de petri sobre chasis.

6.2 Estudio histológico

Tras la toma radiográfica, se ha procedido a localizar en la parrilla costal la zona de factura bajo magnificación de imagen con un microoscopio quirúrgico Zeiss OPMI 9-12,5 (Carl Zeiss Microimaging S.L., Barcelona, España). Se ha extraido un fragmento de una longitud de 2-3 mm que incluye los dos márgenes (dorsal y ventral) de cada uno de los dos arcos costales fracturados. Estas muestras han sido fijadas en formol tamponado al 10% a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras esto, se han deshidratado mediante un procesador automático de tejidos (Leica, TP-1050, Leica Instruments, Gmbh, Nussloch, Alemania). Posteriormente se incluyeron en parafina por medio de un dispensador de parafina (Leica, Reichert-Jung Histoembedder, Leica Instruments, Gmbh, Nussloch, Alemania) (Figura 20) y finalmente se realizaron cortes histológicos con un microtomo (Leica, LR-2055, Leica Instruments, Gmbh, Nussloch, Alemania) (Figura 15) de 5 µm de grosor para su tinción rutinaria mediante la técnica de Hematoxilina y Eosina.

Figura 15. Procesado para estudio histológico. A: Dispensador de parafina. B: Microtomo.

Las muestras histológicas han sido estudiadas a doble ciego con un microscopio óptico Olympus BX50 (Olympus España S.A., Madrid, España) (Figura 16) y se han clasificado según la presencia de hemorragia, infiltrado inflamatorio y formación de tejidos cartilaginoso y óseo, en 3 categorías:

a) *Inflamación*: caracterizada por la presencia de hemorragia e infiltrado inflamatorio, y tejido cartilaginoso ausente o poco relevante.

b) *Reparación*: caracterizada por la presencia, en la zona de fractura, de tejido cartilaginoso, y cambios óseos reactivos en la vecindad.

c) *Remodelación*: presencia de tejido óseo con signos de remodelación (con frecuentes osteoblastos y osteoclastos), con perfilamiento de los bordes del callo óseo.

Figura 16. Microscopio óptico Olympus BX50.

7.- Estudio de expresión génica

A cada animal de los subgrupos descritos en el apartado 2.2. se les ha extraído el foco de fractura costal de la misma manera descrita en el apartado 6.2. Tras la extracción, las muestras obtenidas se han pesado y se han congelado inmediatamente en nitrógeno líquido almacenándose a -70 ºC para su posterior estudio.

7.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Las muestras se han homogeneizado en Tri-Reagent (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) en frio (4ºC), con un homogenizador Polytron PT-3100 (Kinematica AG, Basel, Switzerland) y un vástago de 12 mm PT-DA 3012/2T (Kinematica AG, Basel, Switzerland) (Figura 17), que ha girado a 28000 rpm durante 30 segundos.

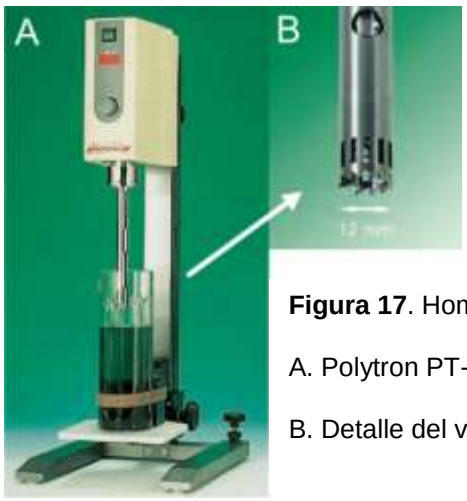


Figura 17. Homogeneizador.

A. Polytron PT-3100.

B. Detalle del vástago PT-DA 3012/2T.

En la extracción del RNA total con Tri-Reagent®, que se basa en una modificación comercial del método clásico descrito por Chomczynski y Sacchi {Chomczynski P. y Sacchi N., 1987}, se han seguido las instrucciones del fabricante con una modificación en el método consistente en añadir ¼ de Citrato Na/NaCl y ¼ de Isopropanol por unidad de volumen inicial de Tri-Reagent en la primera precipitación.

Una vez obtenido el RNA, se ha cuantificado su pureza química mediante espectrofotometría a través de la absorbancia (A) de la muestra a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}) y el posterior cálculo del ratio A_{260}/A_{280}. Hemos aceptado aquellas muestras que presentaban un ratio comprendido en el intervalo 1,5-2,2. Para ello se ha utilizado un espectrofotómetro Beckman (DU 640, Beckman Instruments, Fullerton, CA) (Figura 18). Con la finalidad de comprobar la integridad del RNA se ha procedido al cálculo de la relación entre las bandas ribosomales 28 Svedberg (S) y 18 S que se observan en una

electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa al 1,2% (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) mediante tinción con bromuro de etidio (0,625 mg/ml). Se han aceptado aquellas muestras que han presentado una relación 28S/18S dentro del intervalo 1,2-2.

Figura 18. Espectrofotómetro Beckman DU 640. Beckman Instruments, Fullerton, CA.

Una vez comprobada la calidad de las muestras de RNA, estas han sido tratadas con 2 µl de RQ1 DNAse (1U/µl, Promega, Madison, WI) para eliminar posibles impurezas de DNA. Para la síntesis del cDNA, se ha utilizado el Kit Promega (Promega, Madison, WI, USA) y de acuerdo con las recomendaciones del proveedor, 2µg de RNA total han sido diluidos en un volumen final de 25µl junto con los oligonucleótidos *primers* oligo-(dT)15 (Promega, Madison, WI,USA), dNTPs transcriptasa reversa de MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) (Pharmacia Biotech) y el resto de los componentes que recomienda el fabricante del kit. Con un termociclador (Thermomixer confort, Eppendorf AG, Hamburg, Alemania) (Figura 19) se ha mantenido la mezcla a 25ºC durante 5 minutos para permitir el correcto anillamiento (annealing) de los primers y a 42ºC durante 1 hora para producirse la extensión. Finalmente las muestras se han mantenido a 70ºC durante 15 minutos con el propósito de inactivar la transcriptasa reversa. Las muestras de cDNAs fueron conservadas a –80 °C.

Figura 19. Termociclador. Thermomixer confort

7.2 Determinación de la expresión génica mediante qRT-PCR en tiempo real

La determinación de la expresión de los genes objetos de estudio, se ha realizado mediante qRT-PCR en tiempo real. Se ha utilizado un termociclador de capilares LightCycler® 1.5 (Roche, Mannheim, Alemania) (Figura 20) y el kit "LightCycler FastStart DNA Master Sybr Green I" (Roche, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Figura 20. Termociclador de capilares LightCycler® 1.5.

Los genes de estudio y el gen housekeeping {Radonić A. *et al*, 2004} RNA polimerasa II subunidad a (Polr2a) fueron amplificados simultáneamente**.** Los *primers* específicos para cada gen han sido diseñados a partir de las secuencias de RNAm de rata utilizando el programa online Primer3 {Rozen S. y Skaletsky J. H., 2000}. Los *primers* sentido (*primer forward*, PF) y antisentido (*primer reverse*, PR) que se han usado para cada uno de los genes de estudio y Polr2a, se muestran en la Tabla IV. La secuencia de nucleótidos utilizada para construir los *primers* aparece en *GenBank* en NCBI con los números de acceso que se muestran en la Tabla IV. Se han optimizado las T_a, el tiempo de extensión en segundos (s) y la concentración de $MgCl_2$ para cada uno de ellos (Tabla IV). La temperatura y tiempo de desnaturalización en todos los genes, ha sido de 95ºC y 10 minutos. La especificidad de los *primers* ha sido comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, confirmando el tamaño de banda esperado. Los productos amplificados se han analizado mediante el análisis de la curva de *melting* que permite la identificación y diferenciación de las variantes genéticas.

La cuantificación relativa de la expresión génica ha sido realizada mediante la determinación del C_T. Los valores C_T se han determinado por triplicado, y el cálculo de

la expresión (E) de cada gen se ha obtenido a partir de la siguiente fórmula E=MCT/MPolr2a, donde MCT es la media aritmética de los 3 valores de C_T del gen en cuestión de cada muestra y MPolr2a es la media aritmética de los 3 valores de C_T del gen Polr2a de cada muestra.Los resultados obtenidos han sido analizados utilizando el software de LightCycler versión 3. 5. 3 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se han corregido mediante el gen Polr2a como housekeeping gene {Radonić A. *et al*, 2004}.

Tabla IV: Genes, secuencias de los *primers* y condiciones de la qRT-PCR en tiempo real.

Gen	Función del gen	Nº GenBank	Primers (5´-3´)	Condiciones y ciclos	Longitud del producto (pb)
Polr2a	RNA polimerasa II subunidad a	XM_343922	PF: CAGGCAAGCAAATCTTCTCC PR: ACCAGAGAGCCTGCTGATGT	2,25mM $MgCl_2$ 58 ºC T_a 8 s extensión 40 ciclos	199
Igf1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1	NM_001082479	PF: TCTGAGGAGGCTGGAGATGT PR: GTTCCGATGTTTTGCAGGTT	3,0 mM $MgCl_2$ 58 ºC T_a 5 s extensión 45 ciclos	240
Vegfa	Factor de crecimiento vascular endotelial	NM_031836	PF: GCCCATGAAGTGGTGAAGTT PR: TATGTGCTGGCTTTGGTGAG	3,0 mM $MgCl_2$ 60 ºC T_a 5 s extensión 45 ciclos	243
Tgfb1	Factor de crecimiento transformante beta 1	NM_021578	PF: TGAGTGGCTGTCTTTTGACG PR: TGGGAGTGATCCCATTGATT	3,0 mM $MgCl_2$ 58 ºC T_a 5 s extensión 50 ciclos	146
Col2a1	Colágeno tipo2 alpha 1	NM_012929	PF: GGACCCCCAGGTTCTAATG PR: CTCCAGGTTCGCCTTTCTCT	3,0 mM $MgCl_2$ 62 ºC T_a 5 s extensión 45 ciclos	166
BMP2	Proteina morfogenética ósea 2	NM_017178	PF:CTCAGCGAGTTTGAGTTGAGG PR:GAAGTTTTCCCACTCATTTCTG	3,0 mM $MgCl_2$ 58 ºC T_a 5 s extensión 40 ciclos	239
Mmp3	Metalopeptidasa de matriz 3	NM_133523	PF: GGAAGGCGTCGTGTGTTTC PR:TGTAGCCCAGGAGTGTGTTTTC	3,0 mM $MgCl_2$ 64 ºC T_a 8 s extensión 40 ciclos	213
Socs2	Supresor de señalización de citoquinas 2	NM_058208	PF: GACGGGAAATTCAGATTGGA PR: AATGCTGAGTCGGCAGAAGT	2,5 mM $MgCl_2$ 64 ºC T_a 5 s extensión 50 ciclos	213
Socs3	Supresor de señalización de citoquinas 3	NM_053565	PF: CCTTTGAGGTTCAGGAGCAG PR: CGTTGACAGTCTTCCGACAA	2,5 mM $MgCl_2$ 64 ºC T_a 5 s extensión 50 ciclos	165
MCP-1	Proteina quimiotáctica de monocitos 1	NM_031530	PF: CAGTTAATGCCCCACTCACC PR: TTCCTTATTGGGGTCAGCAC	3,0 mM $MgCl_2$ 63 ºC T_a 5 s extensión 45 ciclos	164

8.- Análisis estadístico

El análisis de los datos se efectuó con el paquete estadístico SPSS, versión 15.0 para Windows (Copyright © 2005, SPSS Inc. Illinois, USA). El nivel de significación estadística se estableció para una α=0.05.

Las variables cualitativas se han analizado mediante las frecuencias absolutas y relativas de la aparición de cada una de las categorías. Se muestran los OR con sus intervalos de confianza al 95%.

Las variables cuantitativas (expresión génica) se muestran como media y su desviación típica (DT), excepto en Mmp3 que se ha utilizado la mediana con un máximo y un mínimo. La media o mediana se ha calculado a partir de los valores de los 6 animales de cada grupo, normalizados mediante el grupo control de cada uno de los tiempos. Las diferencias en la expresión de los genes según el grupo, se contrastaron mediante el test de la U de Mann-Whitney para dos muestras independientes; excepto en Mmp3 que se ha realizado con la prueba de la mediana.

Resultados

En todos los animales intervenidos quirúrgicamente (n=136), la recuperación anestésica ha sido satisfactoria. Los animales han presentado movimientos respiratorios espontáneos y el reflejo ocular en los 2 primeros minutos posteriores a la administración de atipamezol. La posición fisiológica y la deambulación se ha recuperado entre los 3 y los 5 minutos. Ningún animal ha presentado signos de dolor o malestar durante el periodo de observación postoperatorio.

Del total de 136 animales, 88 animales han sido destinados al estudio radiológico e histológico y 48 animales al estudio génico. De los 88 animales del estudio radiológico e histológico han fallecido 3 y han sido retirados del estudio: 1 del grupo control de 20 días, 1 del grupo control de 28 días y 1 del grupo USP 10% (50 mW/cm^2) de 20 días. La muerte se ha producido en las primeras 24 horas tras la cirugía y se ha debido a problemas relacionados con la técnica quirúrgica como un hemotórax y dos neumotórax quirúrgicos, no bien drenados.

Se han observado complicaciones postoperatorias en el 4,41% de los animales intervenidos que se han resuelto satisfactoriamente. Estas complicaciones han sido 3 neumotórax quirúrgicos con enfisema subcutáneo localizado, 2 dehiscencias precoces de las toracotomías y 1 infección de herida quirúrgica. Los neumotórax se han resuelto mediante punción-aspiración del plano submuscular con jeringa y aguja intramuscular. Las infecciones de la herida quirúrgica se han resuelto con desbridamiento del tejido y desinfección del mismo con povidona yodada y posterior resutura por planos.

1.- ESTUDIO RADIOLÓGICO

1.1 Efecto del tratamiento con USP

El estudio radiológico se ha efectuado en 85 animales, de los cuales 38 no han sido tratados y 47 han sido tratados con USP. Los hallazgos radiológicos se muestran en la Tabla V.

Tabla V. Efecto del tratamiento en 3 categorías radiológicas

Callo Rx	Control	USP	p
No callo	28 (73,7%)	19 (40,42%)	
Callo incipiente	10 (26,31%)	18 (38,3%)	0,001
Callo formado	0	10 (21,3%)	

Se ha observado un predominio del callo óseo incipiente y/o formado en los animales tratados con USP frente a los no tratados con diferencias estadísticamente significativas (p=0,001).

En la figura 21 se muestran las radiografías de un animal control y de dos animales tratados con USP a los 28 días de la fractura.

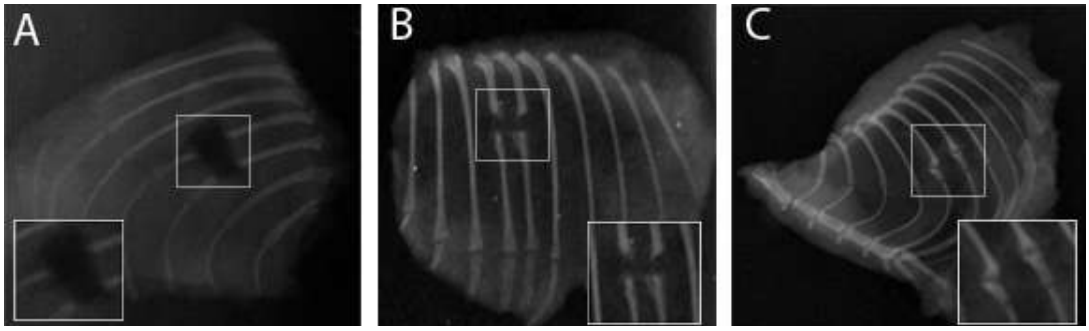


Figura 21. Imágenes de las 3 categorias radiológicas.

*A. **No callo**: se observa ausencia de zona radiodensa en los márgenes de la fractura, así como separación de los fragmentos de la fractura (control a los 28 días).*

*B. **Callo incipiente**: se objetiva moderada zona radiodensa y reacción perióstica con moderada aproximación de los fragmentos (animal tratado con 10% de USP a los 28 días).*

*C. **Callo formado**: se observa manifiesta zona radiodensa y reacción perióstica con manifiesta aproximación de los fragmentos (animal tratado con 10% de USP a los 28 días).*

Se ha valorado la formación de callo óseo agrupando el callo óseo incipiente y formado considerándolos como "si callo" (tabla VI). De forma que los animales que han sido tratados con USP han presentado callo óseo en un 59.6% frente al 26,3% de los animales no tratados siendo estas diferencias estadísticamente significativas (p=0,002). El odds ratio (OR) para la formación de callo óseo radiológico en los animales tratados con USP ha sido de 4,1 (1,6-10,4 IC 95%).

Tabla VI. Efecto del tratamiento en 2 categorías radiológicas

Callo Rx	Control	USP	p
No callo	28 (73,7%)	19 (40,4%)	0,002
Si callo	10 (26,3%)	28 (59,6%)	

1.2 Efecto de las diferentes dosis de tratamiento

Se ha valorado el efecto radiológico de las diferentes dosis de USP aplicadas sobre el foco de fractura que se muestra en la tabla VII.

Tabla VII. Efecto de las dosis de tratamiento

Dosis	Callo		OR (IC 95%)
	No	Si	
10% USP (50 mW/cm^2)	4 (26,7 %)	11 (73,7%)	7,7 (1,9-29,7)
20% USP (100 mW/cm^2)	5 (31,3%)	11 (68,8%)	6,1 (1,7-22,1)
50% USP (250 mW/cm^2)	10 (62,5%)	6 (37,5%)	1,6 (0,4-5,8)

El OR para la formación de callo óseo ha sido significativo tanto para la dosis de 10% como para la dosis de 20% de USP, no siendo así con la dosis del 50%, de forma que la magnitud del OR ha ido disminuyendo a medida que aumenta la dosis de USP administrada.

1.3 Efecto del tiempo sobre la consolidación radiológica

El 81% de los animales del estudio han presentado callo óseo a los 28 días (figura 22), de los cuales 1 era un animal del grupo control y 11 eran animales tratados con USP.

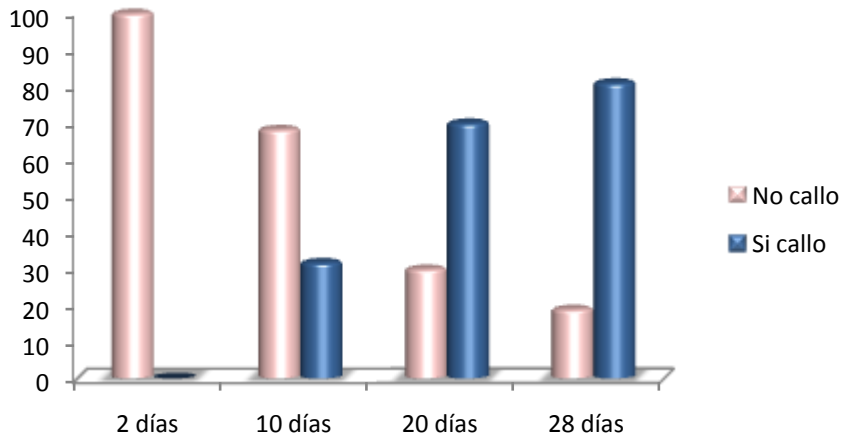


Figura 22. Efecto del tiempo en la formación del callo

Se ha observado como a los 2 días no existe formación de callo óseo ni en los controles ni en los tratados. A los 10 días el 58,3 % de los animales tratados sí presenta callo óseo mientras que los animales no tratados continúan a este tiempo sin formar callo óseo. A los 20 días los animales tratados presentan un 90,9 % de callo óseo, mientras los no tratados solo forman callo en un 44,4%. A los 28 días los animales tratados alcanzan el 91,7 % de formación de callo óseo mientras que los no tratados el 66,7%.

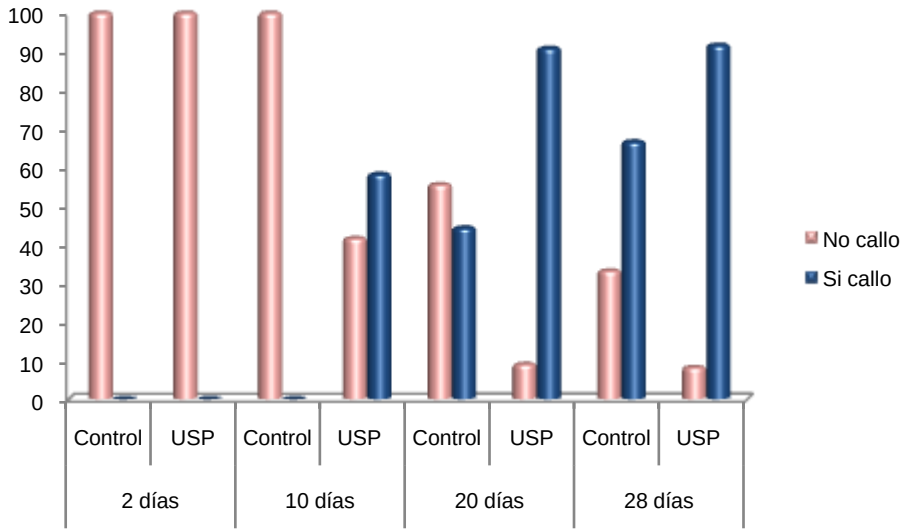


Figura 23. Efecto de los tiempos de tratamiento en la formación del callo radiológico.

Se ha tomado el tiempo de 10 días como punto de corte para la formación del callo óseo y se han establecido los siguientes grupos: menor o igual a 10 días (2 y 10 días) y mayor de 10 días (20 y 28 días) según se muestra en la tabla VIII.

Tabla VIII. Efecto del tiempo de tratamiento

Tiempo	Grupo	Callo		OR (IC 95%)
		No	Si	
≤ 10 días	**Control**	20 (100%)	0	1,4 (1-1,8)
	USP	17 (70,83%)	7 (29,16%)	
> 10 días	**Control**	8 (44,44)	10 (55,55)	5,1 (1,2-21,1)
	USP	2 (8,7%)	21 (91,3%)	

El OR para la formación de callo óseo radiológico en los animales tratados menos de 10 días ha sido de 1,4 (1,1-1,8 IC 95%), siendo de 5,1 (1,2-21,1 IC 95%) cuando se han superado los 10 días de tratamiento con USP.

A tiempos inferiores de 10 días, la formación de callo óseo es mayor con dosis de 10% y 20%, observando un 50% y 37,5 % de formación de callo óseo respectivamente. Ninguno de los animales controles y ninguno de los tratados con 50% han presentado callo óseo a estos tiempos inferiores a 10 días.

Por encima de 10 días todos los animales tratados con 10% y 20% (50 y 100 mW/cm^2 respectivamente) presentan callo óseo. El 75 % de los animales tratados con 50% presentan callo y solo el 55,6 % de los animales no tratados presentan callo óseo (figura 24).

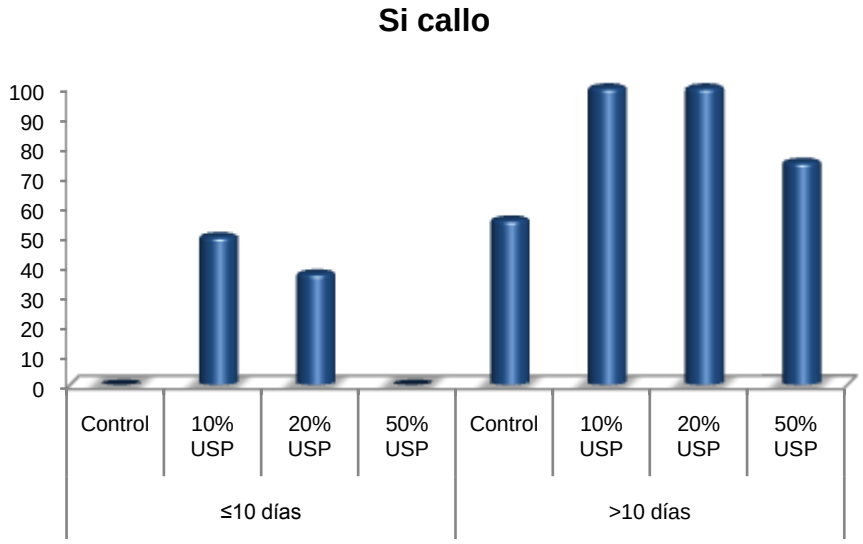


Figura 24. Animales que presentan callo radiológico según el tiempo y la dosis aplicada.

2.- ESTUDIO HISTOLÓGICO

2.1 Influencia del tratamiento con USP

El estudio histológico se ha realizado con los mismos animales del estudio radiológico (n=85). Se ha observado un predominio del callo óseo en fase de reparación y/o remodelación en los animales tratados con USP frente a los no tratados con diferencias estadísticamente significativas (p=0,001) (tabla IX).

Tabla IX. Influencia del tratamiento en 3 categorías histológicas

Estudio histológico	Control	USP	p
Inflamación	28 (73,7%)	16 (34%)	
Reparación	9 (23,7%)	23 (48,9%)	0,001
Remodelación	1 (2,6%)	8 (17%)	

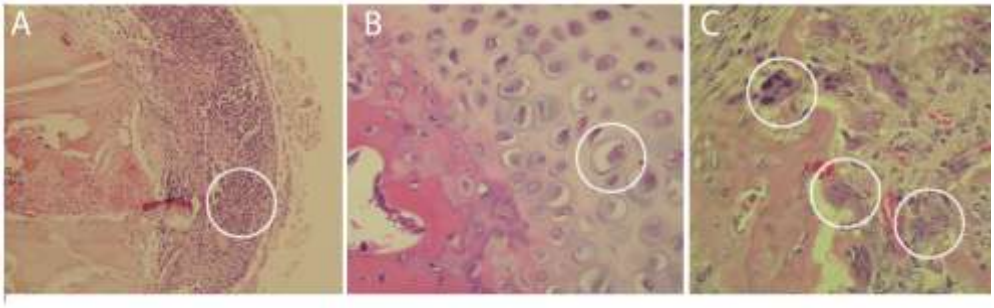


Figura 25. Imágenes de las 3 categorias histológicas.

*A. **Inflamación**: hemorragia e infiltrado inflamatorio (control a los 28 días). Se destaca con un círculo el tejido inflamatorio.*

*B. **Reparación**: tejido cartilaginoso (animal tratado con USP 10% a los 28 días). Se destaca un condrocito.*

*C. **Remodelación:** osteoblastos y osteoclastos (animal tratado con USP 20% a los 28 días). Se destacan los osteoclastos.*

Se ha valorado la formación de callo óseo agrupando el callo óseo en fase de reparación y remodelación como "si callo" y se ha denominado "no callo" a los que se encuentran en fase de inflamación (tabla X).

Tabla X. Influencia del tratamiento en 2 categorías histológicas

Estudio histológico	Control	USP	p
No callo	28 (73,7%)	16 (34%)	<0,001
Si callo	10 (26,3%)	31 (66%)	

Los animales tratados con USP han presentado callo óseo en un 66% frente al 26,3% de los animales controles siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$). El OR para la formación de callo óseo en los animales tratados con USP ha sido de 5,4 (2,1- 13,9 IC95%).

2.2 Influencia de las diferentes dosis de tratamiento

El OR para la formación de callo óseo histológico es significativo para todas las dosis de USP administradas. La magnitud del OR ha ido disminuyendo a medida que aumenta la dosis de aplicación de USP (tabla XI).

Tabla XI. Efecto de las dosis de tratamiento

Dosis	Callo		OR (IC 95%)
	No	Si	
10% USP (50 mW/cm^2)	4 (26,7%)	11 (73,7%)	7,7 (1,9-29,7)
20% USP (100 mW/cm^2)	5 (31,3%)	11 (68,8%)	6,1 (1,7-22,1)
50% USP (250 mW/cm^2)	7 (43,8%)	9 (56,3%)	3,6 (1-12,2)

2.3 Influencia del tiempo

A los 28 días se ha observado, al igual que en estudio radiológico, que el 81% de los animales han presentando callo óseo histológico (figura 26).

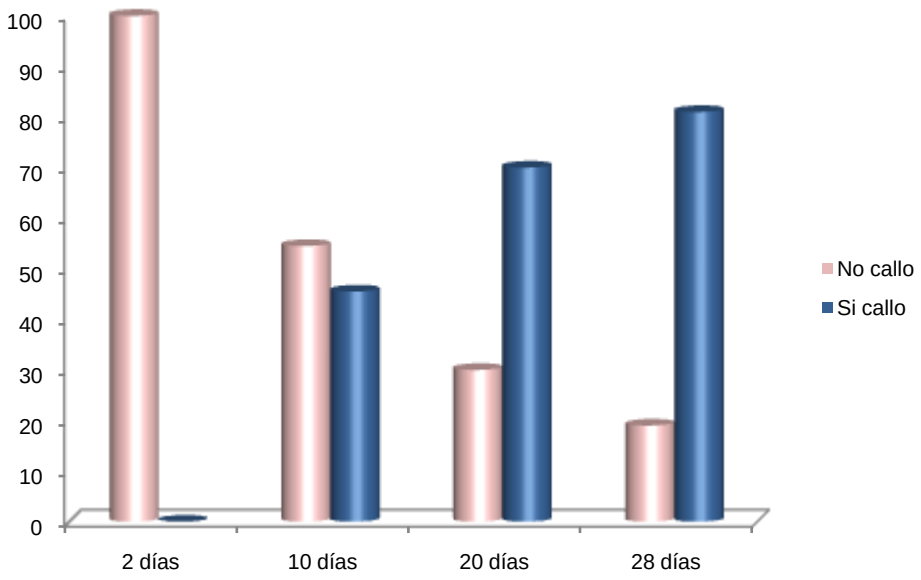


Figura 26. Influencia del tiempo en la formación del callo óseo.

Se ha observado que a los 10 días el 83,3% de los animales tratados han presentado callo óseo, a los 20 días el 90,9% y a los 28 días un 91,7% (figura 27).

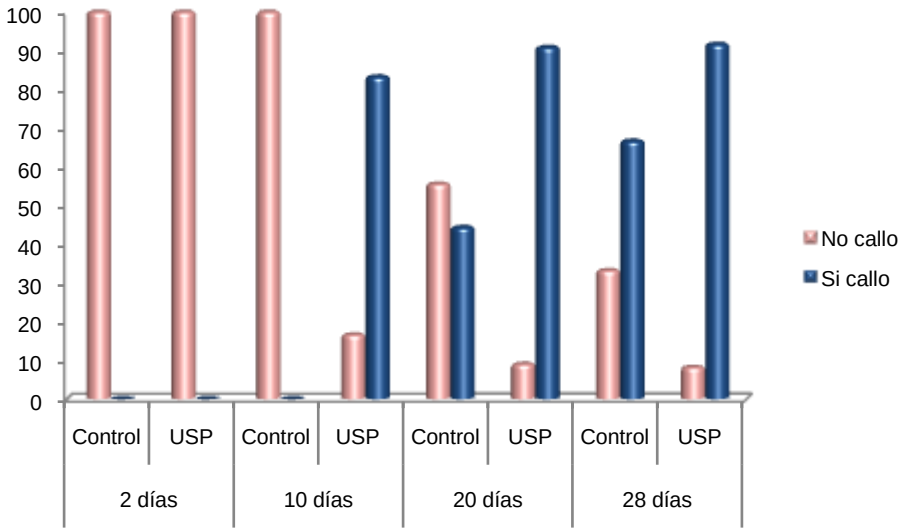


Figura 27. Influencia de los tiempos de tratamiento en la formación del callo óseo.

De la misma forma que para el estudio radiológico, se ha determinado los 10 días como punto de corte para la formación del callo óseo por lo que se han establecido los siguientes grupos: menor o igual a 10 días y mayor de 10 días según se muestra en la tabla XII.

Tabla XII. Influencia del tiempo y del tratamiento

Tiempo	Grupo	Callo		OR (IC 95%)
		No	Si	
≤ 10 días	**Control**	20 (100%)	0	1,7 (1,2-2,4)
	USP	14 (58,33%)	10 (41,66%)	
> 10 días	**Control**	8 (44,44)	10 (55,55)	5,1 (1,2-21,1)
	USP	2 (8,7%)	21 (91,3%)	

El OR para la formación de callo óseo en los animales tratados menos de 10 días ha sido de 1,7 (1,2-2,4 IC 95 %) siendo de 5,1(1,2-21,1) cuando se superan los 10 días de tratamiento con USP.

A tiempos inferiores de 10 días, la formación de callo óseo es del 50% con dosis de 10% de USP, observando que las dosis de 20 % y 50 % de USP presentan ambas un 37,5 % de formación de callo óseo. Ninguno de los animales controles ha presentado callo óseo a estos tiempos inferiores a 10 días.

Por encima de 10 días todos los animales tratados con 10% y 20% presentan callo óseo. El 75 % de los animales tratados con 50% presentan callo. Y sólo el 55,6 % de los animales no tratados presentan callo óseo (figura 28).

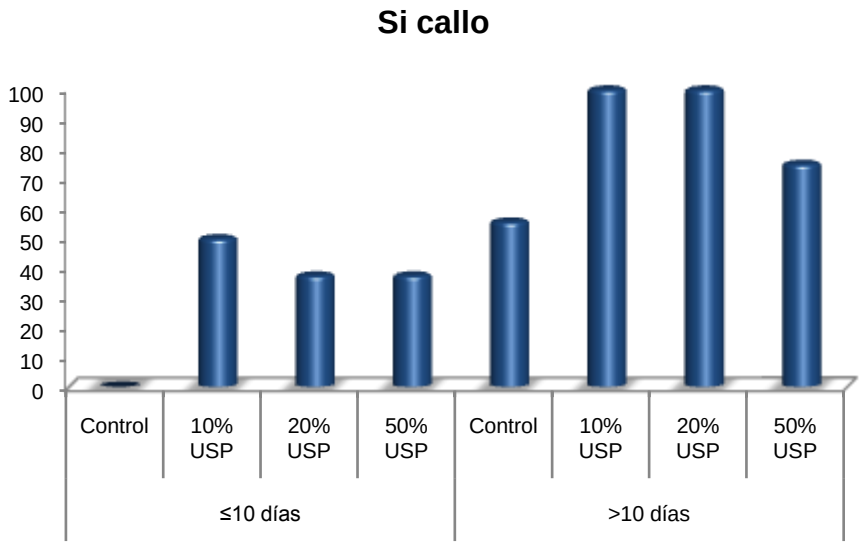


Figura 28. Animales que presentan callo histológico según el tiempo y la dosis aplicada.

3.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.1 Influencia del tratamiento con USP

La distribución de frecuencias de la expresión de los genes entre los animales no tratados y los tratados con USP se ha analizado en base a la media, con la excepción de Mmp3 que se ha valorado en base a la mediana tras ponderar todos los valores individuales con respecto a la media, o la mediana, del grupo control. Estos datos se reflejan en la tabla siguiente.

TABLA XIII. Expresión génica del callo óseo

Gen	Días	Control	USP	P
Igf1	10	1,00±0,19	1,47±0,37	0,008
	28	1,00±0,14	1,72±0,43	0,003
Tgfb1	10	1,00±0,20	1,07±0,23	0,373
	28	1,00±0,51	1,22±0,35	0,322
Col2a1	10	1,00±0,61	0,99±0,85	0,899
	28	1,00±1,13	0,93±1,62	0,563
Vegfa	10	1,01±0,26	1,17±0,46	0,703
	28	1,00±0,20	1,62±0,69	0,039
Mmp3	10	1,00 (0,71-2,35)	0,69(0,19-4,35)	0,378
	28	1,00 (0,56-5,41)	0,78(0,19-3,28)	0,635
BMP2	10	1,00±0,19	0,88±0,21	0,227
	28	1,00±0,29	1,15±0,32	0,283
Socs2	10	1,00±0,67	1,72±0,55	0,019
	28	1,01±0,63	1,98±0,55	0,010
Socs3	10	1,00±0,95	1,06±1,00	0,799
	28	1,01±0,65	1,70±0,93	0,137
MCP-1	10	1,00±0,91	0,71±0,70	0,181
	28	1,00±0,26	0,99±0,51	0,741

Las diferencias obtenidas entre animales no tratados y tratados ha sido significativa en la expresión de Igf1 a los 10 días (p= 0,008) y a los 28 días (p= 0,003), de Vegfa a los 28 días (p= 0,039) y de SOCS2 tanto a los 10 (p= 0,019) como a los 28 días (p= 0,010).

3.1.1.- Igf1

La expresión de Igf1 en los animales tratados con USP ha sido de 1,47±0,37 a los 10 días y 1,72±0,43 a los 28 días (figura 29), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Igf1 a los 10 días p=0,008, Igf1 a los 28 días p=0,003) respecto al grupo control.

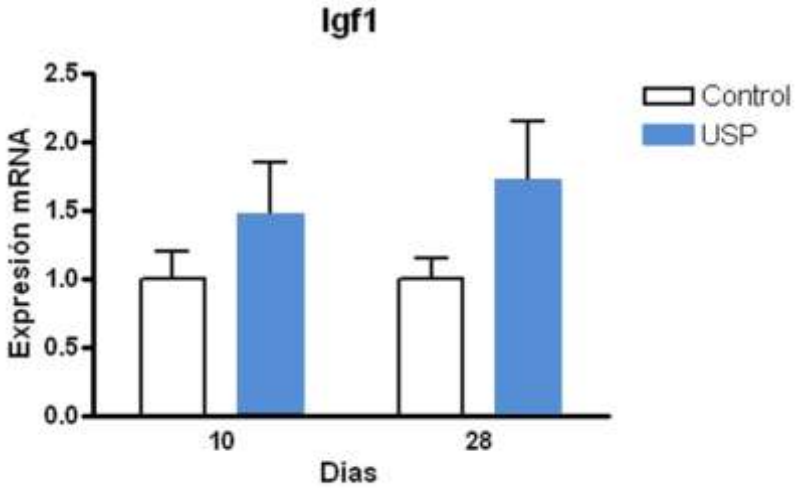


Figura 29. Expresión de Igf1 control *versus* USP.

3.1.2.- Tgfb1

La expresión de Tgfb1 en los animales tratados con USP ha sido de 1,07±0,23 y de 1,22±0,35 a los 10 y 28 días (figura 30), no existiendo diferencias estadísticamente significativas con el grupo control (tabla XIII).

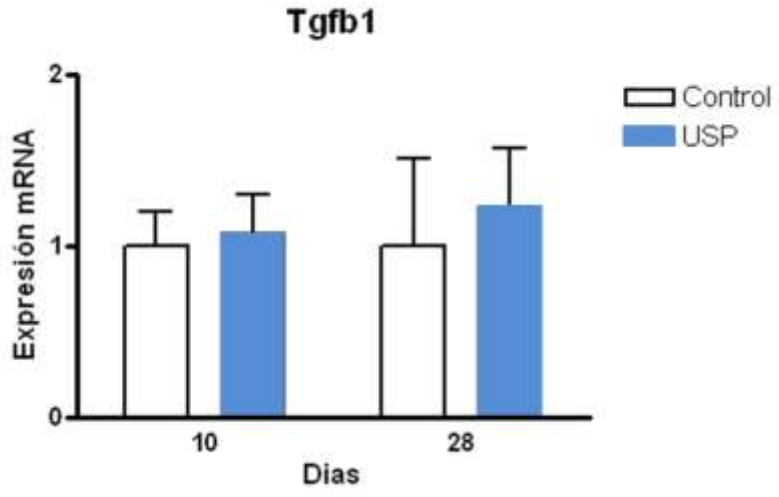


Figura 30. Expresión de Tgfb1 control *versus* USP.

3.1.3.- BMP2

La expresión de BMP2 en los animales tratados con USP ha sido de 0,88±0,21 y de 1,15±0,32 a los 10 y 28 días (figura 31), no existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (tabla XIII).

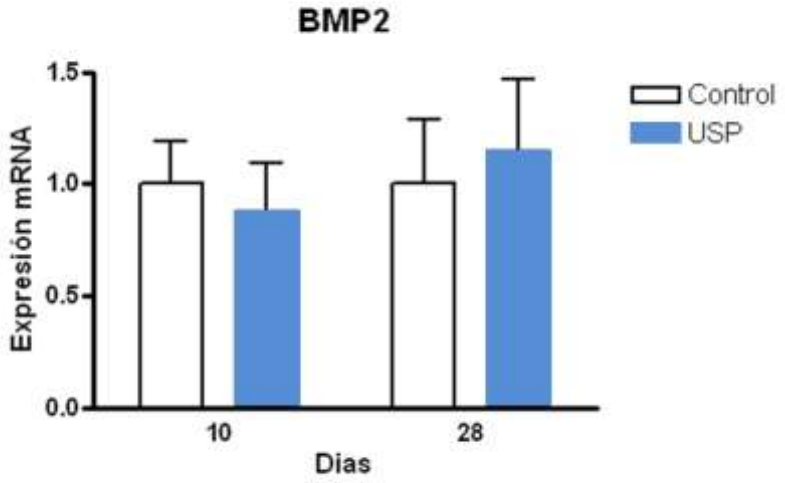


Figura 31. Expresión de BMP2 control *versus* USP.

3.1.4.- Vegfa

La expresión de Vegfa en los animales tratados con USP ha sido de 1,17±0,46 a los 10 días y 1,62±0,69 a los 28 días (figura 32), siendo esta última diferencia estadísticamente significativa (Vegfa a los 28 días p=0,039) respecto al grupo control.

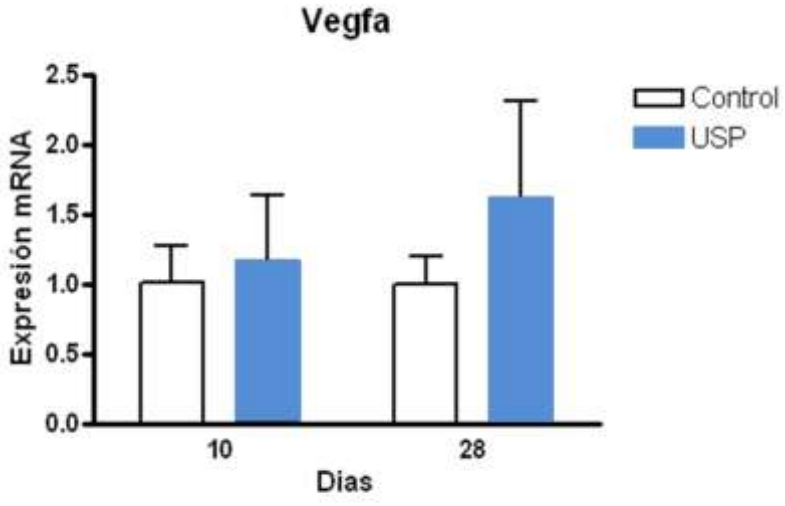


Figura 32. Expresión de Vegfa control *versus* USP.

3.1.5- Col2a1

La expresión de Col2a1 en los animales tratados con USP ha sido de 0,99±0,85 y de 0,93±1,62 a los 10 y 28 días (figura 33), no existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo control (tabla XIII).

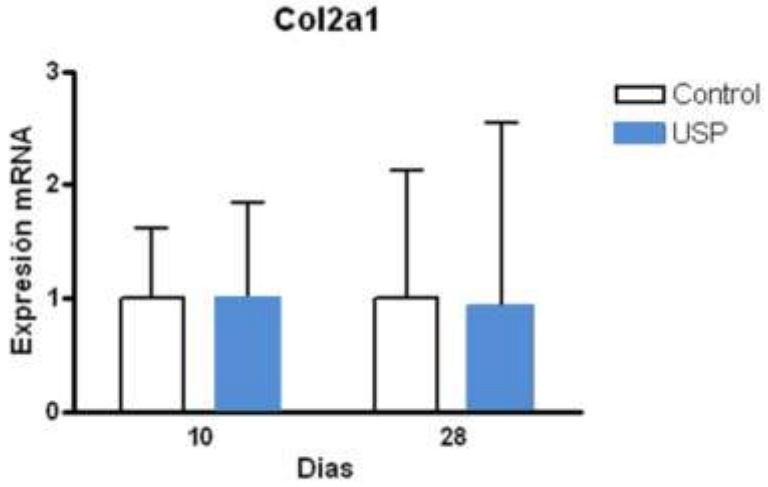


Figura 33. Expresión de Col2a1 control *versus* USP.

3.1.6- Mmp3

La expresión de Mmp3 en los animales tratados con USP ha sido de 0,69 y de 0,78 a los 10 y 28 días (figura 34), no existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (tabla XIII).

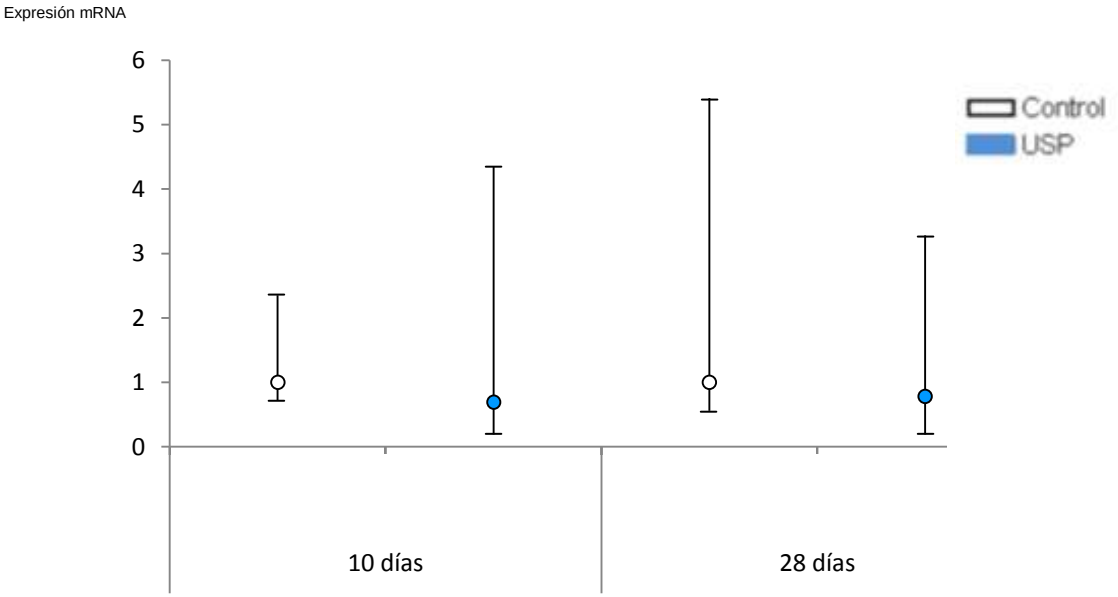


Figura 34. Expresión de Mmp3 control *versus* USP

3.1.7- Socs2

La expresión de Socs2 en los animales tratados con USP ha sido de 1,72±0,55 a los 10 días y 1,98±0,55 a los 28 días (figura 35), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Socs2 a los 10 días p=0,019, Socs2 a los 28 días p=0,010) respecto al grupo control.

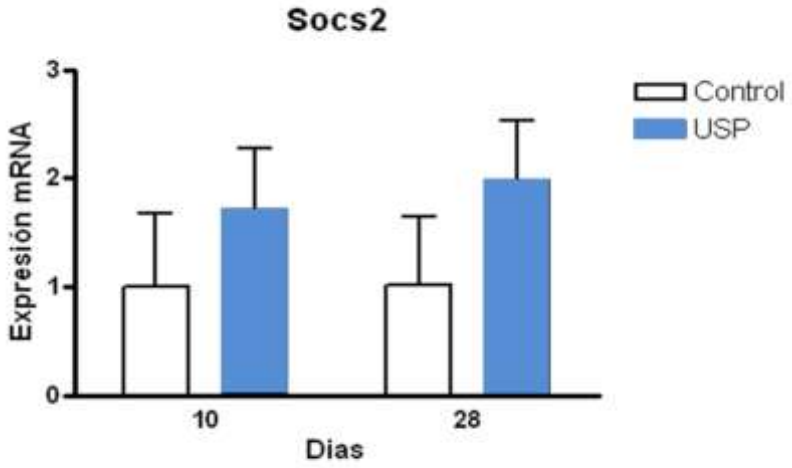


Figura 35. Expresión de Socs2 control *versus* USP.

3.1.8- Socs3

La expresión de Socs3 en los animales tratados con USP ha sido de 1,06±1,00 y de 1,70±0,93 a los 10 y 28 días (figura 36), no existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control. Aunque a los 28 días la expresión de Socs3 se ha incrementado con respecto a los controles no siendo estadísticamente significativa (tabla XIII).

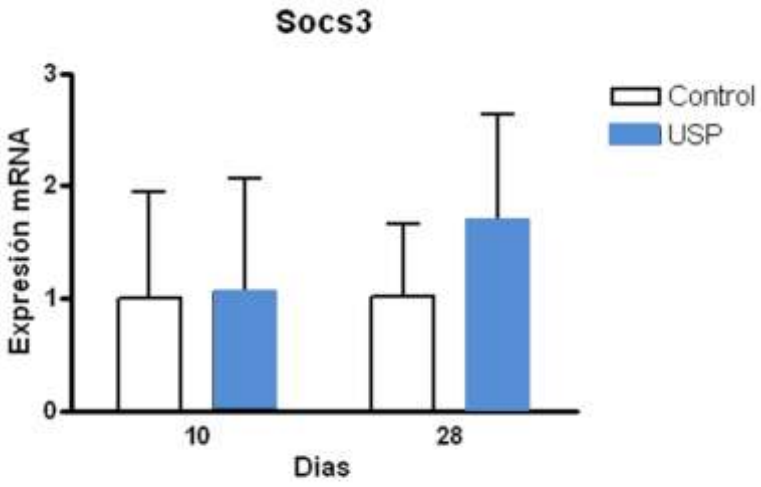


Figura 36. Expresión de Socs3 control *versus* USP.

3.1.9- MCP-1

La expresión de MCP-1 en los animales tratados con USP ha sido de 0,71±0,70 y de 0,99±0,51 a los 10 y 28 días (figura 37), no existiendo diferencias estadísticamente significativas, aunque a los 10 días se ha observado un incremento de la expresión de MCP-1 con respecto a los controles (tabla XIII).

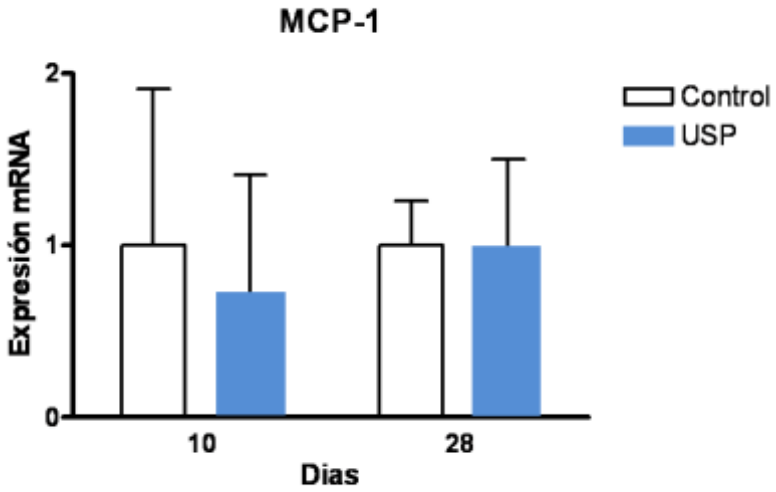


Figura 37. Expresión de MCP-1 control *versus* USP.

3.2 Influencia de las dosis de tratamiento con USP

Se ha estudiado si existen diferencias entre las dosis de USP administradas y la expresión de los genes que han sido analizados en base a la media, con la excepción de Mmp3 que se ha presentado en base a la mediana. Se muestra la tabla XIV.

TABLA XIV. Expresión génica del callo óseo según las diferentes dosis de tratamiento.

Gen	Días	Control	USP 10%	p	USP 20%	p	USP 50%	p
Igf1	10	1,00±0,19	1,06±0,16	0,631	1,64±0,33	0,004	1,68±0,25	0,003
	28	1,00±0,14	1,16±0,14	0,142	1,76±0,32	0,006	2,06±0,24	0,006
Tgfb1	10	1,00±0,20	1,14±0,13	0,150	1,08±0,36	0,423	1,01±0,15	1
	28	1,00±0,51	1,03±0,43	0,806	1,45±0,25	0,068	1,11±0,28	0,584
Col2a1	10	1,00±0,61	1,35±0,60	0,337	0,98±1,29	0,631	0,70±0,51	0,475
	28	1,00±1,13	0,81±0,99	1	1,85±2,33	0,465	0,07±0,07	0,045
Vegfa	10	1,01±0,26	0,87±0,20	0,262	1,11±0,51	0,749	1,47±0,42	0,032
	28	1,00±0,20	1,69±0,58	0,086	1,24±0,37	0,273	1,95±0,88	0,028
Mmp3	10	1,00 (0,71-2,35)	0,80(0,36-4,35)	0,567	0,70(0,48-4,05)	0,567	0,37 (0,19-1,72)	0,286
	28	1,00 (0,56-5,41)	0,47(0,19-3,28)	0,524	0,78(0,38-1,02)	0,567	0,91 (0,21-1,66)	0,567
BMP2	10	1,00±0,19	0,90±0,11	0,423	0,94±0,34	0,423	0,80±0,11	0,199
	28	1,00±0,29	1,02±0,08	0,624	1,14±0,21	0,361	1,24±0,49	0,273
Socs2	10	1,00±0,67	1,56±0,33	0,055	1,90±0,64	0,078	1,71±0,66	0,046
	28	1,01±0,63	1,66±0,62	0,086	2,18±0,41	0,018	2,00±0,63	0,045
Socs3	10	1,00±0,95	1,11±1,69	0,109	0,68±0,41	1	1,34±0,48	0,046
	28	1,01±0,65	0,70±0,39	0,462	1,82±0,32	0,045	2,25±1,10	0,068
MCP-1	10	1,00±0,91	0,52±0,41	0,109	0,76±0,86	0,423	0,83±0,81	0,391
	28	1,00±0,26	0,90,±0,55	0,624	0,60±0,20	0,028	1,45±0,35	0,068

3.2.1.- Igf1

El incremento en la expresión de Igf1 ha sido significativo con la dosis de 20% a los 10 y 28 días respecto al grupo control (p=0,004 y p=0,006) y con la dosis de 50% a los 10 y 28 días (p=0,003 y p=0,006) (figura 38).

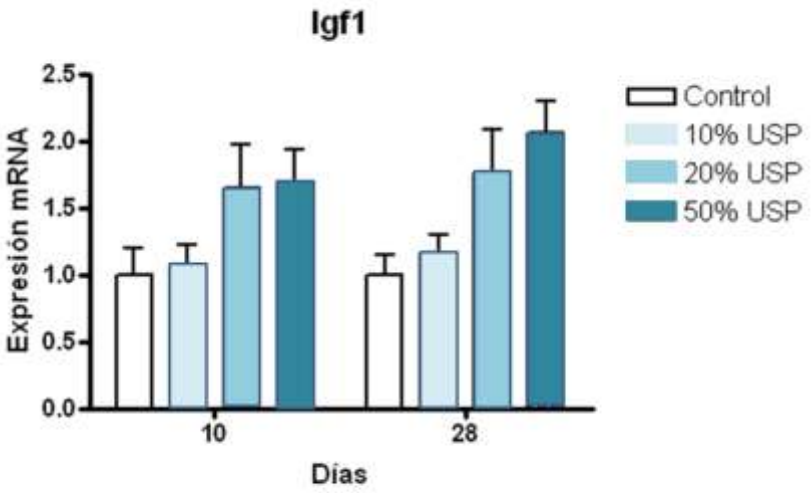


Figura 38. Expresión de Igf1 control *versus* dosis de USP.

3.2.2.- Tgfb1

La expresión de mRNA no ha mostrado cambios estadísticamente significativos con las dosis de USP administradas a los 10 y a los 28 días (figura 39), aunque con la dosis de 20% a los 28 días se observa un incremento de 1,45±0,25 de su expresión con respecto a los animales no tratados (tabla XIV).

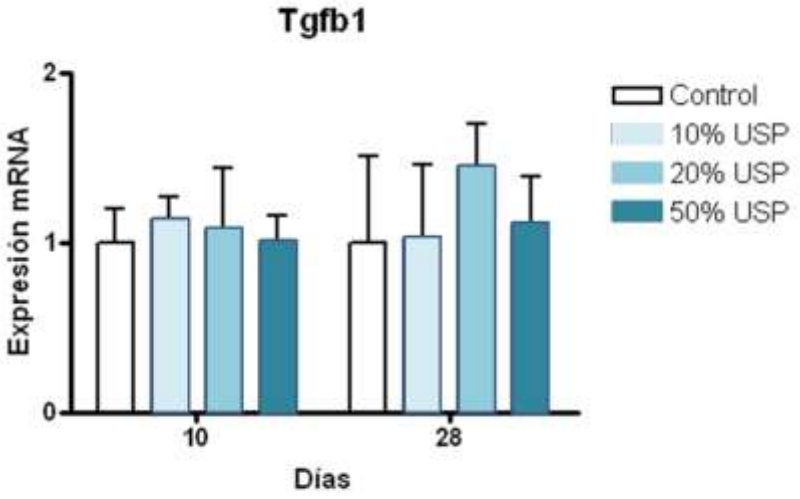


Figura 39. Expresión de Tgfb1 control *versus* dosis de USP.

3.2.3.- BMP2

La expresión de mRNA no ha mostrado cambios estadísticamente significativos con las dosis de USP administradas a los 10 y a los 28 días respecto al grupo control (figura 40).

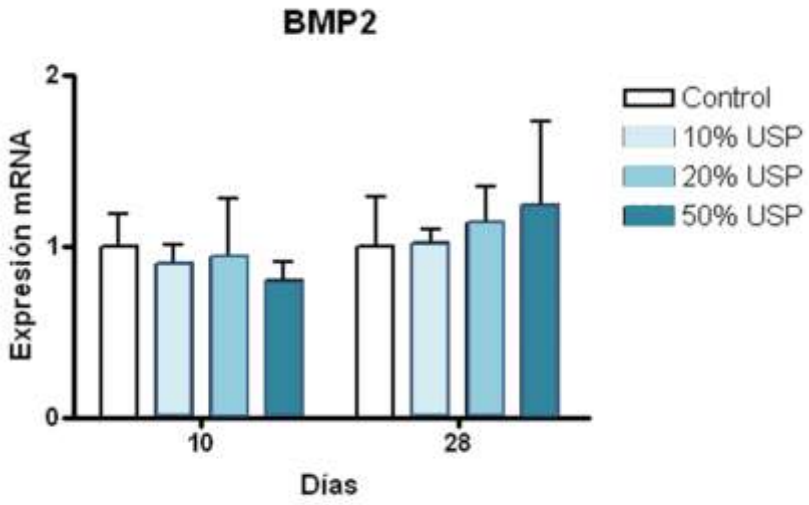


Figura 40. Expresión de BMP2 control *versus* dosis de USP.

3.2.4.- Vegfa

El incremento de la expresión de Vegfa ha sido significativo con respecto al grupo control a la dosis de 50% tanto a los 10 días como a los 28 días (p=0,032 y p=0,028) (figura 41). Se ha observado un incremento de su expresión con la dosis del 10% a los 28 días con respecto a los animales no tratados no siendo esta estadísticamente significativa (tabla XIV).

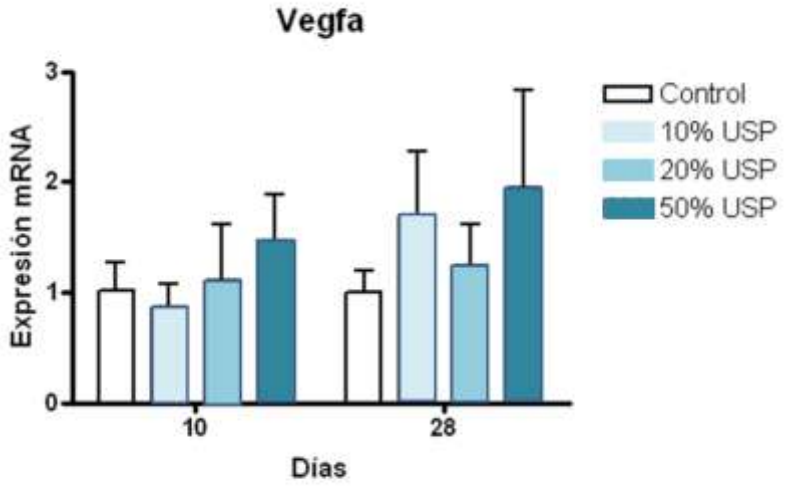


Figura 41. Expresión de Vegfa control *versus* dosis de USP.

3.2.5.- Col2a1

Se ha observado un descenso significativo en la expresión de Col2a1 con la dosis de 50% a los 28 días respecto al grupo control (p=0,045) (figura 42). Además, se ha observado un incremento de su expresión a los 10 días con la dosis del 10%, de forma que su expresión muestra una tendencia a disminuir a medida que se aumenta el pulso y la intensidad aplicada.

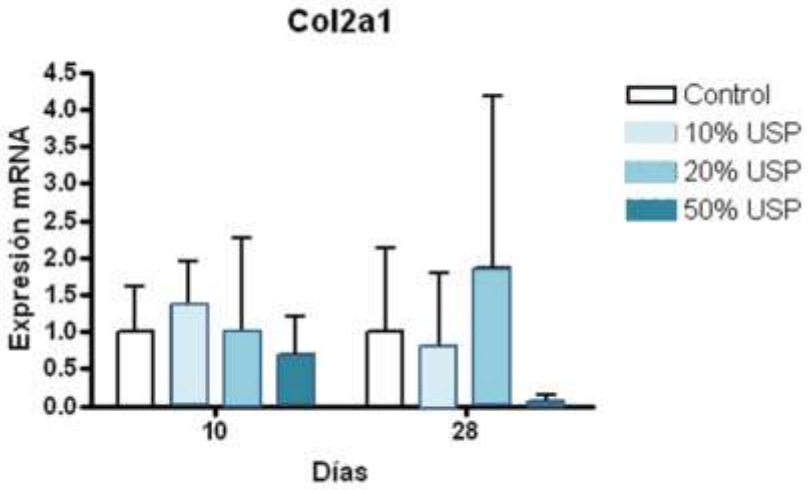


Figura 42. Expresión de Col2a1 control *versus* dosis de USP.

3.2.6.- Mmp3

La expresión de mRNA de Mmp3 no ha mostrado cambios estadísticamente significativos con las dosis de USP administradas a los 10 y a los 28 días respecto al grupo control (figura 43).

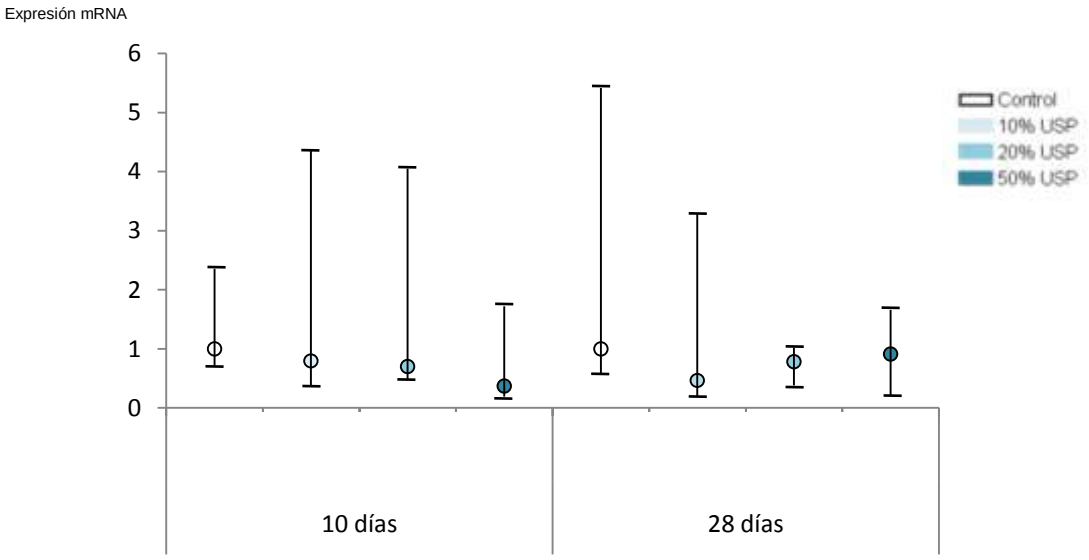


Figura 43. Expresión de Mmp3 control *versus* dosis de USP.

3.2.7.- Socs2

Se ha observado que la expresión de Socs2 se incrementa de forma estadísticamente significativa con la dosis de USP del 20% a los 28 días respecto al grupo control (p=0,018), aunque se observa un incremento de su expresión también a los 10 días con esta dosis, que no es estadísticamente significativa (tabla XIV). Con la dosis del 50% se produce un incremento en su expresión estadísticamente significativo tanto a los 10 días y como a los 28 días con respecto al grupo control (p=0,046 y p=0,045) (figura 44).

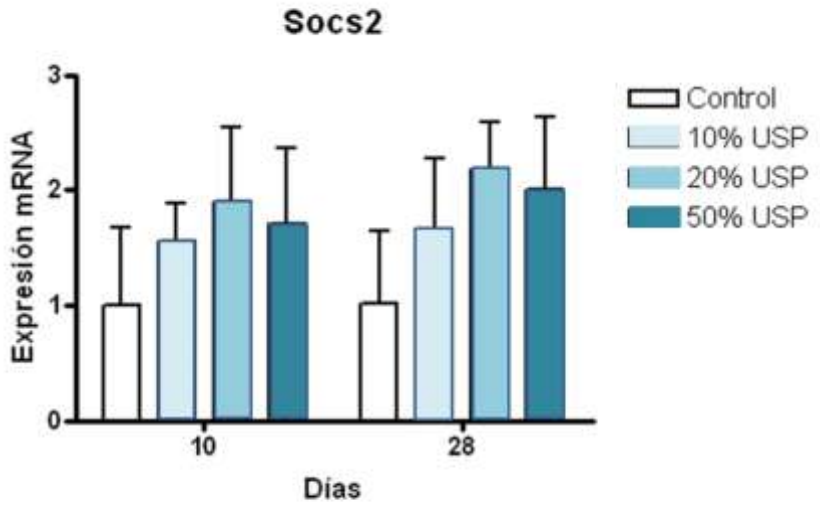


Figura 44. Expresión de Socs2 control *versus* dosis de USP.

3.2.8.- Socs3

Se ha observado que la expresión de Socs3 se incrementa de forma estadísticamente significativa con la dosis de USP del 50% a los 10 días y con la del 20% a los 28 días respecto a los controles (p=0,046 y p=0,045). Además se ha observado a los 28 días una disminución de su expresión con la dosis del 10% y un incremento con la dosis del 50% con respecto a los animales no tratados (figura 45) aunque esta no es estadísticamente significativa (tabla XIV).

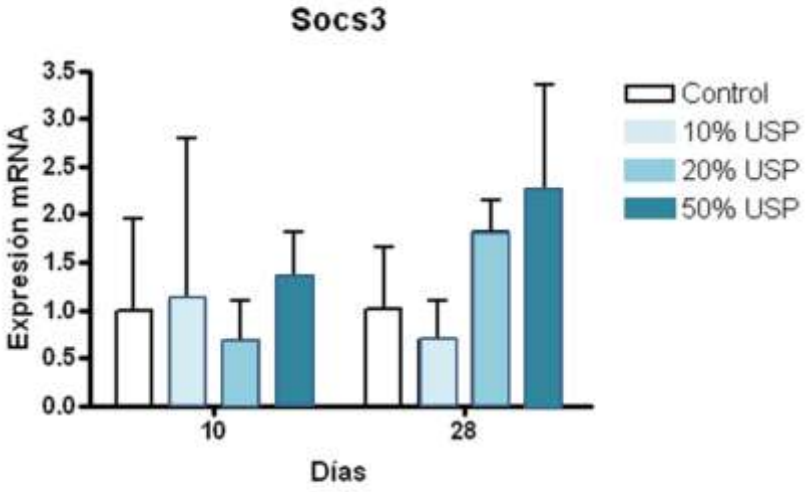


Figura 45. Expresión de Socs3 control *versus* dosis de USP.

3.2.9.- MCP-1

A los 10 días, se observa una disminución no estadísticamente significativa de su expresión con la dosis del 10%, que se va incrementando a medida que aumenta el pulso, hasta casi alcanzar los valores de los animales no tratados con la dosis del 50% (figura 46). Se ha observado un descenso significativo de la expresión de MCP-1 a los 28 días con la dosis del 20%, respecto a los controles y un incremento en su expresión con la dosis del 50% no estadísticamente significativo, con respecto a los animales no tratados (figura 46).

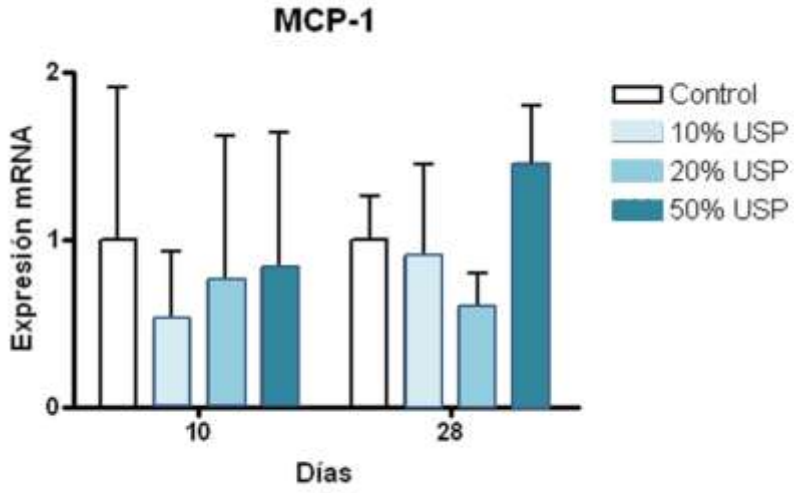


Fig 46. Expresión de MCP-1 control *versus* dosis de USP.

Discusión

La curación de las fracturas tiene lugar mediante un proceso encadenado de reacciones celulares que culminan con la reparación de la lesión ósea en distintas etapas {Bolander M. E., 1992}. Los tipos celulares implicados en la reparación ósea; como las células endoteliales, los fibroblastos, los osteoblastos, los condrocitos y los osteocitos, responden al estrés mecánico o tensión mecánica del foco de fractura que juega un importante papel en el proceso de curación de las mismas {Einhorn T. A., 1998; Mackenna D. A. *et al*, 1998; Pavalko F. M. *et al*, 1998; Schwachtgen J. L. *et al*, 1998; Ajubi N. E. *et al*, 1999}.

La reparación ósea continua siendo muy estudiada tanto en investigación básica como en la clínica. La respuesta celular a las lesiones, la agresión celular en el sitio de fractura, las rutas de señalización y mecanismos implicados en la curación de fracturas, el papel de los factores de crecimiento y el papel de la "mechanotransduction" en la reparación de las fracturas, representa tan solo un pequeña muestra de la multitud de estudios realizados, para profundizar en el conocimiento de la reparación de las mismas y proporcionar mejores estrategias clínicas {Khan Y. y Laurencin C. T., 2008}. Es además conocido, que la velocidad de consolidación de las fracturas varía según las especies y se ha comprobado en modelos de osteogénesis por distracción de fémur como la velocidad de curación ósea es más baja en ovejas (63 días), en comparación con los pequeños animales, como ratas y conejos que es de 35 días. {Claes L. y Willie B., 2007}.

Las fracturas costales son una entidad clínica muy frecuente en la actividad asistencial cotidiana. Kerr-Valentic et al {Kerr-Valentic M. A. et al, 2003}, evaluaron la morbilidad de las fracturas costales con determinaciones seriadas del dolor, un estudio de incapacidad y un recuento de los días de actividad perdidos por la falta de asistencia al trabajo o de desarrollo de la actividad cotidiana diaria. Estos investigadores confirman en su estudio, que las fracturas costales son causa significativa de incapacidad por el dolor postraumático que producen en pacientes, cuyas fracturas son su lesión primaria y en muchos pacientes con otras lesiones graves, y que el manejo actual de las fracturas costales no facilita el alivio del dolor o la rápida recuperación de la actividad normal. En relación con la diversidad y disparidad en la idoneidad del tratamiento aplicado según los resultados obtenidos en los estudios de Karmakar et al. {Karmakar M. K. y Ho A. M., 2003}, es difícil recomendar un método único que pueda ser utilizado con seguridad y eficacia en pacientes con fracturas de múltiples arcos costales. Es por ello, que el médico valora las ventajas e inconvenientes, beneficios y riesgos de cada técnica analgésica disponible, y el manejo del dolor se realiza de forma individualizada basándose en el escenario clínico y la extensión del trauma {Karmakar M. K. y Ho A. M., 2003}; sin que en la actualidad exista un tratamiento eficaz que modifique la incapacidad funcional que producen durante varios meses y que supone un alto coste hospitalario, farmacéutico, laboral y social.

Es por ello que se ha sugerido, como el desarrollo de nuevas estrategias para tratar a los pacientes con fracturas costales que alivien el dolor y reduzcan esta incapacidad. Podría aportar un gran beneficio, no sólo individual para cada paciente implicado, sino también para toda la sociedad en su conjunto {Kerr-Valentic M. A. et al, 2003}.

Por otro lado, los ultrasonidos, o la aplicación de energía acústica, es una técnica mínimamente invasiva que ha sido ampliamente utilizada en aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Los US tienen, a) efectos biológicos al mejorar el intercambio de productos metabólicos {Dyson M., 1973}, b) mecánicos que se deben a las micro-presiones producidas por estas ondas en el tejido vivo y que pueden desencadenar eventos bioquímicos a nivel celular {Binderman I et al, 1988; Buckley MJ et al, 1988; Rubin J. et al, 1997} y c) térmicos que han sido muy estudiados y discutidos, de forma que los US diagnósticos emplean intensidades bajas (1-50mW/cm^2) para evitar el calentamiento tisular porque no producen efecto térmico {Ziskin M. C., 1987}, y por consiguiente, son las intensidades bajas (30-120 mW/cm^2 I_{SATA}) las que se usan clínicamente para acelerar la curación de las fracturas {Pilla A. A. et al, 1990; Heckman J. D. et al, 1994; Azuma Y. et al, 2001}, ya que producen incrementos en la temperatura local inferiores a 1ºC. En estudios con US transcraneales en ratas para mejorar la trombolisis se ha observado como con dosis altas de 7 W/cm^2 aplicadas durante 30 minutos tan solo, se obtenía un moderado incremento de temperatura (0,9º C) sin encontrar en el estudio histológico efectos adversos deletéreos {Fatar M. et al, 2006}.

Con la emisión pulsátil de US se consigue un cierto grado de enfriamiento de los tejidos y se disminuye el efecto térmico no deseado que presenta la emisión contínua, permitiendo así poder aumentar la intensidad. Como recientemente han indicado Siska et al. en estudios con modelos *in vivo* {Siska P. A. et al, 2008; Siska P. et al, 2009} intensidades elevadas de 1.0 W/cm^2 de US continuo produce efectos deletéreos en la curación de las fracturas, mientras que los LIPUS (30mW/cm^2 SATA) aceleran la curación de las mismas {Tsai C. L. et al, 1992; Wang S. J. et al, 1994; Reher P. et al, 1997; Hadjiargyrou M. et al, 1998; Malizos KN et al, 2006}.

Se han realizado in vivo numerosos estudios que valoran la acción de los LIPUS mediante estudios radiológicos, de biomecánica e histomorfología en fracturas de extremidades{Claes L. y Willie B., 2007} pero nunca antes en fracturas costales {Claes L. y Willie B., 2007}. En modelos de osteogénesis por distracción y en investigaciones histomorfológicas, se ha podido observar como el porcentaje de tejido fibroso en el callo maduro fue más bajo y el porcentaje de hueso formado más alto, en los grupos tratados con LIPUS que en los controles no tratados {Tis J. E. et al, 2002; Sakurakichi K. et al, 2004}. Sakurakichi et al, también demostraron que el efecto del tratamiento con LIPUS fue incluso más evidente cuando éstos se aplicaban durante el periodo de distracción, en comparación a su administración durante el periodo de maduración {Sakurakichi K. et al, 2004}.

Wang et al., realizaron un modelo de fractura femoral de ratas y aplicaron LIPUS de 30mW/cm^2 durante los 14 primeros días después de la intervención. Estos investigadores utilizaron frecuencias de 0,5 y 1,5 MHz y lo evaluaron a los 21 días de la fractura. Observaron como la consolidación de las fracturas se aceleraba en los animales tratados con ambas frecuencias, apreciando un 31,25 % de consolidación ósea mediante diagnóstico radiológico en los animales tratados mientras que no se observó consolidación en los no tratados {Wang S. J. et al, 1994}. A pesar de que comúnmente se ha utilizado más la frecuencia de 1,5 MHz para estimular la osteogénesis en experimentación animal y en investigación clínica, y debido a que los USP de baja intensidad sólo pueden causar ondas de presión extremadamente bajas que penetran de forma proporcional a la densidad del tejido, en nuestro estudio hemos utilizado la frecuencia de 3 MHz porque alcanza los 2 cm de profundidad, distancia aproximada a la que se encuentra nuestro objetivo de tratamiento.

Por consiguiente, la energía mecánica transferida por los USP, podría actuar sobre las etapas de la reparación como la reacción inflamatoria, la angiogénesis, la condrogénesis, la osificación intramenbranosa, la osificación endocondral o el remodelado óseo en el callo de fractura {Azuma Y. et al, 2001}, sin embargo, los LIPUS son principalmente reflejados en los bordes del tejido blando y duro, tejido similar al tejido conectivo y hueso cortical. Éste es el motivo por el qué los LIPUS no tienen capacidad para estimular la osteogénesis en hueso intacto {Wimsatt J. et al, 2000; Warden S. J. et al, 2001} o el callo en la fase de remodelado {Pilla A. A. et al, 1990; Wang S. J. et al, 1994; Hantes M. E. et al, 2004}, y si influir en las fases de inflamación y formación del callo en la curación de las fracturas. La diferente absorción de LIPUS podría establecer un gradiente de tensión mecánica en el callo en curación que estimularía la formación de hueso perióstico {Gross T. S. et al, 1997; Rubin C. et al, 2001}.

Ensayos clínicos realizados por Xavier y Duarte, Kristiansen y Heckman et al., concluyeron que los LIPUS aceleraban el proceso de reparación de las fracturas en humanos {Xabier C. A. M. y Duarte L. R., 1983; Kristiansen T. K., 1990; Heckman J. D. et al, 1994}. Los niveles de intensidad efectiva, beneficiosa, sobre la reparación de las fracturas, varían según los estudios {Xabier C. A. M. y Duarte L. R., 1983; Kristiansen T. K., 1990; Heckman J. D. et al, 1994}, desde 30mW/cm^2 a 1 W/cm^2 I_{SATA}, siendo esta última perjudicial para la consolidación ósea {Tsai Ch. L. et al, 1991}.

Dyson y Brookes, efectuaron en 1983 un estudio con el objetivo de investigar los efectos del ultrasonido en el proceso de reparación ósea mediante un modelo placebo controlado de fracturas bilaterales de peroné en ratas. Para ello utilizaron señales ultrasónicas pulsátiles de 1 y 3 MHz y 500 mW/cm^2 de I_{SATA} aplicadas por vía transcutánea durante 5 minutos sobre el sitio de la fractura. Estos observaron que el 78,6% de los animales tratados con 1,5 MHz y el 56,2% de los tratados con 3,0 MHz presentaban una mayor curación radiológica e histológica que los controles no tratados {Dyson M. y Brookes M., 1983}. En el mismo año, Duarte realizó un estudio

histológico y radiológico, en un modelo placebo controlado en conejos con osteotomías bilaterales de peroné y perforaciones bilaterales en el pericondrio del fémur. Observó como aplicando LIPUS, obtenía un incremento en el crecimiento óseo significativo en los defectos óseos producidos en la cortical del femur (36 % en el día 15) y en el foco de la osteotomía de fíbula de conejo (27 % a los 18 días), en comparación con los controles no tratados {Duarte L. R., 1983}. Años más tarde, Déniz et al. {Déniz A.S. et al, 1998} observaron que el ultrasonido pulsátil en osteotomías de peroné de rata aceleraba la consolidación ósea dependiendo de la intensidad aplicada que osciló entre 0 y 0,5 W/cm^2 de SATP (con 20% de pulso), de forma que la consolidación de las fracturas se producía de forma más rapida y en una mayor proporción en las ratas tratadas con una intensidad I_{SATA} de 100 mW/cm^2 (0,5W/cm^2) en una sesión diaria de 3 minutos (según el área a tratar, en su caso 1,5 cm^2) apreciando 83,33% de consolidación.

Basándonos en todos éstos datos seleccionamos para nuestro estudio los USP a una intensidad SATP fija de 0,5W/cm^2 con 3 diferentes pulsos (10%, 20% y 50%) y por tanto 3 distintas intensidades de aplicación SATA (50 mW/cm^2, 100 mW/cm^2 y 250 mW/cm^2 de I_{SATA}, respectivamente) a 3MHz durante 6 min/día y un tiempo de tratamiento máximo de 28 días, teniendo en cuenta además que en las ratas la consolidación de las fracturas se alcanza en torno a los 35 días {Claes L. y Willie B., 2007}.

En nuestro estudio, el tratamiento con USP favorece la consolidación del callo óseo en el 59,6% de los animales tratados en el estudio radiológico y en un 66 % en el histológico. De hecho, cuando tratamos las fracturas costales con USP la formación de callo óseo radiológico es 4,1 veces mayor y de callo histológico 5,4 veces mayor que la evolución natural, lo que demuestra la eficacia de esta herramienta terapéutica en la reparación de las fracturas costales.

Nuestros datos están en concordancia con los obtenidos de la literatura internacional para las fracturas de extremidades inferiores en cuanto a eficacia de los USP para acelerar la consolidación {Pilla A. A. et al, 1990; Wang S. J. et al, 1994; Yang K. H. et al, 1996; Azuma Y. et al, 2001} de las fracturas costales, y ésta es la primera vez que se describe este efecto beneficioso para este tipo de lesiones. Además, también observamos en nuestro estudio, que los porcentajes de consolidación son mayores con las dosis más bajas de intensidad aplicada, los mejores resultados de consolidación en fracturas de extremidades se han obtenido con 30mW/cm^2, y que la probabilidad de consolidación disminuye a medida que aumenta el pulso y por tanto la intensidad aplicada. Así que, la dosis más eficaz es la de 50mW/cm^2 seguida de la de 100mW/cm^2 con una consolidación de 7,7 y 6,1 veces mayor, respectivamente, que la que proporciona la reparación natural del foco de fractura.

Por otro lado, Déniz {Déniz A.S. et al, 1998} describió que la intensidad de 200mW/cm^2 I_{SATA} era ineficaz para obtener consolidación ósea. Sin embargo, en nuestro estudio hemos observado que con la dosis de 250mW/cm^2 obtenemos una consolidación ósea, que aunque muy inferior a la observada con las dosis de 50 y 100mW/cm^2, es 1,4 veces superior a la evolución natural. Es poco probable, que este menor efecto en la consolidación ósea sea debido a daño térmico, ya que se ha observado que con intensidades muy superiores a las utilizadas por nosotros tan sólo obtenían un moderado incremento de temperatura (0,9º C), sin encontrar estos autores en su estudio histológico efectos adversos deletéreos {Fatar M. et al, 2006}. Es probable que ésta menor consolidación esté influenciada por el efecto mecánico de presión y tracción que puede generarse con altas intensidades y que puede producir lesión tisular.

Además, se ha observado que la dosis de 30 mW/cm^2 favorece la deposición de calcio y la síntesis de la malla de matriz de colágeno que sirve de soporte para la mineralización ósea, mientras que la exposición a intensidades de ultrasonidos más altas de 120 mW/cm^2 produce un menor depósito de calcio en comparación con la exposición a bajas dosis {Saito M. et al, 2004}. Este hecho aporta también más información que ayuda a explicar porque los mejores resultados en la consolidación los hemos obtenido con las dosis de 50 y 100mW/cm2 frente a la de 250mW/cm^2.

El tiempo de aplicación del tratamiento con US en el estudio de Azuma et al sobre fémur de rata fue de 25 días tras la fractura, dividiendo en 3 periodos de observación este tiempo (de 1 a 8 días después de la fractura, de 9 a 16 días después de la fractura y de 17 a 24 días después de la fractura) {Azuma Y. et al, 2001}, cada una de los cuales implica diferentes reacciones esenciales para la curación de fracturas {Jingushi S. et al, 1992}. Azuma et. al. investigaron la relación entre el tiempo del tratamiento con LIPUS y la eficiencia en el proceso de aceleración de la curación mediante la estimación de propiedades mecánicas, masa ósea, histología, y la microestructura del callo, con el novedoso uso de la técnica tridimensional de tomografía computadorizada de rayos X microfocal {Azuma Y. et al, 2001}. A pesar de que no pudieron definir su objetivo principal, sí descubrieron como LIPUS aceleraba la curación de fractura de femur de rata en relación al tiempo de tratamiento con LIPUS, de forma que cuanto mayor era el tiempo de tratamiento más efectivo era éste. Sus resultados, ya sugerían que LIPUS actuaba sobre algunas células implicadas en cada fase del proceso de curación tales como; la reacción inflamatoria, angiogénesis, condrogénesis, osificación intramembranosa, osificación endocondral y remodelación ósea. En nuestro estudio hemos observado también como el tiempo de tratamiento nos influye en el grado de reparación cuando tratamos los animales con fracturas costales durante más de 10 días obtenemos 5 veces más callo óseo que con la evolución natural mientras que cuando el tiempo de tratamiento es inferior a 10 días la probabilidad de consolidación disminuye a 1,4 veces en el estudio radiológico y a 1,7 en el histológico. Esto sugiere que la reparación costal inducida por USP requiere un largo tiempo de tratamiento, al menos superior a los 10 días, para acelerar el paso desde las fases inflamatorias a las de reparación y posteriormente remodelación, de forma que su efecto

ya no es más eficaz cuando se alcanza ésta última fase, que en la rata tiene lugar sobre los 35 días {Claes L. y Willie B., 2007}.

Un punto controvertido en el tratamiento con USP es el tiempo de aplicación del mismo. En nuestro caso la aplicación del USP se realizó durante 3 minutos al día (1min/cm^2), un tiempo de aplicación muy inferior a los descritos en extremidades inferiores por otros autores; tanto en estudios con modelos animales en los que se han aplicado US durante 15 minutos/día {Wang S. J. et al, 1994; Yang K. H. et al, 1996} y 20 minutos/día {Pilla A. A. et al, 1990; Azuma Y. et al, 2001; Pilla A. A., 2002}; como en ensayos clínicos, como describe el meta-análisis de Busse et al. con ensayos controlados aleatorizados de LIPUS para la curación de fracturas de extemidades inferiores. En estos ensayos se han utilizado sesiones diarias de 20 minutos con el sistema sónico acelerador de la curación de fracturas (SAFHS 2A), específicamente diseñado para el tratamiento de estas fracturas {Busse J. W. et al, 2002}. En nuestro estudio, aplicar los USP durante 3 minutos diarios de forma prolongada y continua durante 28 días, no parece haber restado eficacia al efecto terapéutico del mismo sobre las fracturas costales, consiguiendo de este modo acortar mucho el tiempo de tratamiento, haciendo su uso más tolerable y fácil de aplicar.

Por otro lado, a pesar de los numerosos estudios clínicos y experimentales realizados con el fin de valorar el efecto de los USP sobre la regeneración ósea, los mecanismos biofísicos implicados en el complejo proceso de la curación de fracturas inducidas por los USP aún permanecen sin aclarar {Claes L. y Willie B., 2007}.

Es conocido el hecho de que un agente físico induzca cambios bioquímicos {Schnoke M. y Midura R. J., 2007; Shimizu N. et al, 2007}. En 1999 Kokubu et al. {Kokubu T. et al, 1999} demostraron *in vitro* que los LIPUS incrementaban la síntesis de prostaglandina E2 por la inducción de la ciclooxygenasa-2. Posteriormente, Naruse et al. {Naruse K. et al, 2000; Naruse K. et al, 2003 } también demostraron que inducían *in vitro* la expresión del gen de respuesta temprana c-fos, la sialoproteína ósea, Igf1 y los genes de osteocalcina. Sena et al, demostraron que cuando se aplicaban LIPUS durante 20 minutos, se incrementaba la expresión de los genes implicados en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos durante las primeras 12 horas después del tratamiento incluyendo Igf1 {Sena K. et al, 2005}. Más recientemente, Claes et al {Claes L. y Willie B., 2007} revisaron algunos de los efectos biológicos *in vitro* de los USP, llegando a la conclusión de que su mecanismo de acción no tenía lugar por efecto térmico sino que producían incrementos en la actividad celular.

Sin embargo, ningún estudio hasta ahora ha valorado si los USP inducen cambios en la expresión génica *in vivo*. En nuestro trabajo hemos podido observar que el tratamiento de las fracturas costales con USP induce la expresión de genes proliferativos como Igf1 y Vegf y de genes antiinflamatorios como Socs2 en fases precoces y tardías de la regeneración de las fracturas costales y no modifica significativamente la expresión de Tgfb1, Col2a1, Mmp3, BMP2 y MCP-1, aunque hay

que tener en cuenta que incluso variaciones sutiles en la expresión de un gen puede tener repercusiones biológicas relevantes. Como primera aproximación, esto nos haría suponer que los USP actúan induciendo la expresión de estos genes implicados en la evolución natural de la regeneración ósea del callo de fractura como se intuye a partir de los estudios *in vitro*.

De hecho Igf1 es el factor de crecimiento más abundante de la matriz ósea y es un potente estimulador de la osteogénesis {Lieberman J. R. et al, 2002}. Es producido por los osteoblastos y estimula la formación ósea mediante la inducción de proliferación celular, diferenciación osteoblástica, biosíntesis de colágeno tipo I, osteoclastogénesis e interacción osteoblasto-osteoclasto {Canalis E. et al, 1988; Wang Y. et al, 2006}. Normalmente, actúa como un factor mitogénico que se encuentra en el en el callo en las primeras fases de la reparación de fracturas {Franceschi R. T., 2005}. Así, en el proceso natural de curación de la fractura, Igf1 aumenta su expresión desde el día 3 hasta alcanzar un pico máximo a los 10 días, para luego empezar a descender gradualmente hasta los 21 días, alcanzando niveles similares a los de los 5 días {Hadjiargyrou M. et al, 2002}. Sin embargo, en nuestro estudio hemos observado un incremento de su expresión a los 10 días de tratamiento que sigue aumentando en las fases más tardías de la reparación como ocurre a los 28 días.

Vegf, es el mayor regulador tanto in vitro como in vivo de la angiogénesis durante diversos procesos fisiopatológicos, como pueden ser el desarrollo embriológico o la curación de las heridas. Además de su papel como inductor de la neoangiogénesis, incrementa la supervivencia de los osteoblastos y la formación de hueso endocondral {Claes L. y Willie B., 2007}. Es almacenado y secretado por los osteoblastos y el endotelio y posee un importante papel en la angiogénesis durante la consolidación de fracturas {Street J. T. et al, 2001; Deckers M. M. et al, 2002; Eckhardt H. et al, 2005; Li G. et al, 2005}. Wang et al demostraron in vitro que la estimulación con US incrementaba significativamente la expresión de Vegf y los niveles de proteínas en osteoblastos humanos {Wang F. S. et al, 2004}. En nuestro estudio *in vivo,* también hemos observado un incremento significativo de su expresión, pero en fases tardías de la reparación, mientras que los fenómenos de angiogénesis son más propios de fases precoces.

Socs2 y Socs3 regulan negativamente la señal de transducción de varias citoquinas proinflamatorias {Hadjiargyrou M. et al, 2002} e Igf1 {Giustina A. et al, 2008 }. De hecho, los ratones Socs2(-/-) presentan un incremento longitudinal del esqueleto asociado a una desregularización en la señalización hormona de crecimiento y su mediador, Igf1 {Lorentzon M. et al, 2005; Rico-Bautista E. et al, 2006; Macrae V. E. et al, 2009}. Sin embargo, recientemente se ha demostrado como los niveles fisiológicos de Socs2 regulan negativamente la formación ósea y el crecimiento endocondral {Macrae V. E. et al, 2009}. En nuestro caso, hemos observado un incremento significativo en la expresión de Socs2 a los 10 y 28 días y un incremento de

Socs3 a los 28 días de más difícil interpretación dados los resultados positivos del tratamiento con USP sobre las fracturas costales.

Sin embargo, cuando analizamos los datos de expresión génica según las dosis administradas, observamos que en nuestro estudio, a medida que aumenta la intensidad aplicada de USP sobre las fracturas costales, se incrementa la expresión de estos genes proliferativos y antiinflamatorios. De forma que la dosis más eficaz, que es la de 50mW/cm^2, no induce cambios significativos en la expresión de ninguno de ellos. Por el contrario se empieza a hacer manifiesta con la de 100 mW/cm^2 (incremento en la expresión de Igf1, Socs2, Socs3 y disminución en la expresión de MCP-1) y es máxima con la dosis más alta de 250mW/cm^2 (incremento en la expresión de Igf1, Socs2, Socs3 y Vegf) tanto en fases tempranas como tardías del tratamiento.

MCP-1 produce un incremento de los monocitos que se asocia con un aumento del número de osteoblastos en la línea de superficie ósea fracturada (Posner L. J. *et al*, 1997). Estos resultados indican que MCP-1 induce el reclutamiento de monocitos en el hueso y que está asociado con un incremento en el número de osteoblastos. Parece que este fenómeno ocurre por mecanismos indirectos porque MCP-1 no incrementaba directamente la síntesis de DNA en células osteoblásticas *in vitro*. En estudios realizados por Omi *et al*. observaron como la estimulación en ratas con ultrasonidos pulsátiles de baja intensidad (LIPUS) activaba TIMP-1 y MCP-1 en las células del nucleo pulposo y macrófagos; tanto en la proteína como en los niveles del gen, recomendando los LIPUS como un tratamiento suplementario prometedor para las hernias de disco intervertebrales (Omi H. *et al*, 2008). Sin embargo en nuestro estudio *in vivo,* se observa una disminución en la expresión del ARN mensajero de esta proteína con todas las dosis a los 10 y a los 28 días. Esta disminución es significativa con la dosis de 100W/cm^2 en fases tardías y se incrementa con la dosis del 50% también a los 28 días lo que sugiere que su mecanismo de acción inducido por USP es complejo.

Todo ello, nos hace suponer que lo que estamos observando *in vivo* es la inducción compensadora de estos genes proliferativos y antiinflamatorios que se expresan para paliar la situación de inflamación y lesión tisular inducida por las dosis más altas, sobre todo la de 250mW/cm^2, en la que se están probablemente implicando fenómenos de apoptosis, necrosis y estrés celular por el estímulo de presión mecánica generado por estas dosis {Feril L. B. Jr. y Kondo T., 2004}. De forma que, a medida que aumenta el pulso del USP aplicado disminuye la eficacia en la consolidación del callo óseo y aumenta la expresión compensatoria de estos genes.

Esto reforzaría el hecho de que, como se ha observado en estudios previos sobre cultivos celulares o modelos animales, los efectos de los USP sobre el proceso de reparación de las fracturas tiene lugar principalmente sobre la diferenciación celular más que sobre la proliferación. De hecho, el tratamiento con USP estimula la diferenciación condrocítica durante el proceso de reparación de las fracturas, sin ocasionar un aumento en el tamaño del callo {Jingushi S. et al, 1999}, aunque si

favorece una unión precoz del callo óseo dando lugar a un foco de fractura fortalecido {Wang S. J. et al, 1994; Azuma Y. et al, 2001}.

En nuestro estudio no hemos observado cambios significativos en la expresión de los genes seleccionados relacionados con la diferenciación celular, salvo en el col2a1. Este presenta un pico de expresión a los 14 días de la fractura que luego desciende a los 21 días en los procesos de consolidación ósea {Hadjiargyrou M. et al, 2002}. A pesar de que, se ha observado en estudios realizados in vitro con altas intensidades de 500 mW de USP que se incrementaba la síntesis de proteínas {Harvey W. et al, 1975; Webster D. et al, 1978} y la síntesis de colágeno {Webster D. F. et al, 1980} en fibroblastos humanos, en nuestro estudio la dosis de 250mW es la única que ha disminuido de manera significativa la expresión de col2a1 a los 28 días, lo que podría influir en el efecto negativo de esta dosis sobre la consolidación ósea, mientras que se ha observado un incremento de su expresión con la dosis más eficaz de 50mW/cm^2 en fases más precoces, que pudiera estar también relacionado con su efecto beneficioso.

Otro gen de diferenciación celular como BMP-2 está presente en los tejidos óseos humanos, y tiene propiedades osteoinductivas estimulando la diferenciación osteoblástica {Dudley A. T. et al, 1995; Mbalaviele G. et al, 2005}. Las BMPs estan más relacionadas con los condrocitos y los osteoblastos presentes en las últimas fases del proceso de curación. Sin embargo, la expresión de BMP 2 es la más alta durante la fase inicial inflamatoria, y las expresión de las BMPs 3a, 4, 7, y 8 son las más altas durante las fases tardías de condrogénesis y osteogénesis de la reparación de fracturas {Franceschi R. T., 2005}. En nuestro estudio, no hemos observado cambios significativos en la expresión de BMP 2 ni a los 10 ni a los 28 días, aunque se ha apreciado una tendencia a incrementarse a medida que aumenta el pulso en las fases tardías. Es posible que los USP no modifiquen su expresión o que su pico de expresión inducido por los USP sea anterior a los 10 días. Por otro lado, como los USP aceleran el paso desde las fases inflamatorias a la reparación ósea, es posible que su pico de expresión sea más tardío con la dosis de 250mW/cm^2 debido a la inflamación que inducen los mismos.

Por otro lado, Tgfb posee un importante papel en el control de la resorción ósea ya que primero permite a los monocitos diferenciarse hacia osteoclastos y posteriormente limita la extensión y duración de la resorción después de su liberación desde la matriz ósea {Fox S. W. y Lovibond A. C., 2005}. Induce *in vitro*, la expresión de colágeno tipo II {Ibarra C. et al, 2007}, favorece la angiogénesis incrementando la síntesis de Vegf {Wang X. J. et al, 2008} y aumenta la síntesis de metaloproteasas {McKeown S. T. et al, 2007}. En el tejido en reparación, activa la producción de componentes e inhibe la acción de enzimas proteolíticas de la matriz extracelular, las metaloproteasas, que degradan la mayoría de componentes de la matriz en un proceso necesario para permitir la migración celular y la remodelación de los tejidos durante la curación de las heridas {Sternlicht M. y Werb Z. , 2001}. Entre ellas,

la MMP-3 además de otras acciones activa a la procolagenasa y podría ser especialmente importante en las fases de mineralización {Armstrong A. L. et al, 2002 }. Además, Karsdal et al {Karsdal M. A. et al, 2002} sugieren que TGF-beta es activada por las metaloproteasas y participa en la supervivencia osteoblástica durante la diferenciación a osteocitos. TGF-beta y BMP-2 inducen la formación condrocitica en los bordes de la articulación aumentando la reparación de cartílago en estudios realizados en rodillas artrósicas de ratón {Van den Berg W. B. et al, 2001}. En nuestro estudio tampoco hemos observado cambios significativos en la expresión de Tgfb que ha sido bastante estable, ni de la MMP 3, aunque con la dosis de 20% a los 28 días se observa un incremento de su expresión de Tgfb. Aunque obviamente la inducción de los genes que generan los USP *in vitro* no es la misma que la que puede inducir *in vivo,* donde existen muchas más variables no controladas, es probable que en el mecanismo de acción in vivo de los USP sobre la consolidación de las fracturas costales estén implicados otras rutas moleculares o simplemente que favorezcan la sinergia entre los genes implicados en la reparación y diferenciación ósea sin que exista sobreexpresión de los mismos, como es el caso de factores de crecimiento tan importantes como Tgfb que interacciona con muchos de los genes descritos.

Finalmente, ésta es la primera vez que se describe el efecto beneficioso de los USP sobre la consolidación y evolución de las fracturas costales y la primera vez que se demuestra in vivo que sus efectos no son sólo mecánicos sino, que inducen cambios biológicos cuantificables en la expresión génica, cuando se aplican de forma continua y prolongada. Su mecanismo de acción es complejo y variado y está influenciado entre otros, por la dosis de aplicación. Es probable que los USP inicialmente generen cambios biofísicos celulares, responsables de los cambios bioquímicos posteriores y que sus efectos beneficiosos estén relacionados por la interacción de otras muchas rutas moleculares no exploradas en este trabajo. Son necesarios más estudios que nos ayuden a profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción de esta potente herramienta terapéutica.

Desde un punto de vista traslacional, su eficacia para modificar el curso evolutivo de las fracturas costales, unido a su facilidad de aplicación y bajo coste hacen que se plantee su uso como alternativa terapéutica en los pacientes con fracturas costales, lo que podría reducir de este modo el coste personal, sanitario, laboral y social de las mismas.

Conclusiones

Primera.- "El estudio histológico de los callos de fractura demostró que el tratamiento con ultrasonidos pulsátiles a 3 MHz y 0,5 W/cm^2 de intensidad, administrados diariamente, acelera la consolidación de las fracturas hasta 5 veces más que la evolución natural".

Segunda.- "El estudio radiológico de los callos de fractura demostró que el tratamiento con ultrasonidos pulsátiles a 3 MHz y 0,5 W/cm^2, administrados diariamente, acelera la consolidación de las fracturas hasta 4 veces más que la evolución natural".

Tercera.- "Las dosis más eficaces de ultrasonidos pulsátiles son 50 mW/cm^2 I_{SATA} (10% de pulso) y 100 mW/cm^2 I_{SATA}, (20% de pulso). Con estas dosis de tratamiento se ha obtenido una consolidación de hasta 7,7 y 6,1 veces mayor, respectivamente, que la que proporciona la reparación natural del foco de fractura".

Cuarta.- "La dosis más alta de 250 mW/cm^2 (50% de pulso) produce un efecto no deseado de lesión tisular que disminuye la probabilidad de consolidación con respecto a las dosis más bajas, aunque sigue siendo superior a la observada en los animales no tratados. De forma que la probabilidad de consolidación disminuye a medida que aumenta el pulso y por tanto la intensidad aplicada de ultrasonido pulsátil".

Quinta.- "El mayor efecto de consolidación del foco de fractura tuvo lugar cuando el tratamiento con ultrasonidos pulsátiles se administró durante más de 10 días, de forma que se obtuvo una consolidación hasta 5 veces mayor que la observada en los animales no tratados. Por otro lado, cuando el tiempo de tratamiento fue inferior a 10 días la probabilidad de consolidación disminuyó a 1,4 veces en el estudio radiológico y a 1,7 en el histológico. Esto indica que la reparación costal inducida por los ultrasonidos pulsátiles in vivo requiere de un tiempo de tratamiento prolongado y continuo".

Sexta.-* "*Con un tiempo de aplicación corto de 3 minutos al día de los ultrasonidos pulsátiles, de forma continua y prolongada durante 28 días, se han obtenido altos porcentajes de consolidación de las fracturas costales, una importante diferencia con respecto a los tiempos de aplicación más usados en las fracturas de extremidades inferiores que suelen ser 5 a 7 veces mayores. Ello permite acortar mucho el tiempo de tratamiento de esta patológía, haciéndolo así más tolerable y fácil de aplicar, lo que debe tenerse en cuenta desde un punto de vista traslacional".

Séptima.- *"El tratamiento de las fracturas costales con ultrasonidos pulsátiles induce la expresión de genes proliferativos como Igf1 y Vegf y de genes antiinflamatorios como Socs2 y Socs3 en fases precoces y tardías de la reparación de las mismas".*

Octava.- *"La dosis más eficaz, la de 50 mW/cm^2, no induce la expresión de estos genes, mientras que es manifiesta con la dosis de 100 mW/cm^2 (incremento en la expresión de Igf1, Socs2, Socs3 y disminución de MCP-1) y con la dosis de 250 mW/cm^2 (incremento en la expresión de Igf1, Socs2, Socs3 y Vegf) tanto en fases tempranas como tardías del tratamiento. De este modo, a medida que aumenta la intensidad aplicada, disminuye la eficacia de consolidación del callo óseo y aumenta la expresión compensatoria de estos genes para paliar la situación de inflamación y lesión tisular inducida por las dosis más altas".*

Novena.- *"Sólo la dosis de 250 mW/cm^2 indujo cambios en la expresión de genes relacionados con la diferenciación celular ósea. En concreto un descenso en Col2a1, lo que podría influir en el efecto negativo de esta dosis sobre la consolidación ósea del callo de fractura costal".*

Décima.- *"Este trabajo de investigación describe por primera vez el efecto beneficioso de los USP sobre la consolidación y evolución de las fracturas costales y demuestra in vivo que inducen cambios biológicos cuantificables en la expresión génica cuando se aplican de forma continua y prolongada en el tiempo a dosis altas. Su mecanismo de acción es complejo y está influenciado por la intensidad aplicada".*

Undécima.- *"Desde un punto de vista traslacional, la eficacia de los ultrasonidos pulsátiles para modificar el curso evolutivo de las fracturas costales, su facilidad de aplicación y bajo coste, hacen que se plantee su uso como alternativa terapéutica en los pacientes con esta patología. Estos hallazgos podrían contribuir a cambiar el esquema de tratamiento actual de las fracturas y reducir de este modo el coste personal, sanitario, laboral y social de las mismas".*

Conclusions

One.- "The histological study of the fracture callus showed that the daily pulsated ultrasound treatment at 3 MHz and an intensity of 0.5 W/cm^2, accelerates fractures consolidation up to 5 times compared to the natural evolution".

Two.- "The radiological study of the fracture callus showed that the daily pulsated ultrasound treatment at 3 MHz and 0,5 W/cm^2 accelerates the fracture consolidation up to 4 times compared to the natural evolution".

Three.- "The most efficient doses of pulsated ultrasound treatment are 50 mW/cm^2 I_{SATA} (10% pulse) and 100 mW/cm^2 I_{SATA}, (20% pulse). A consolidation of up to 7.7 and 6.1 greater, respectively, than the consolidation reached by the natural repair of the fracture focus has been obtained with these doses of treatment".

Four.- "The highest dose of 250 mW/cm^2 (50% pulse) produces a non-desirable effect of tissue injury that educes the probability of consolidation compared to the lowest doses. However, this is still higher than that consolidation observed in non-treated animals. Namely, the probability of consolidation decreases as the pulse increases and consequently the applied intensity of pulsated ultrasound".

Five.- "The biggest consolidation effect on the fracture focus took place when the pulsated ultrasound treatment was administered for more than 10 days, obtaining a consolidation of up to five times greater than that consolidation observed in non-treated animals. On the other hand, when the treatment was shorter than 10 days, the probability of consolidation decreased to 1.4 times in the radiological study and to 1.7 in the histological one. This shows that the in vivo pulsated ultrasound-induced costal repair requires an extended and continuous time of treatment".

Six.- "***High percentages of consolidation of costal fractures have been obtained with a short rate of pulsated ultrasound of 3 minutes a day in a continuous and extended way during 28 days. This is an important difference compared with the rates of application most commonly used in fractures on lower extremities that usually are 5 or 7 times higher. This allows to shorten significantly the time of treatment for this pathology, making it more tolerable and easier to use. This fact is to bear in mind from a traslational perspective".***

Seven.- *"The pulsated ultrasound treatment on costal fractures induces the expression of proliferative genes including Igf1 y Vegf and anti-inflammatory genes including Socs2 and Socs3 in early and late repair phases of such fractures".*

Eight.- *"The most efficient dose, 50 mW/cm^2, doesn't induce the expression of these genes whereas it is showed with the 100 mW/cm^2 dose (increase in the Igf1, Socs2, Socs3 expression and decrease in MCP-1) and with the 250 mW/cm^2 dose (increase in the Igf1, Socs2, Socs3 and Vegf expression) both in early and late phases of the treatment. This way, as the applied intensity increases, the efficiency of the osseous callus decreases and these genes compensatory expression increases in order to alleviate the inflammation and tissue injury induced by the highest doses".*

Nine.- *"Only the 250 mW/cm^2 dose led to changes in the expression of the genes related to the osseous cellular differentiation. Particularly a decrease in Col2a1, what could influence on the negative effect of this dose on the osseous consolidation of costal fracture callus".*

Ten.- *"This research describes for this first time the beneficial PUS effect on the consolidation and evolution of costal fractures and shows in vivo that they lead into countable biological changes in the genetic expression when applied in a continuous and extended way in time at high doses. Its mechanism of action is complex and is affected by the applied intensity".*

Eleven.- *"From a traslational perspective, the efficiency of pulsated ultrasound to modify the evolutive course in costal fractures, the ease of application and its low cost, makes its use to be considered as a therapeutical alternative in patients with this pathology. These finds could contribute to modify the present fracture treatment scheme reducing the personnel, health care, labor and social cost of such fractures".*

Bibliografía

Ahmed Z. y Mohyuddin Z. Management of flail chest injury: internal fixation versus endotracheal intubation and ventilation. J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 110: 1676-1680.

Ainola MM., Mandelin JA., Liljeström MP., Li TF., Hukkanen MV. y Konttinen YT. Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: involvement of MMP-3 and interleukin-1beta. Clin Exp Rheumatol 2005 23: 644-50.

Ajubi N. E., Klein-Nulend J., Alblas M. J., Burger E. H. y Nijweide P. J. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. Am J Physiol 1999; 276: E171-E178.

Andrew JG., Hoyland JA. y Freemont AJ Marsh DR. Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. Bone 1995; 16: 455-460

Armstrong A. L., Barrach H. J. y Ehrlich M. G. Identification of the metalloproteinase stromelysin in the physis. J Orthop Res 2002 20 (2): 289-294.

Azuma Y., Ito M., Harada Y. y al. et Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. J Bone Miner Res 2001; Apr;16(4): 671-680.

Baldeyrou P. Pneumologie Encycl Méd Chir. Endoscopie bronchique diagnostique.Techniques et indications. 2000; 10: p. 14.

Bandow K., Nishikawa Y., Ohnishi T., Kakimoto K., Soejima K., Iwabuchi S., Kuroe K. y Matsuguchi T. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) induces RANKL, MCP-1, and MIP-1beta expression in osteoblasts through the angiotensin II type 1 receptor. J Cell Physiol 2007; 211 (2): 392-398.

Battistella F. y Benfield J. R. Blunt and Penetrating Injuries of the Chest Wall, Pleura and Lungs. Philadelphia: Shields TW, Editor. General Thoracic Surgery. Williams & Wilkins, 1994; p. 767-784.

Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. Rev Sci Tech 2005; 24: 503-513.

Baylink DJ., Finkelman RD. y Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. J Bone Miner Res 1993; 8(Suppl 2): 565-572.

Beck L. S., Amento E. P. y Xu Y. TGF-heta, induces hone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta. J Bone and Min Res 1993; 8: 753-761.

Beck L. S., Deguzman L., Lee W. P, Xu Y., McFatridge L. A y Amento E. P. TGF-beta 1 accelerates wound healing: reversal of steroid-impaired healing in rats and rabbits. Growth Factors 1991; 5: 295.

Becker S. Carus' Inaugurale Dissertation Medizinische Akademie 'Carl Gustav. Untersuchungen mit der Infrarotoszillographie über die segmentale Wirkung des Ultraschalls bei GefäBgesunden und GefäBkranken. Dresden: 1969; p.

Bejcek B. E., Li D. Y. y Deuel T. F. Transformation by v-sis occurs by an internal autoactivation mechanism. Science 1989; 245(4925): 1496-9.

Benkeser P. J., Frizzell L. A., Holmes K. R. y Goss S. A A perfused phantom for ultrasound hyperthermia. IEEE Trans Biomed Eng 1990; 37: 425-428.

Bennett N. T. y Schultz G. S. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. Am J Surg 1993a; 165 (6): 728-37.

Bennett N. T. y Schultz G. S. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. Am J Surg 1993b; 166 (1): 74-81.

Bergeron E., Lavoie A. y Clas D. Elderly trauma patients with rib fractures are at greater risk of death and pneumonia. J Trauma 2003; 54: 478-485.

Binderman I, Zor U, Kaye AM, Shimshoni Z, Harell A y Somjen D The transduction og mechanical force into biochemical events in bone cells may involve activation of phospholipase A_2. Calcif Tissue Int 1988; 42: 261-266.

Blevins Ch. E. (Editor) Shields TW. General Thoracic Surgery

Blevins ChE. TW Shields. General Thoracic Surgery. Anatomy of the thorax. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994; Volume 1, Chapter 1: p.

Blundell T L. y Humbel R E. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. Nature 1980; 287: 781–787.

Bly N. N., McKenzie A. y Wong T. Incisional wound healing: a controlled study of low and high ultrasound. J Orthop Sports Phys Ther 1993; 18(5): 619-628.

Bolander M. E. Regulation of fracture repair by growth factors. Proc Soc Exp Biol Med 1992; 200: 165-170.

Bostrom MP. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. Clin Orthop 1998; 355(Suppl): 116-123.

Bourque WT., Gross M. y Hall BK. Expression of four growth factors during fracture repair. Int J Dev Biol 1993; 37: 573-579.

Brasel K. J., Guse C. E. y Layde P. Rib fractures: relationship with pneumonia and mortality. Crit Care Med 2006 34 (6): 1642-1646.

Brown B. S. How safe is diagnostic ultrasonography? Canadian Medical Association Journal 1984; 131(4): 307-311.

Buckley MJ, Banes AJ, Levin LG, Sumpio BE, Sato M, Jordan R, Gilbert J, Link GW y Tran Son Tay R Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension in vitro. Bone Miner 1988; 4: 225-236.

Bulger E. M., Arneson M. A. y Mock C. N. Rib fractures in the elderly. J Trauma 2000 48 (6): 1040-1046.

Bulger E. M., Edwards T. y Klotz P. Epidural analgesia improves outcome after multiple rib fractures. Surgery 2004; 136 (2): 426-430.

Busse J. W., Bhandari M., Kulkarni A. V. y Tunks E. The effect of low-intensity ultrasound therapy on time to fracture healing; a meta-analysis. CMAJ 2002; 166 (4): 437-441.

Calvo V., Morcillo A., García A. y Paris F. Torácica J.A. Caminero y L. Fernández. Manual de Neumología y Cirugía. Traumatismos torácicos cerrados y abiertos del tórax. Madrid: SEPAR, 2000; p. 1601-1618.

Canalis E. , Economides A. N. y Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. Endocr Rev 2003; 24: 218-35.

Canalis E., McCarthy T. y Centrella M. Growth Factors and the Regulation of Bone Remodeling. J Clin Invest 1988; 81: 277-281.

Carter K. Growth factors: the wound healing therapy of the future. Br J Community Nurs. 2003 8 (9): S15-6,S18-9, S22-3.

Castella J. y Puzo Mª. C. SA Salvat Editores. Broncología. Barcelona: 1982; p. 135.

Ceran S. , Sunam G. S. y Aribas O. K. Chest trauma in children. Eur J Cardiothorac Surg. 2002; 21: 57-59.

Chang W. H., Sun J. S., Chang S. P. y Lin J. C. Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. Bioelectromagnetics 2002; 23(4): 256-263.

Chao E. Y., Inoue N. y Elias J. J. Enhancement of fracture healing by mechanical and surgical intervention. Clin Orthop 1998; Suppl 355: 163-178.

Cho T. J., Gerstenfeld L. C. y Einhorn T. A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. J Bone Miner Res 2002; 17: 513-520.

Chomczynski P. y Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162: 156-159.

Cicuttini F. M. y Spector T. D. The genetics of osteoarthritis. J Clin Pathol 1996; 49: 617-619.

Citivelli R., Kim Y. S., Gunsten S. L., Fujimori A., Husley M., Avioli L. V. y Hruska K. A. Nongenomic activation of the calcium message system by vitamin D metabolites in osteoblast-like cells. Endocrinology 1990; 127: 2253-2262.

Claes L. E., Heigele C. A. y Neidlinger-Wilke C. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. Clin Orthop 1998; Suppl 355: 132-147.

Claes L. y Willie B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. Progress in Biophysics and Molecular Biology 2007; 93: 384-398.

Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. J Biol Chem 1994; 269(51): 32023-6.

Cocanour C. S. , Ostrosky-Zeichner L. y Peninger M. Cost of a ventilator-associated pneumonia in a shock trauma ICU. Surg Infect 2005; 6: 65-72.

Cocanour C. S. Rib fractures, pneumonia, and mortality. Crit Care Med. 2006; 34 (6): 1828-1829.

Cochran D. L. y Wozney J. M. Biological mediators for periodontal regeneration. Periodontol 2000 1999; 19: 40-58.

Colt H. G., Prakash U. B. S. y Offord K. P. Bronchoscopy in North America. J Bronchol 2000; 7: 8-25.

ConnolhJ F. y Shindell R. Percutaneous marrow injection for an ununited tibia. Nebraska Med 1986; 71: 105-107.

Cummings S. R. Are patients with hip fractures more osteoporotic? Review of the evidence. Am J Med 1985; 78(3): 487-94.

Cunningham J. L., Kenwright J. y Kershaw C.J. Biomechanical measurement of fracture healing. J Med Eng Tech 1990; 13: 92-101.

De Groot C. J. y Woodroofe M. N. The role of chemokines and chemokine receptors in CNS inflammation. Prog Brain Res 2001; 132: 533-544.

Deckers M. M., van Bezooijen R. L. y van der Horst G. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. Endocrinology 2002; 143: 1545-1553.

Déniz A.S., Marrerro I., Saavedra P., Méndez J., Sánchez J., Melián A., García A., Castillo M. A. y Gómez A. Aceleración de la consolidación de fracturas en ratas empleando ultrasonido a dosis terapéuticas. Rehabilitación (Madrid) 1998; 32: 247-253.

Desmouliere A., Redard M., Darby I. y Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. Am J Pathol 1995; 146: 56.

Dinno MA., Dyson M., Young SR., Mortimer A. J., Hart J. y Crum L. A. The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound. Phys Med Biol 1989; 34: 1543-1552.

Directiva del Consejo de la Comunidad Económica Europea de 24 de Noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. num.L.358.1 de 18 de diciembre de 1986.

Dittmann M., Steenblock U. y Kränzlin M. Epidural analgesia or mechanical ventilation for multiple Rib fractures? Intensive Care Med 1982; 8 (2): 89-92.

Duarte L. R. The Stimulation of Bone Growth by Ultrasound. Arch Orthop Trauma Surg 1983; 101: 153-159.

Dudley A. T., Lyons K.M. y Robertson E. J. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. Genes & Devel 1995; 9 (22): 2795-2807.

Duncan RL. y Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. Calcif Tissue Int 1995; 57: 344-358.

Dvorak H. F., Brown L. F., Detmar M. y Dvorak A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol 1995 146(5): 1029-39.

Dyson M. Biological effects of therapeutic ultrasound. Reumatol and Rehab 1973; 12: 209-213.

Dyson M. y Brookes M. Stimulation of bone repair by ultrasound. Proceedings of the 3rd Meeting of the world Federation of Ultrasound in Medicine and Biology. Oxford: Pergamon Press 1983; 61-66.

Eckhardt H., Ding M. y Lind M. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. J Bone Joint Surg (Br) 2005; 87-B: 1434-1438.

Eguchi K. Diagnosis and prediction of joint destruction found in patients with rheumatoid arthritis using by biochemical markers. Nippon Rinsho 2005; 63 (9): 1586-93.

Einborn T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop 1998; Suppl 355: 7-21.

Einhorn T. A. Enhancement of fracture-healing J Bone Joint Surg Am 1995; 77: 940-956

Embriology of the lungs. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994; Volume 1,Chapter 4: p. 1994.

Eppley B. L., Woodell J. E. y Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. Plast Reconstr Surg 2004; 114(6): 1502-1508.

Fatar M., Stroick M., Griebe M., Alonso A., Hennerici M. G. y Daffertshofer M. Brain temperature during 340-kHz pulsed ultrasound insonation: a safety study for sonothrombolysis. Stroke 2006; 37(7): 1883-1887.

Feinsilver SH y Fein AM. Wilkins Williams &. Textbook of Bronchoscopy. Baltimore: 1995; 1: p.

Feng X. Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. Mol Endocrinol 2000; 14 (7): 947-55.

Feril L. B. Jr. y Kondo T. Biological effects of low intensity ultrasound: the mechanism involved, and its implications on therapy and on biosafety of ultrasound. J Radiat Res (Tokyo) 2004; 45(4): 479-489.

Flagel B. T., Luchette F. A. y Reed R. L. Half-a-dozen ribs: the breakpoint for mortality. Surgery 2005; 138 (4): 717-723.

Fox S. W. y Lovibond A. C. Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption. Mol Cell Endocrinol. 2005; 24; 243 (1-2): 19-26.

Franceschi R. T. Biological Approaches to Bone Regeneration by Gene Therapy. J Dent Res 2005; 84: 1093-1103.

Frost H. M. Perspective on the estrogen-bone relationship and postmenopausal bone loss. J Bone Miner Res 1999; 14: 1473-7.

Garg A. K. The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. Dent Implantol Update 2000; 11(3): 17-21.

Gerstenfeld L C., Cullinane D M., Barnes G L., Graves DT. y Einhorn T A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. J Cell Biochem 2003; 88: 873-884.

Gillespy T 3rd. y Gillespy MP. Osteoporosis. Radiol Clin North Am 1991 29 (1): 77-84.

Giustina A., Mazziotti G. y Canalis E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. Endocr Rev 2008 29: 535-559.

Goldshmit Y., Walters C. E., Scott H. J., Greenhalgh C. J. y Turnley A. M. SOCS2 induces neurite outgrowth by regulation of epidermal growth factor receptor activation. J Biol Chem 2004; 279 (16): 16349-55

Gonzalez A. J., Sakamaki H., Hatori M. y Nagumo M. Evaluation of trismus after treatment of mandibular fractures. J Oral Maxillofac Surg 1992; 50(3): 223-8.

Goodship A. E. y Kennwright J. The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. J Bone Joint Surg 1985; 67B: 650-655.

Goodship A. E., Cunningham J. L. y Kenwright J Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing. Clin Orthop Clin North Am 1998; Suppl 355: 105-115

Grant M. B., Mames R. N., Fitzgerald C., Ellis E. A., Aboufriekha M. y Guy J. Insulin-like growth factor I acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and retina: comparative studies with basic fibroblast growth factor. Diabetologia 1993; 36(4): 282-91.

Gross T. S., Edwards J. L., McLeod K. J. y Rubin C. T. Strain gradients correlate with sites of periosteal bone formation. J Bone Miner 1997; 12 (6): 982-988.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. National Research Council. National Academy Press. Washington, D. C. 1996. p.110.

Gunther E.C. Prediction of clinical drug efficacy by classification of drug-induced genomic expression profiles in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100 (16): 9608-13.

Hadjiargyrou M., McLeod K. y Ryaby J. P. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. Clin Orthop 1998; Suppl 355: 216-219.

Hahn Y. S. , McLone D. G. y Uden D. Cervical intervertebral disc calcification in children. Childs Nerv Syst 1987; 3(5): 274-277.

Hannouche D., Petite H. y Sedel L. Current trends in the enhancement of fracture healing. J. Bone Joint Surg 2001; 83-B: 157-164.

Hantes M. E., Mavrodontidis A. N., Zalavras C. G., Karantanas A. H., Karachalios T. y Malizos K. N. Low-intensity transosseus ultrasound accelerates osteotomy healing in a sheep fracture model. J Bone Joint Surg Am 2004; 86-A (10): 2275-2282.

Harle J., Salih V., Mayia F., Knowles J. C. y Olsen I. Effects of ultrasound on the growth and function of bone and periodontal ligament cells in vitro. Ultrasound Med Biol 2001; 27(4): 579-586.

Harris G. J. y Soper R. T. Pedriatic first rib fractures. J Trauma 1990; 30: 343-345.

Harvey W., Dyson M., Pond J. B. y Grahame R. The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. Rheumatol Rehabil 1975; 14 (4): 237.

Healey M. A., Brown R. y Fleiszer D. Blunt cardiac injury: is this diagnosis necessary? J Trauma 1990; 30: 137-146.

Heckman J. D., Ryaby J. P. y Mcabe J. Acceleration of tibial fracture-healing by non invasive, low intensity pulsed ultrasound. J Bone Joint Surg 1994; 76 (A): 26-34.

Heckman JD. y Sarasohn-Kahn J. The economics of treating tibia fractures: the cost of delayed union. Bull Hosp Jt Dis 1997; 56: 63-72.

Hedayati H. y Zuzga J. J. Jr. Osteoporosis: current review. J Am Osteopath Assoc 1988; 88(12): 1495-8, 1503-8.

Hedenqvist P., Roughan J. V. y Flecknell P. A. Effects of repeated anaesthesia with ketamine/medetomidine and of pre-anaesthetic administration of buprenorphine in rats. Lab Anim 2000; 34 (2): 207-211

Herndon D. N., Nguyen T. T. y Gilpin D. A. Growth factors. Local and systemic. Arch Surg 1993; 128 (11): 1227-33.

Heyland D. K. , Cook D. J. y Griffith L. The attributable morbidity and mortality of ventilator-associated pneumonia in the critically ill patient. Am J Respir Crit Care Med 1999; 159: 1249-1256.

Hill C. R. Ultrasonic exposure threshold for changes in cells and tissues J Acoust Soc Am 1971; 52 (2 Pt.2): 667-672.

Hill C. S. y Treisman R. Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. EMBO J 1995; 14 (20): 5037-47.

Hogan R. D. The effects of ultrasound on microvascular hemodynamic in skeletal muscle: effect on arterioles. Ultrasound in med and biol 1982; 1: 45-55.

Holcomb J. B., McMullin N. R. y Kozar R. A Morbidity from rib fractures increases after age 45. J Am Coll Surg 2003; 196 (4): 549-555.

Honeybourne D., Babb J. y Bowie P. British Thoracic Society guidelines on diagnostic flexible bronchoscopy. Thorax 2001; 56(suppl): i1- i21:

Ibarra C., Garciadiego D., Martínez V. y Velasquillo C. Ingeniería de tejidos y osteoartritis. Reumatol Clin 2007; 3 Supl 3: S19-22.

Ikeda S. Publishers Georg Thieme. Atlas of Flexible Bronchoscopy. Stuttgart: 1974; p.

Jane Boada J. Manual práctico de electroterapia. Barcelona: EUNIBAR.Editorial Universitaria de Barcelona, 1982; p. 239-261.

Jelinsky S. A. Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged Saccharomyces cerevisiae cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. Mol Cell Biol 2000; 20 (21): 8157-67.

Jia L., Takahashi M., Morimoto H., Takahashi S., Izawa A., Ise H., Iwasaki T., Hattori H., Wu K. J. y Ikeda U. Changes in cardiac lipid metabolism during sepsis: the essential role of very low-density lipoprotein receptors. Cardiovasc Res 2006 69(2): 545-555.

Jingushi S, Joyce ME y Bolander ME Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. J Bone Miner Res 1992; 7: 1045-1055.

Jingushi S., Iwamoto Y., Azuma Y., Itoh M., Harada Y. y Takagi h. Effects of noninvasive pulsed low-intensity ultrasound on rat femoral fracture. Kossetsu (Fracture) 1999; 21: 655-658.

Joyce M. E., Jingushi S. y Bolander M. E. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. Orthop Clin North Am 1990a; 21: 199-209.

Joyce M. E., Roberts A. B. y Sporn M. B. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. Cell Biol 1990b; 10: 2195-2207.

Junqueira L. C. y Carneiro J. Basic Histology: Text & Atlas. McGraw-Hill Professional, 2005; p. 502.

Kanis J. A. The restoration of skeletal mass: a theoretic overview. Am J Med 1991; 91 (5B): 29S-36S.

Karmakar M. K. y Ho A. M. Acute pain management of patients with multiple fractured ribs. J Trauma 2003; 54 (3): 615-625.

Karsdal M. A., Larsen L., Engsig M. T., Lou H., Ferreras M., Lochter A., Delaissé J. M y Foged N. T. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. J Biol Chem 2002; 277 (46): 44061-44067.

Kawai J. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. Nature 2001; 409 (6821): 685-90.

Kenwright J. y Goodship A. E. Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. Clin Orthop 1988; 241: 36-47.

Kerr-Valentic M. A. , Arthur M. y Mullins R. J. Rib fracture pain and disability: can we do better?. J Trauma 2003; 54 (6): 1058-1063; discussion 1063-1064.

Keski O. J., Blasi F. y Leof E. B. Regulation of the synthesis and activity of urokinase plasminogen activator in A549 human lung carcinoma cells by transforming growth factor beta. Cell Biol 1988; 106: 451-459.

Khan S N., Bostrom M P. y Lane J M. Bone growth factors. Orthop Clinic North Am 2000; 31: 375-388.

Khan Y. y Laurencin C. T. Fracture repair with ultrasound: clinical and cell-based evaluation. J Bone Joint Surgery Am. 2008; 90 (Suppl 1): 138-144.

Kloen P., Di Paola M., Borens O., et y al BMP signalling components are expressed in human fracture callus. Bone 2003; 33: 362-371.

Klug W., Franke WG. y Knoch HG. Scintigraphic control of bone-fracture healing under ultrasonic stimulation: an animal experimental study. Eur J Nucl Med 1986; 11 (12): 494-497.

Koch C.A., Anderson D., Moran M. F., Ellis C. y Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. Science 1991; 252 (5006): 668-674.

Kokubu T., Matsui N. y Fujioka H. Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun 1999; 256 (2): 284-287.

Krebs D. L. y Hilton D. J. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. Stem Cells 2001; 19(5): 378-387.

Kristiansen T. K. The effect of low power specifically programmed ultrasound on the healing time of fresh fractures usintg a Colles model. J Orthop Trauma 1990; 4: 227-228.

Kristiansen T. K., Burlington J. P. R., McMabe J., McCabe J., Frey J. J. y Roe R. L. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double blind, placebocontrolled study. J Bone Joint Surg Am 1997; 79: 961-973.

Kübler N. R. Effect of different factors on the bone forming properties of recombinant BMPs. Biomaterials 2001; 1: 11-17.

Kubota E., Imamura H., Kubota T., Shibata T. y Murakami K. Interleukin 1 beta and stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. J Oral Maxillofac Surg 1997; 55 (1): 20-27; discussion 27-28.

Lazcano A., Dougherty J.M. y Kruger M Use of rib belts in acute rib fractures. Am J Emerg Med 1989; 7: 97-100.

Lee R. B. , Bass S. M. , Morris J. A. Jr. y MacKenzie E. J. Three or more rib fractures as an indicator for transfer to a level I trauma center: a population-based study. J Trauma 1990; 30: 689-694.

Lee R. B., Morris J. A. y Parker R. S. Presence of three or more rib fractures as an indicator of need for interhospital transfer. J Trauma 1989; 29 (6): 795-799.

Lehmann J. F. edicion. Williams and Wilkins Baltimore.3a. Therapeutic heat and cold. Baltimore, Londen: 1982; p.

Leibovich S. J. y Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. Am J Pathol 1975; 78 (1): 71-100.

Leibowitz H. M., Morello S. Jr., Stern M. y Kupferman A. Effect of topically administered epidermal growth factor on corneal wound strength. Arch Ophthalmol 1990 108 (5): 734-7.

Leroith D. y Nissley P. Knock your SOCS off! J Clin Invest 2005; 115 (2): 233-236.

Ley 32/2007, de 7 de Noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

Li G., Cui Y. y McIlmurray L. RhBMP-2, rhVEGF165, rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. J Orthop Res 2005; 23: 680-685.

Li J. K., Lin J. C., Liu H. C., Sun J. S., Ruaan R. C., Shih C. y Chang W. H. Comparison of ultrasound and electromagnetic field effects on osteoblast growth. Ultrasound Med Biol 2006; 32 (5): 769-775.

Lieberman J. R., Daluiski A. y Einhorn T. A. The role of growth factors in the repair of bone: biology and clinical applications. J Bone Joint Surg (Am) 2002; 84-A: 1032-1044.

Lorentzon M., Greenhalgh C. J., Mohan S., Alexander W. S. y Ohlsson C. Reduced bone mineral density in SOCS-2-deficient mice. Pediatr Res 2005; 57: 223-226.

Lynch S. E., Nixon J. C., Colvin R. B. y Antoniades H. N. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(21): 7696-7700.

Lynch S. E., Williams R. C., Polson A. M., Howell T. H., Reddy M. S., Zappa U. E. y Antoniades H. N. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. J Clin Periodontol 1989 16 (8): 545-548.

Lyon R., Liu X. C. y Meier J. The effects of therapeutic vs high-intensity ultrasound on the rabbit growth plate. J Orthop Res 2003; 21 (5): 865-871.

Mackersie R. C. , Karagianes T. G. y Hoyt D. B. Prospective evaluation of epidural and IV administration of fentanyl for pain control and restoration of ventilatory function following multiple rib fractures. J Trauma 1991; 31: 443-449; discussion 49-51.

Macrae V. E., Horvat S., Pells S. C., Dale H., Collinson R. S., Pitsillides A. A., Ahmed S. F. y Farquharson C. Increased bone mass, altered trabecular architecture and modified growth plate organization in the growing skeleton of SOCS2 deficient mice. J Cell Physiol 2009; 218 (2): 276-284.

Madlener M., Parks W. C. y Werner S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. Exp Cell Res 1998; 242: 201.

Malaval L., Modrowski D., Gupta A. K. y Aubin J. E. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. J Cell Physiol 1994; 158 (3): 555-572.

Malizos KN, Hantes ME, Protopappas V. y Papachristos A. Low-intensity pulsed ultrasound for bone healing: an overview. Injury 2006; Apr;37 Suppl 1: S56-62:

Manolagas S. C. y Jilka R. L. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. N Engl J Med 1995; 332(5): 305-11.

Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science 1997; 276(5309): 75-81.

Massagué J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem 1998; 67: 753-91.

Massagué J. The transforming growth factor-beta family. Annu Rev Cell Biol 1990; 6: 597-641.

Mayberry J. C., Terhes J. T. y Ellis T. J. Absorbable Plates for Rib Fracture Repair: Preliminary Experience Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care 2003; 55 (5): 835-839.

Mayberry J.C. y Trunkey D.D. The fractured rib in chest wall trauma. Chest Surg Clin North Am 1997; 7: 239-261.

Mayer H., Bertram H., Lindenmaier W., et y al Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. J Cell Biochem 2005; 95: 827-839

Mbalaviele G., Sheikh S., Stains J. P., Salazar V. S., Cheng S. L., Chen D. y Civitelli R. Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation. J Cell Biochem. 2005; 1; 94 (2): 403-418.

McKeown S. T., Barnes J. J., Hyland P. L., Lundy F. T., Fray M. J. y Irwin C. R. Matrix metalloproteinase-3 differences in oral and skin fibroblasts. J Dent Res 2007; 86(5): 457-462.

Metcalf D., Greenhalgh C. J., Viney E., Willson T. A., Starr R., Nicola N. A., Hilton D. J. y Alexander W. S. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. Nature 2000 405(6790): 1069-73.

Middleton C., Edwards M. y Lang N. Management and treatment of patients with fractured ribs. Nurs Times 2003; 99 (5): 30-32.

Moon M. R. , Luchette F. A. y Gibson S. W. Prospective, randomized comparison of epidural versus parenteral opioid analgesia in thoracic trauma. Ann Surg 1999; 229: 684-691; discussion 91-92.

Moreno de la fuente J L. Podología física. España: Elsevier 2006; Terapeútica física instrumental: p. 372.

Morimoto H., Takahashi M., Izawa A., Ise H., Hongo M., Kolattukudy P. E. y Ikeda U. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Circ Res 2006; 99 (8): 891-899.

Mueller R. V., Hunt T. K., Tokunaga A. y Spencer E. M. The effect of insulinlike growth factor I on wound healing variables and macrophages in rats. Arch Surg 1994; 129: 262.

Mullis KB. y Faloona FA. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. Methods in Enzymology 1987; 155: 335

Mundy G. R. Is prolonged stimulation of bone growth a therapeutic possibility? Mol Cell Endocrinol 1991; 75 (2): C19-25.

Mundy G. R. Local control of bone formation by osteoblasts. Review. Clin Orthop Relat Res 1995; 313: 19-26.

Murphy G. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. Acta Orthop Scand 1995; 66 (suppl 256): 55-60.

Mustafa Z., Chapman K., Irven C., Carr A. J., Clipsham K., Chitnavis J., Sinsheimer J. S., Bloomfield V. A., McCartney M., Cox O., Sykes B. y Loughlin J. Linkage analysis of candidate genes as susceptibility loci for osteoarthritissuggestive linkage of COL9A1 to female hip osteoarthritis. Rheumatology 2000; 39: 299-306.

Nahirnyak V., Mast T. D. y Holland C. K. Ultrasound-Induced Thermal Elevation in Clotted Blood and Cranial Bone Ultrasound in Medicine and Biology 2007; 33 (8): 1285-1295

Naruse K., Mikuni-Takagaki Y. y Azuma Y. Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound Biochemical and Biophysical Research Communications 2000; 268 (1): 216-220.

Naruse K., Miyauchi A. y Itoman M. Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. J Bone Miner Res 2003 18 (2): 360-369.

Nemoto O., Yamagishi M., Yamada H., Kikuchi T. y Takaishi H. Matrix metalloproteinase-3 production by human degenerated intervertebral disc. J Spinal Disord 1997; 10 (6): 493-8.

Netter F. H. S.A. Salvat Editores. Anatomía y embriología. En: Colección Ciba de Ilustraciones Médicas. Barcelona: 1984; Tomo VII. Sistema Respiratorio. Sección I: p. 1-43.

Nicklas W., Baneux P., Boot R., Decelle T., Deeny A. A., Fumanelli M. y Illgen-Wilcke B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. Laboratory Animals 2002; 36: 20-42.

Noda M. y Camilliere J. J. In vivo stimulation of hone formation by transforming growth factor-beta. Endocrinology 1989; 124: 2991-2994.

Norcross K. Strapping up the broken rib. Lancet 1980; 1: 589-590.

Nunamaker D. M. Experimental Models of Fracture Repair. Clin Orthop 1998; 355S: 56-65.

O'Sullivan M. E., Bronk J. T. y Chao E. Y. Experimental study of the effect of weight bearing on fracture healing in the canine tibia. Clin Orthop 1994; 302: 273-283.

Okada A., Tomasetto C., Lutz Y., Bellocq J. P., Rio M. C. y Basset P. Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound heling: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. J Cell Biol 1997; 137: 67.

Okazaki K., Jingushi S., Ikenoue T., et y al Expression of parathyroid hormonerelated peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing. J Orthop Res 2003; 21: 511-20.

Okazaki R., Sakai A. y Uenzo Y. Sequential changes of transforming growth factor (TFC)-beta1 concentration in synovial fluid and mRNA expression of TFC-beta1 receptors in chondrocytes after immobilization of rabbig knees. J Bone Miner Metab 2001; 19: 228-235.

Omi H., Mochida J., Iwashina T., Katsuno R., Hiyama A., Watanabe T., Serigano K., Iwabuchi S. y Sakai D. Low-intensity pulsed ultrasound stimulation enhances TIMP-1 in nucleus pulposus cells and MCP-1 in macrophages in the rat. J Orthop Res 2008 26 (6): 865-871.

Ouyang X., Fujimoto M., Nakagawa R., Serada S., Tanaka T., Nomura S., Kawase I., Kishimoto T. y Naka T. SOCS-2 interferes with myotube formation and potentiates osteoblast differentiation through upregulation of JunB in C2C12 cells. J Cell Physiol 2006; 207 (2): 428-436.

Owen AH 3rd. Modified function regulator for vertical maxillary excess. J Clin Orthod 1985; 19 (10): 733-749.

Papazian L. , Bregeon F. y Thirion X. Effect of ventilator-associated pneumonia on mortality and morbidity. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 91-97.

Paris F. y García-Zarza A. Traumatismos torácicos. Barcelona Balibrea Cantero JL, Editor. Tratado de Cirugía. Editorial Toray SA, 1988; p. 1118-1133

Parvizi J., Parpura V. y Greenleaf J. F. Calcium signaling is required for ultrasound-stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes. J Orthop Res 2002; 20 (1): 51-57.

Pavalko F. M., Chen N. X, Turner C. H., Burr D. B., Atkinson S., Hsieh Y. F., Qiu J. y Duncan R. L. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. Am J Physiol 1998; 275: C1591-C1601.

Pelttari K., Lorenz H., Boeuf S., Templin M F., Bischel O., Goetzke K., Hsu H Y., Steck E. y Richter W. Secretion of matrix metalloproteinase 3 by expanded articular chondrocytes as a predictor of ectopic cartilage formation capacity in vivo. Arthritis & Rheumatism 2008; 58: 467 - 474.

Pérez Casas A y Bengoechea M. E. . Esqueleto del tórax (skeleton thoracis). En: Pérez Casas A, Bengoechea ME. Anatomía funcional del aparato locomotor. Madrid: Editorial Paz Montalvo S.A. , 1978; Capítulo 22.: p. 266-290.

Pilla A. A. Low-intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent? J Orthop Sci 2002; 7 (3): 420-428.

Pilla A. A:, Mont M. A., Nasser P. R., Khan S. A., Figueiredo M. y Kaufman J. J. Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. J Orthop Trauma 1990; 4: 246-253.

Posner L. J., Miligkos T., Gilles J. A., Carnes D. L., Taddeo D. R. y Graves D. T. Monocyte chemoattractant protein-1 induces monocyte recruitment that is associated with an increase in numbers of osteoblasts. Bone 1997 21 (4): 321-327.

Prakash UBS. Press Raven. Bronchoscopy. New York: 1993; 1: p. 78.

Quick G. A randomized clinical trial of rib belts for simple fractures. Am J Emerg Med 1990; 8: 277-281.

Radonić A., Thulke S., Mackay I. M., Landt O., Siegert W. y Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochem Biophys Res Commun 2004; 313 (4): 856-862.

Raff M. C. Size control: the regulation of cell numbers in animal development. Cell 1996; 86: 173-175.

Rappolee D. A., Mark D., Banda M. J. y Werb Z. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. Science 1988; 241: 708.

Rawool NM., Goldberg BB. y Forsberg F. Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound. J Ultrasound Med 2003; 22(2): 145-153.

Real Decreto 1201/2005 del Ministerio de la Presidencia, de 10 de Octubre, sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE num. 252 de 21 de Octubre de 2005.

Reher P., Elbeshir E., Harvey W., Meghji S. y Harris M. The stimulation of bone formation in vitro by therapeutic ultrasound. Ultrasound Med Biol 1997; 23 (8): 1251-1258.

Reher P., Harris M., Whiteman M., Hai H. K. y Meghji S. Ultrasound stimulates nitric oxide and prostaglandin E2 production by human osteoblasts. Bone 2002; 31(1): 236-241.

Riancho J. A., Zarrabeitia M. T. y González Macías J. The cytokines that maintain living bone. Med Clin (Barc) 1992; 99(3): 110-5.

Rico-Bautista E., Flores-Morales A. y Fernández-Pérez L. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. Cytokine Growth Factor Rev 2006; 17(6): 431-439.

Rinderknecht E. y Humbel R. E. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73(7): 2365–2369.

Roberts A. B., Sporn M. B. y Assoian R. K. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 4167.

Roberts A. W., Robb L., Rakar S., Hartley L., Cluse L., Nicola N. A., Metcalf D., Hilton D. J. y Alexander W. S. Placental defects and embryonic lethality in mice

lacking suppressor of cytokine signaling 3. Proc Natl Acad Sci USA 2001 98(16): 9324-9329.

Rochon R. B. , Rice Ch. L. y Carrico C. J. . Adult Respiratory Distress Syndrome. Philadelphia: Shields TW, Editor. General Thoracic Surgery. Williams & Wilkins, 1994; p. 788-798.

Rodman M. J. Analgesics and anti-inflammatories. RN 1993; 56 (1): 54-60.

Rosenfeld R.G. y Roberts C.T. The IGF system molecular biology, physiology and clinical applications. 1 st ed. Totawa, NJ; Humana Press 1999;

Rozen S. y Skaletsky J. H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Krawetz, S. Misener, S. eds. Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Torowa, NJ: Humana Press 2000; 365-386.

Rubin C. D. Age-related osteoporosis. Am J Med Sci 1991; 301 (4): 281-98.

Rubin C. T. y Lanyon L. E. Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. Calcif Tissue Int 1985; 37: 411-417.

Rubin C., Bolander M. E., Ryaby J. P. y Hadjiargyrou M. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. J Bone Joint Surg Am 2001; 83-A (2): 259-270.

Rubin J., Biskobing D., Fan X., Rubin C., McLeod K. y Taylor W. R. Pressure regulates osteoclast formation and MCSF expression in marrow culture. J Cell Physiol 1997; 170: 81-87.

Ryaby JT., Bachner EJ., Bendo JA., Dalton P., Tannenbaum S. y Pilla A. A. Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. . Trans Orthop Res Soc 1989; 14: 15

Saito M., Soshi S., Tanaka T. y Fujii K. Intensity-related differences in collagen post-translational modification in MC3T3-E1 osteoblasts after exposure to low- and high-intensity pulsed ultrasound. Bone 2004; 35(3: 644-55.

Sakurakichi K., Tsuchiya H. y Uehara K. Effects of timing of low-intensity pulsed ultrasound on distraction osteogenesis. J Orthop Res 2004; 2: 395-403.

Sánchez I., Hughes R. T., Mayer B. J., Yee K., Woodgett J. R., Avruch J., Kyriakis J. M. y Zon L. I. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. Nature 1994; 372(6508): 794-798.

Sasaki A., Sasaki K., Konttinen Y. T., Santavirta S., Takahara M., Takei H., Ogino T. y Takagi M. Hyaluronate inhibits the interleukin-1beta-induced expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 in human synovial cells. Tohoku J Exp Med 2004; 204 (2): 99-107.

Scheufler C., Sebald W. y Hülsmeyera M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. J Mol Biol 1999; 287: 103-115.

Schnoke M. y Midura R. J. Pulsed electromagnetic fields rapidly modulate intracellular signaling events in osteoblastic cells: comparison to parathyroid hormone and insulin. J Orthop Res 2007; 25 (7): 933-940.

Schultz G., Rotatori D. S. y Clark W. EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. J Cell Biochem 1991; 45 (4): 346-52.

Schwachtgen J. L., Houston P., Campbell C., Sukhatme V. y Braddock M. Fluid shear stress activation of egr-1 transcription in cultured human endothelial and epithelial cells is mediated via the extracellular signal-related kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. J Clin Invest 1998; 101: 2540-2549.

Sena K., Leven R. M. , Mazhar K., Sumner D. R. y Virdi A. S. Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. Ultrasound Med Biol 2005; 31 (5): 703-708.

Senn N. Senn on the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. Annals of Surgery 1889; 10 (5): 352-368.

Shields T. W. y Vanecko R. M. Trauma to the Esophagus. Philadelphia: Shields TW, Editor. General Thoracic Surgery. Williams & Wilkins, 1994; p. 494-505.

Shimizu N., Mayahara K., Kiyosaki T., Yamaguchi A., Ozawa Y. y Abiko Y. Low-intensity laser irradiation stimulates bone nodule formation via insulin-like growth factor-I expression in rat calvarial cells. Lasers Surg Med 2007; 39 (6): 551-559.

Shorr R. M., Crittenden M. , Indeck M., Hartunian S. L. y Rodriguez A. Blunt thoracic trauma: Analysis of 515 patients. Ann Surg 1987; 206: 200-205.

Simpson A. H. R. W. , Mills L. y Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. J Bone Joint Surg (Br) 2006; 88-B, Nº 6: 701-705.

Sing R. F., Mostafa G. y Matthews B. D. Thoracoscopic resection of painful multiple rib fractures: case report. J Trauma 2002; 52: 391-392.

Sirmali M., Türüt H. y Topcu S A comprehensive analysis of traumatic rib fractures: morbidity, mortality and management. Eur J Cardiothorac Surg 2003; 24: 133-138.

Siska P. A., Gruen G. S. y Pape H. C. External adjuncts to enhance fracture healing: what is the role of ultrasound? Injury 2008; 39(10): 1095-1105.

Siska P., Gruen G. S., Menzel C. y Pape H. C. External adjuncts to enhance fracture healing : What is the role of ultrasound? Unfallchirurg 2009; 112(1): 6-14.

Slavin J. The role of cytokines in wound healing. J Pathol 1996; 178(1): 5-10.

Smith M. G. Rotational displacement of the distal epiphysis of the tibia without fracture. Injury 1988; 19 (3): 209-11.

Smith N. H. y Hynynen K. The feasibility of using focused ultrasound for transmyocardial revascularization. Ultrasound in Med and Biol 1998; 24 (7): 1045-1054.

Smith R. Baker P. F. Eds. Recent Advances in Physiology. Recent advances in the metabolism and physiology of bone. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984; 10: p. 317-348.

Sporn M. B. y Roberts A. B. Peptide growth factors are multifunctional. Nature 1988; 332: 217-219.

Sporn M. B. y Roberts A. B. Transforming growth factor-beta. Multiple actions and potential clinical applications. J Am Med Ascii 1989; 262: 938-941.

Staff V. V., González-Merlo J., González Bosquet E. y González Bosquet E. 8 Edition:. Ginecología. España: Elsevier, 2003; p. 752.

Sternlicht M. D. y Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annual Review of Cell and Developmental Biology 2001 17: 463-516

Sthepen B., Trippel R. D. C. y Einhorn T. A. Growth Factors as Therapeutic Agents. J Bone Joint Surg Am 1996; 78: 1272 -1286.

Strachan T. y Read A. P. Traducido por Luis Ruiz-Ávila. Colaborador Andrew P. Read Luis Ruiz-Ávila. Genética molecular humana. 2ed. Omega, 1999; p. 656

Street J. T., Wang J. H. y Wu Q. D. The angiogenic response to skeletal injury is preserved in the elderly. J Orthop Res 2001; 19: 1057-1066.

Taipale J., Saharinen J. y Keski-Oja J. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. Adv Cancer Res 1998; 75: 87.

Tanaka H., Yukioka T. y Yamaguti Y. Surgical stabilization of internal pneumatic stabilization? A prospective randomized study of management of severe flail chest patients. J Trauma 2002; 52: 727-732.

Telfah H. dissertation MS. Changes in blood flow, tissue metabolism and fat content in the irradiated mandible detected by means of near infrared spectroscopy (NIRS). London: Eastman Dental Institute, University of London, 1995; p.

Tencer A. F., Johnson K. D. y Kyle R. F. Biomechanics of fractures and fracture fixation. Instr Course Lect 1993; 42: 19-55.

Tis J. E., Meffert C. R., Inoue N., McCarthy E. F., Machen M. S., McHale K. A. y Chao E. Y. The effect of low intensity pulsed ultrasound applied to rabbit tibiae during the consolidation phase of distraction osteogenesis. J Orthop Res 2002; 20 (4): 793-800.

Trock D. H. Electromagnetic fields and magnets: investigational treatment for musculoskeletal disorders. Rheum Dis Clin North Am 2000; 26: 51-62.

Trunkey D. . Cervicothoracic trauma. New York: Thieme.: Blaisdell F, Trunkey D, eds. Trauma Management, 1986; 3: p. 115.

Tsai C. L., Chang W. H. y Liu T. K. Preliminary studies of duration and intensity of ultrasonic treatments on fracture repair. Chin J Physiol 1992; 35 (2): 168.

Tsai Ch. L., Chang W. H. y Liu T. K. Ultrasound can affect bone healing both locally and systemically. Chin J Physiol 1991; 34: 213-222.

Tsunawaki S., Sporn M. y Ding A. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. Nature 1988; 334: 260-262.

Turner C. H. y Burr D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. Bone 1993; 14: 595-608.

Urist M. R. Bone: formation by autoinduction. Science 1965; 150: 893-899.

Van den Berg W. B., Van der Kraan P. M. y Scharstuhl A. M. Sc. Growth Factors and Cartilage Repair. Clinical Orthopaedics & Related Research 2001; 391: S244-S250.

Wahl S. M., Hunt D. A., Wakefield L. M., McCartney-Francis N., Wahl L. M., Roberts A. B. y Sporn M. B. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(16): 5788-5792.

Wallace A. I., Draper E. R. y Strachan R. K. The vascular response to fracture micromovement. Clin Orthop 1994; 301: 281-290

Wang E. A., Rosen V. y D'Alessandro J. S. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. Proc Nat Acad Sci 1990; 87: 2220-2224.

Wang L., Zhang Z., Zhang R., Hafner M. S., Wong H. K., Jiao Z. y Chopp M. Erythropoietin up-regulates SOCS2 in neuronal progenitor cells derived from SVZ of adult rat. Neuroreport. 2004 15(8): 1225-9.

Wang S. J., Lewallen D. G., Bolander M. E., Chao E. Y., Ilstrup D. M. y Greenleaf J. F. Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. J Orthop Res 1994; 12 (1): 40-47.

Wang X. J., Dong Z., Zhong X. H., Shi R. Z., Huang S. H., Lou Y. y Li Q. P. Transforming growth factor-beta1 enhanced vascular endothelial growth factor

synthesis in mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun 2008; 18; 365 (3): 548-554.

Wang Y., Nishida S., Elalieh H. Z., Long R. K., Halloran B. P. y Bikle D. D. Role of IGF-I signaling in regulating osteoclastogenesis. J. Bone Miner. Res. 2006; 21(9): 1350-1358.

Warden S. J., Favarolo J. M., Bennell K. L., McMeeken J. M., Ng K. W., Zajac J. D. y Wark J. D. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates a bone-forming response in UMR-106 cells. Biochem Biophys Res Commun 2001; 286 (3): 443-450.

Watson T. The role of electrotherapy in contemporary physiotherapy practise. Man Ther 2000; 5 (3): 132-141.

Watts R.W. y Besson A. . Thoracic Surgery: Surgical Management of Chest Injuries. St.Louis Delarue NC, Eschapase H, Editors. International Trends in General Thoracic Surgery. Mosby Year Book, 1991; p. 65-76.

Webster D. F., Harvey W., Dyson M. y Pond J. B. The role of ultrasound-induced cavitation in the *in vitro* stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts. Ultrasonics 1980; 18 (1): 33-37.

Webster D., Pond J., Dyson M. y Harvey W. The role of cavitation in the in vitro stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by ultrasound. Ultrasound Med Biol 1978; 4 (4): 343-351.

Weksler B., Ng B., Lenert J. y Burt M. A simplified method for endotracheal intubation in the rat. J Appl Physiol 1994; 76 (4): 1823-1825.

Wells PNT. Nyborg WL Ziskin MC (eds.). Biological effects of ultrasound. Surgical applications of ultrasound. New York, USA: Churchill Livingstone, 1985; p. 157-167.

Wendeberg B. Mineral metabolism of fractures of the tibia in man studied with external counitng of Sr85. Acta Orthop Scand 1961; Suppl. 52: 1-79.

Wimsatt J., Dressen P., Dennison C. y Turner A. S. Ultrasound therapy for the prevention and correction of contractures and bone mineral loss associated with wing bandaging in the domestic pigeon (*Columba livia*). J Zoo Wildl Med 2000; 31 (2): 190-195.

Wisner D. H. A stepwise logistic regression analysis of factors affecting morbidity and mortality after thoracic trauma: Effect of epidural analgesia. J Trauma 1990; 30: 799-804.

Wisner D. H. Sabiston Jr DC & Spencer FC Editors. Surgery of the Chest. 6th edition. WB Saunders Co. Trauma to the Chest. Philadelphia: 1995; p. 456-493.

Wozney J. M., Rosen V. y Celeste A. J. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science 1988; 242: 1528-1534.

Wu C. L. , Jani N. D. y Perkins F. M. Thoracic epidural analgesia versus IV patient-controlled analgesia for the treatment of rib fracture pain after motor vehicle crash. J Trauma 1999; 47: 564-567.

Wu J., Shyr H. S. y Chao E. Y Comparison of osteotomy healing under external fixation devices with different stiffness characteristics. J Bone Joint Surg (Am) 1984; 66-A: 1258-1264.

Xabier C. A. M. y Duarte L. R. Estimilaca ultrasonica de calo osseo: applicaca clinica. Rev Brasileira Ortop 1983; 18: 73-80.

Yanagihara K. y Tsumuraya M. Transforming growth factor beta 1 induces apoptotic cell death in cultured human gastric carcinoma cells. Cancer Res 1992; 52: 4042.

Yang K. H., Parvizi J. y Wang S. J. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. J Orthop Res 1996; 14: 802-809.

Yoshimura A., Naka T. y Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. Nat Rev Immunol 2007; 7 (6): 454-465.

Young S. R. y Dayson M. The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. Ultrasound Med Biol 1990; 16: 261-269.

Young S. y Dyson M. Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. Ultrasound Med Biol 1990; 16: 809-816.

Zapf J. y Froesch E. R. Insulin-like growth factor I actions on somatic growth. American Physiological Society 1999; Vol. V, Section 7: 663–699.

Zhai G., Rivadeneira F., Houwing-Duisterma J., Meulenbelt I., Bijkerk C., Hofman A., van Meurs J. B. J., Uitterlinden A., Pols H., Slagboom P. y Van Duijn C. M. Insulin-like growth factor I gene promoter polymorphims, collegen type II-1 (COL2A1) gene, and the prevalence of radiographic osteoarthritis: the Rotterdam study. Ann Rheum Dis 2004 63 (5): 544–548.

Ziegler D. W. y Agarwal N. N. The morbidity and mortality of rib fractures. J Trauma 1994; 37: 975-979.

Zimmermann G., Henle P., Küsswetter M., Moghaddam A., Wentzensen A., Richter W. y Weiss S. TGF-beta 1 as a marker of delayed fracture healing. Bone 2005; 36: 779-785

Ziskin M. C. Rapacholi MH Grandolfo M, Rindi A, editors. Ultrasound: medical applications, biological effects and hazard potential. Applications of ultrasound in medicine-comparison with other modalities. New York: Plenum Press, 1987; p. 49-59.

Zuñiga J. M., Tur Marí J. A., Milocco S. N. y Piñeiro R. Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, SAU, 2001; p. 83-109.