



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado**

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL



Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) de Traumatología, Ortopedia y
Rehabilitación “Dr. Victorio de la Fuente Narváez”.

Título:

**“CARACTERIZACIÓN CLÍNICOPATOLÓGICA DE LA SEUDOARTROSIS DE
HUESOS LARGOS”**

Tesis para optar por el grado de especialista en:

ORTOPEDIA

Presenta:

Dr. Avelino Colín Vázquez

Tutor:

Dr. Adrián Miguel Pérez

Investigador responsable:

Dra. Elizabeth Pérez Hernández

Investigadores Asociados:

Dr. Luis Dario Bernal Fortich

Dra. Adriana Atencio Chan

Registro CLIEIS: R-2017-3401-8

Lugar y fecha de publicación: Ciudad de México, 2017

Fecha de egreso: Febrero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIONES

DRA. FRYDA MEDINA RODRÍGUEZ
DIRECTORA GENERAL UMAE

DR. RUBÉN TORRES GONZÁLEZ
DIRECTOR DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD UMAE

DRA. ELIZABETH PÉREZ HERNÁNDEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN EN SALUD UMAE

DR. JORGE QUIROZ WILLIAMS
ENCARGADO DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD UMAE

DR. MANUEL IGNACIO BARRERA GARCÍA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD HOVFN

DR. RUBÉN ALONSO AMAYA ZEPEDA
COORDINADOR CLÍNICO DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD HOVFN
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN ORTOPEDIA

DR. ADRIÁN MIGUEL PÉREZ
TUTOR



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado**



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) de Traumatología,
Ortopedia y Rehabilitación “Dr. Victorio de la Fuente Narváez”.**

**Título:
CARACTERIZACIÓN CLÍNICOPATOLÓGICA DE LA
SEUDOARTROSIS DE HUESOS LARGOS**

I. Identificación de los investigadores

Investigador Responsable:

Dra. Elizabeth Pérez Hernández (a)

Tutor:

Dr. Adrián Miguel Pérez (b)

Tesis de alumno especialidad en ortopedia:

Dr. Avelino Colín Vázquez (c)

Investigadores Asociados:

Dr. Luis Dario Bernal Fortich (d)

Dra. Adriana Atencio Chan (e)

Datos de contacto:

- a) Dra. Elizabeth Pérez Hernández. Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Patología Experimental, MédicoEspecialista en Anatomía Patológica, Jefe de División de Educación en Salud de la UMAE Traumatología,Ortopedia y Rehabilitación “Dr. Victorio de la Fuente Narváez” Ciudad de México. IMSS, México, Colector 15s/n (Av. Fortuna) Esq. Av. Politécnico nacional. Col. Magdalena de las Salinas, Delegación Gustavo A. Madero.C.P. 07760. Teléfono: 57473500 ext. 25537. Correo electrónico: perezheliza@gmail.com; elizabeth.perezh@imss.gob.mx

- b) Dr. Adrián Miguel Pérez. UMAE Traumatología, Ortopedia y Rehabilitación “Dr. Victorio de la Fuente Narváez, Ciudad de México, Hospital de Ortopedia 2do piso Servicio de Rescates Osteoarticulares, IMSS, México. Colector 15 s/n (Av. Fortuna) Esq. Av. Instituto Politécnico Nacional. Col. Magdalena de las Salinas, Delegación Gustavo A. Madero. C.P. 07760. Tel: 5747 3500 ext. 25404.Correo electrónico: adrian.miguel@imss.gob.mx

- c) Dr. Avelino Colín Vázquez. Médico Residente de la Especialidad de Ortopedia, sede UMAE Traumatología, Ortopedia y Rehabilitación “Dr. Victorio de la Fuente Narváez” Ciudad de México. IMSS, México, Colector 15 s/n (Av. Fortuna) Esq. Av. Politécnico Nacional. Col. Magdalena de las Salinas, Delegación Gustavo A. Madero. C.P. 07760, Teléfono: 57473500 ext. 25537.Correo electrónico: dravelinocolin@gmail.com.

- d) Dr. Luis Dario Bernal Fortich, Médico Residente de la Especialidad de Ortopedia, sede UMAE Traumatología Ortopedia y Rehabilitación “Dr. Victorio de la Fuente Narváez”, Ciudad de México. IMSS, México, Colector 15, s/n (Av. Fortuna) Esq. Av. Politécnico Nacional. Col. Magdalena de las Salinas, Delegación Gustavo A. Madero C.P. 07760, Teléfono: 57473500 ext. 25537.Correo electrónico: luisbernal@gmail.com

- e) Dra. Adriana Atencio Chan, Médico Anatomopatólogo, adscrito al Departamento de Anatomía Patológica, UMAE TOR “Dr. Victorio de la Fuente Narváez” IMSS, CDMX, Colector 15 s/n (Av. Fortuna) Esq. Av. IPN Col. Magdalena de las Salinas, Delegación Gustavo A. Madero. C.P. 07760. Tel: 5747 3500 Ext. 25315. Correo electrónico: adrianaatencio@aol.com

ÍNDICE

- I. RESUMEN**
- II. ANTECEDENTES**
- III. JUSTIFICACIÓN**
- IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**
- V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**
- VI. OBJETIVOS**
 - a. GENERAL**
 - b. ESPECIFICO**
- VII. HIPÓTESIS**
 - a. GENERAL**
 - b. NULA**
- VIII. MATERIAL Y MÉTODOS**
 - a. DISEÑO**
 - b. SITIO**
 - c. PERIODO**
 - d. MATERIAL**
 - e. CRITERIOS DE SELECCIÓN**
 - f. TÉCNICA DE MUESTREO**
 - g. CALCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA**
- IX. METODOLOGÍA**
- X. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES**
- XI. ASPECTOS ÉTICOS**
- XII. RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD**
- XIII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**
- XIV. RESULTADOS**
- XV. DISCUSIÓN**
- XVI. CONCLUSIONES**
- XVII. BIBLIOGRAFÍA**

I. Resumen

Título: Caracterización Clínicopatológica de la Seudoartrosis de Huesos Largos

Antecedentes: Se define pseudoartrosis al estado en el que los procesos normales de cicatrización biológica ósea cesan y no permite una adecuada consolidación. Para propósitos de la investigación se define pseudoartrosis como una fractura que tiene al menos 9 meses de evolución y no ha mostrado signos de consolidación ósea

Objetivo general: Identificar los posibles patrones morfológicos del tejido óseo en estado de pseudoartrosis y su relación con el subtipo de la misma

Material y Métodos: Se realizó un análisis clínico e histopatológico del tejido óseo obtenido de 34 pacientes con diagnóstico de pseudoartrosis sometidos a una cirugía de revisión. Las variables de estudio incluyeron datos demográficos y clínicos, como tipo de pseudoartrosis, tiempo de evolución, análisis bacteriológico, etc. El análisis histopatológico de las muestras incluyó la evaluación cualitativa y semicuantitativa a partir de la visualización microscópica.

Resultados. La edad media de los pacientes con pseudoartrosis fue de 40 años (rango de 23 a 57 años), con predominio en varones (relación de 2.4:1). El tiempo de evolución de la pseudoartrosis al momento del diagnóstico y el manejo quirúrgico osciló entre los 9 y 36 meses (media de 17 meses). Veinte seis pacientes presentaron pseudoartrosis aséptica (76.5%) y 8 pseudoartrosis séptica (23.5%). Los segmentos óseos mayormente afectados fueron tibia y fémur (32.3% c/u), húmero (20.5%), antebrazo, radio y/o cúbito (11.7%) y clavícula (3.2%). *Staphylococcus aureus* (75%) y *Escherichia coli* (25%) fueron los agentes infecciosos prevalentes. El 70.6% de los casos correspondieron a pseudoartrosis oligotrófica, 17.6% a pseudoartrosis atrófica y 11.8% a pseudoartrosis hipertrófica. El 32.4% se clasificaron como Paley A y el 67.6% como Paley B.

Histológicamente la heterogeneidad morfológica mostró tejido fibroconjuntivo con variabilidad en la densidad celular, mayor en la pseudoartrosis hipertrófica, al igual

que el cartílago fibroso. Neo formación ósea a partir de osificación endocondral (atrófica y oligotrófica) y/o intramembranosa (hipertrófica) y desvitalización ósea (prevalente en la forma atrófica). La neo formación vascular mostró variaciones mínimas en los diferentes tipos de pseudoartrosis. Otro cambio asociado a la forma hipertrófica fue la sinovialización o pseudoartrosis sinovial.

Conclusiones: mostramos un espectro morfológico amplio, heterogéneo, que correlacionó proporcionalmente con la formación del callo óseo escaso a exuberante, sin embargo, no se identificaron patrones histológicos característicos de un subtipo específico. Lo que conlleva a dificultad para la integración de escalas o patrones morfológicos asociados.

II. Marco Teórico

Se define como pseudoartrosis al estado en el que los procesos normales de cicatrización biológica ósea cesan y no permite una adecuada consolidación. Para los propósitos de las investigaciones clínicas, los EU y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) definen la pseudoartrosis como una fractura que tiene al menos 9 meses de evolución y no ha mostrado signos de consolidación ósea (1).

La tasa de incidencia de pseudoartrosis oscila entre el 5%-10% de las fracturas (2). En general, aproximadamente el 53% de las pseudoartrosis ocurren en los miembros inferiores, siendo la tibia la más afectada; además, la tibia es el hueso que más fracturas reporta y debido a su anatomía (ausencia de músculos en su cara anterior e interna) presenta factores de riesgo en la consolidación ósea. La gran mayoría de los autores refieren que la tibia ocupa el primer lugar en frecuencia de pseudoartrosis, seguido del fémur (3,4). Posteriormente, se ubican el húmero en el 0.5%, los huesos del antebrazo en el 0,4% y la clavícula (5).

Los factores predisponentes más significativos en la pseudoartrosis son los traumatismos de alta energía, fracturas expuestas con daño importante de tejidos blandos, conminución, pérdida ósea o perióstica, infección o estabilidad insuficiente (6).

Se han descrito algunos otros factores asociados a la pseudoartrosis, tales como obesidad, diabetes, alcoholismo, enfermedades vasculares periféricas, trastornos psíquicos, esclerodermia, inmovilización inapropiada, distracción excesiva de la fractura en la fijación externa, y tejidos blandos interpuestos sobre la fractura (7).

La infección en la zona de fractura aumenta el riesgo de pseudoartrosis. La infección del hueso o de los tejidos blandos circundantes puede crear el mismo ambiente local que predispone a las fracturas no infectadas para no unirse. La infección puede producir inestabilidad en el sitio de la fractura a medida que los implantes se aflojan. El hueso avascular necrótico en el sitio de la fractura (secuestro), común con la infección, disminuye la posibilidad de unión ósea. La infección también produce

osteólisis en el sitio de la fractura, lo cual resulta en el crecimiento de tejido de granulación infectado (9).

El tratamiento de la pseudoartrosis está fuertemente relacionado con el tipo de pseudoartrosis (infectado versus no infectado, atrófico versus hipertrófico) (11). El tratamiento con clavado intramedular es usualmente preferido para una pseudoartrosis no infectada de huesos largos. Por otra parte, la fijación externa está indicada en pacientes con una pseudoartrosis infectada, aun cuando se trate de huesos largos. También se ha sido investigado en pacientes con pseudoartrosis cerrada, el manejo con placas de compresión (12, 13). En casos de pseudoartrosis hipertróficas, se han logrado tasas altas de éxito sólo con placas de compresión, mientras que en las pseudoartrosis atróficas la implementación de un injerto óseo suplementario parece ser necesario para el tratamiento. Finalmente, la técnica de Ilizarov ha sido utilizada para el manejo de pseudoartrosis anguladas y fallas en la unión ósea asociadas con mal alineamiento (12).

El tratamiento quirúrgico de la pseudoartrosis es eficaz con una tasa de éxito que varía de 75 a 100% (12-14). Sin embargo, en un número relativamente elevado de casos los tratamientos combinados son necesarios para la curación de la fractura. El estándar de oro actual para estimular la regeneración ósea está representado por la cirugía de revisión con aplicación de injertos óseos autólogos, usualmente a partir de cresta, con o sin sustitución de la fijación de la fractura (9). Sin embargo, se han descrito varios enfoques para promover y mejorar la regeneración del tejido óseo, tales como terapia de ondas de choque extracorporales (ESWT), ultrasonido, proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y plasma rico en plaquetas (PRP) (9).

Proceso de reparación celular en el tejido óseo

En un intento por comprender mejor los procesos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de la pseudoartrosis, varios estudios se han enfocado en el perfil biológico del tejido obtenido del sitio de no unión y se han encargado de analizar las diferencias o similitudes de tejido obtenido de diferentes tipos de pseudoartrosis. Cuando existe una solución de continuidad ósea (fractura); el patrón de curación primario (directo) ocurre cuando se logra una reducción anatómica, junto con una estabilidad casi absoluta (16, 17). La interrupción de la continuidad del hueso en este

tipo de curación se restablece con la regeneración del sistema Havers y del hueso lamelar, por lo que no es necesario ningún remodelado. Por el contrario, el patrón de cicatrización secundario (indirecto) que ocurre en la gran mayoría de los casos clínicos depende de la formación de callos fibrocartilagosos (16).

Este proceso puede ser ampliamente dividido en cinco etapas: la inflamación, formación de tejido de granulación, formación de callos blandos (cartílago hialino), formación de callos duros (hueso tejido) y remodelación (17,18). Después de una lesión la arquitectura ósea se interrumpe, al igual que la continuidad del tejido blando circundante. En consecuencia, los vasos sanguíneos locales se rompen, se forma un hematoma y se activa la cascada de la coagulación (19). Este hematoma de fractura contiene células que se originan de la sangre periférica e intramedular, así como de la médula ósea (20). Incluyen células inmunes inflamatorias, neutrófilos, monocitos y macrófagos que se activan mediante el proceso de coagulación; fibroblastos; y las células madre mesenquimales (MSCs) (19). Las prostaglandinas, citoquinas y otras proteínas son abundantes en este ambiente y contribuyen a la formación de un complejo microambiente que tiene un efecto diferente sobre cada población de células (21). Se sabe que estos mediadores aumentan la migración celular, proliferación, potencian la osteogénesis, la síntesis de colágeno y la angiogénesis (21).

Posteriormente, la formación ósea se produce entonces por osificación endocondral o intramembranosa. Inicialmente, se forma hueso tejido inmaduro caracterizado por fibras de colágeno gruesas dispuestas de manera casual, pero luego se transforma en hueso laminar maduro (remodelado) en un proceso lento (22, 23). Durante la remodelación que podría durar varios meses a años después de la fractura, la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos es intensa, con resorción ósea seguida por la producción aposicional de hueso nuevo por los osteoblastos (23).

El proceso biológico exacto que conduce a una falta de unión sigue siendo oscuro y es bien aceptado que cualquier intervención planificada para revertir este proceso debe ser oportuna y bien dirigida para restablecer tanto las deficiencias biológicas como mecánicas.

Estructura macroscópica y microscópica

Existe evidencia que en la pseudoartrosis hay interposición entre los segmentos óseos de tejido blando de aspecto blanquecino, así como degeneración fibrinoide que sufre el tejido conectivo en el interior del callo (24). Con respecto a la pseudoartrosis sinovial, se encontró un material interpuesto parecido sin embargo, este de coloración amarilla, con líquido seroso claro llenando este espacio en los casos asépticos. Mientras que en los casos sépticos había líquido turbio (25).

En un estudio histológico sobre el tejido de la no unión se encontró que los vasos tisulares aparecen a menudo ocluidos por material trombótico; los fibroblastos y condrocitos encontrados en el tejido de no unión parecían normales, con un buen aparato de secreción; las membranas celulares fueron capaces de producir vesículas de matriz; los cristales de hidroxapatita se podían observar en la matriz celular o en las vesículas de la misma. Se puede concluir que las células que pueblan el tejido de no unión están bien equipadas para inducir la mineralización de la matriz, pero la ausencia de un suministro de sangre suficiente para traerles una cantidad normal de calcio, es la verdadera razón de la no unión (26).

Con respecto a la pseudoartrosis atrófica se observó en gran parte tejido fibrocartilaginoso que contenía ocasionalmente islas óseas. En algunas áreas, el tejido excéntrico no unido estaba bien poblado por células fibroblásticas, pero otras áreas eran en gran parte acelulares y consistían principalmente en una matriz extracelular colágena. Las áreas de vascularización se observaron de forma consistente y la presencia de osteoclastos dentro de los pozos de absorción también fue ocasionalmente notable. Después del tratamiento enzimático para extraer las células y su deposición en cultivo monocapa, la mayoría de las células adherentes presentes eran de aspecto estromal, y fibroblásticas. También se observaron osteoclastos multinucleados ocasionales, al igual que las células con un proceso estrellado (múltiples procesos citoplasmáticos) (27).

En relación a la pseudoartrosis hipertrófica se observó principalmente tejido fibroso que contenía diversas cantidades de células similares a fibroblastos, los gránulos de células presentaban una apariencia esférica y transparente (28). Los especímenes

contenían tejido fibroso, fibrocartilago, cartilago hialino e islotes óseos, áreas de formación de hueso nuevo por osificación endocondral e intramembranosa y se observaron bien vascularizados (29).

Los principales tipos de tejidos involucrados incluyen tejido fibroso, cartilaginoso y conectivo en grado variable (30). En la pseudoartrosis atrófica, las islas óseas no siempre estaban presentes, mientras que el hueso necrótico era más prevalente. En general, la densidad celular de la pseudoartrosis atrófica fue menor en comparación con la pseudoartrosis hipertrófica, mientras que algunas áreas fueron completamente acelulares (26, 29, 31). Esto sugiere un fondo celular diferente, que puede corresponder a la mayor tasa de fracaso después de la cirugía de revisión de pseudoartrosis atrófica (26, 32).

III. Justificación y

IV. Planteamiento del problema

El aumento en la tasa de prevalencia en nuestro país de pseudoartrosis conlleva altos costos económicos para el sistema de salud lo cual afecta irremediamente la calidad de vida del paciente. En el servicio de Rescate Osteoarticular del Hospital de Ortopedia “Dr. Victorio de la Fuente Narváez” en el año 2016 se realizaron 1,234 cirugías, de las cuales 256 fueron por pseudoartrosis (20.74%). Así mismo del total de las pseudoartrosis que se presentaron, 141 (55%) fueron asépticas, y 115 (45%) sépticas. Por la misma razón, se observó que existe un alto índice de infección hospitalaria anual, entre los microorganismos más frecuentemente aislados en cultivos de material periprotésico se reportan *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. coagulasa negativo* y *E. coli*. Sin embargo, las descripciones morfológicas de la pseudoartrosis en la literatura no son recientes, se desconoce claramente cuál es su asociación con los tipos de pseudoartrosis y no se dispone de una clasificación clínico patológica validada hasta el momento.

V. *Pregunta de Investigación*

¿Cuáles son los cambios morfológicos del tejido óseo en estado de pseudoartrosis, y éstos se asocian al subtipo de pseudoartrosis?

VI. *Objetivos*

a) OBJETIVO GENERAL

Identificar los posibles patrones morfológicos del tejido óseo en estado de pseudoartrosis y su relación con el subtipo de pseudoartrosis.

b) OBJETIVO ESPECIFICO

Identificar las características histopatológicas y posibles patrones morfológicos del tejido óseo en estado de pseudoartrosis en ausencia y presencia de infección.

Determinar si estos cambios morfológicos se relacionan con el subtipo de pseudoartrosis de acuerdo a las características clínico radiográficas.

VII. *Hipótesis*

a) El tejido óseo en estado de pseudoartrosis presenta cambios morfológicos asociados al tipo de pseudoartrosis.

b) El tejido óseo en estado de pseudoartrosis presenta cambios morfológicos inespecíficos, no asociados al tipo de pseudoartrosis.

VIII. Material y Métodos

a) Tipo de estudio:

- Estudio observacional, prospectivo, transversal.

b) Sitio:

- En un centro de referencia de tercer nivel, UMAE “Dr. Victorio de la Fuente Narváez”, servicio de Rescate Osteoarticular del Hospital de Ortopedia del IMSS, localizado en la ciudad de México, calle Colector 15 s/n (Av. Fortuna) Esq. Av. Politécnico nacional. Col. Magdalena de las Salinas, Delegación Gustavo A. Madero. C.P. 07760.

c) Período:

- El presente estudio se realizó de Diciembre de 2016 a Julio de 2017.

d) Material de estudio :

- Información clínica de pacientes con pseudoartrosis.
- Tejido óseo y blando de pacientes sometidos a cirugía de revisión de foco de pseudoartrosis.
- Reporte histopatológico.

e) Criterios de selección

Criterios de Inclusión

- Registro de derechohabientes del IMSS con diagnóstico clínico radiológico de pseudoartrosis.

- Tejido óseo de pacientes sometidos a cirugía de revisión de foco de pseudoartrosis.
- Sin predominio de sexo y edad
- Muestras con adecuada técnica de fijación y procesamiento

Criterios de exclusión

- Tejido óseo de pacientes con enfermedades sistémicas concomitantes que modifican la morfología ósea (inmunológicas, enfermedades del tejido conectivo, congénitas, etc).

Criterios de eliminación

- Muestras de tejido óseo sin fijación en formalina al 10%
- Material óseo insuficiente para evaluación.

f) *Técnica de Muestreo*

- No probabilístico, por conveniencia, de casos consecutivos

g) *Calculo del tamaño de muestra*

- De acuerdo a la fórmula de estimación de proporciones, utilizando un nivel de
- confianza de 95% (1.96) y una proporción de 50%, se obtiene lo siguiente
 - ▪ Total de población (N): 15 pacientes
 - ▪ Nivel de confianza o seguridad (k): 95%
 - ▪ Precisión (e): 5%
 - ▪ Proporción (p): 50%
 - ▪ Probabilidad de fracaso (q): 0.97
 - ▪ Tamaño muestral (n): 15 pacientes
 - ▪ Proporción esperada de pérdidas 10%
 - ▪ Muestra ajustada a las pérdidas (n): 10 pacientes por grupo.

IX. Metodología

- El tejido óseo patológico (en estado de pseudoartrosis) fue obtenido de pacientes diagnosticados y atendidos en el Servicio de Rescate Osteoarticular sometidos a cirugía de revisión. Las condiciones de pseudoartrosis aséptica y séptica se determinó por clínica y laboratorio mediante cultivo-biopsia transquirúrgico. Se lograron recabar un total de 34 muestras de tejido óseo en dichas condiciones.
- El tejido óseo se obtuvo durante el procedimiento quirúrgico de revisión de foco de pseudoartrosis, en dicho procedimiento se regularizaron los fragmentos óseos más proximales al foco de pseudoartrosis, resecaando el tejido óseo con cincel. Para evitar alteraciones en la morfología del tejido por efecto de la toma de la muestra, se evitó el uso de sierra neumática.
- Los fragmentos óseos que se obtuvieron fueron fijados en formalina al 10%. Posteriormente se descalcificaron con ácido nítrico al 7% y neutralizados. Posteriormente fueron lavados y sometidos a deshidratación mediante soluciones de alcohol de concentración creciente. Subsecuentemente se aclararon sustituyendo el alcohol por un disolvente de parafina, el xilol (xileno). Durante la infiltración la muestra se colocó en parafina líquida con el fin de que el xilol del tejido por ósmosis saliera y se impregnara con parafina. Posteriormente se formaron bloques de parafina y se realizaron secciones de $3\ \mu\text{m}$. Los cortes se colocaron en un portaobjetos y se procedió a realizar la tinción convencional de hematoxilina y eosina. Posteriormente se cubrieron con resina epóxica para su visualización mediante microscópica óptica convencional.
- Recolección de datos durante en los meses de Diciembre 2016- Julio 2017
- Posterior a tener completa la recolección de datos, se llevó a cabo el vaciamiento de los mismos en una base de datos hoja de cálculo Excel y para el análisis de las variables se utilizó el programa SPSS® versión 22. Se realizó el análisis descriptivo y semicuantitativo de las variables según el

caso, posteriormente se realizó un análisis comparativo entre dos variables para determinar diferencias estadísticas significativas.

- Obtenidos los resultados y análisis de las variables se procedió a la formulación de conclusiones y discusión de los mismos, así como la redacción del manuscrito y la redacción de tesis para la obtención del diploma de especialización.

X. Descripción de variables

DEMOGRÁFICAS

- **Edad.**
 - Definición conceptual. Tiempo que ha vivido una persona o ciertos animales o vegetales.
 - Definición operacional. Edad registrada en el expediente clínico y base de datos obtenidos en los servicios de Rescate osteoarticular, en la UMAE “Dr. Victorio de la Fuente Narváez”.
 - Tipo de Variable. Cuantitativa, continúa.
 - Categoría: edad en años, valor exacto.
 - Técnica de medición. Se registró la edad en años reportada en las bases de datos antes mencionadas de los pacientes de este estudio.
- **Sexo.**
 - Definición conceptual. Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales y las plantas
 - Definición operacional. Sexo registrado en el expediente clínico y base de datos obtenidos en los servicios de rescate osteoarticular, en la UMAE “Dr. Victorio de la Fuente Narváez”.
 - Tipo de Variable. Cualitativa nominal, dicotómica.
 - Categoría: 1. Femenino, 2. Masculino.

- Técnica de medición. Se registró el sexo de acuerdo a femenino o masculino reportado en las bases de datos antes mencionadas de los pacientes de este estudio.

Características histológicas

- Definición conceptual. Representa la colección de características celulares de un tejido, órgano o de un organismo, los cuales son los productos de una entidad patológica.
- Definición operacional: Cualitativa y semicuantitativa
- Escala: Cuantitativa Discreta.
- Categoría: Presencia o ausencia de las características histológicas (expresadas en cruces)
- Medición: Abundancia relativa o ausencia expresada en cruces

Respuesta en la formación de callo óseo (atrófica vs oligotrófica vs hipertrófica)

- Definición conceptual. Consolidación secundaria del hueso en la curación de una fractura con la formación de callo óseo
- Definición operacional: Interpretación clínica transquirúrgica y radiográfica de la pseudoartrosis; con formación abundante o nula formación de callo óseo
- Escala: Cualitativa
- Categoría: Presencia o ausencia de las características clínicas
- Medición: Sin consolidación pero con abundante formación de callo óseo (hipertrófica) Sin consolidación y sin formación de callo óseo (atrófica) y sin consolidación y con mínima formación de callo óseo (oligotrófica).

Microorganismo Aislado

- Definición conceptual. Organismo unicelular de tamaño microscópico, separado de otros.

- Definición operacional: Ser vivo que sólo puede visualizarse con el microscopio.
- Escala: Cualitativa nominal
- Medición: Especie de microorganismo aislado en el cultivo

Tiempo de la ausencia en la consolidación

- Definición conceptual. Unidad de tiempo que ha transcurrido desde el momento de la fractura
- Definición operacional: A partir de 9 meses posteriores a la fractura, sin evidencia de curación de la misma, se considerara pseudoartrosis
- Escala: Cuantitativa
- Medición: Tiempo expresado en meses

Severidad de la pseudoartrosis conforme a la pérdida ósea (basado en la clasificación de Paley)

- Definición conceptual. Grado de severidad de la enfermedad acorde a la pérdida ósea, siendo Paley A pérdida ósea menor de 1 cm, y Paley B, pérdida ósea mayor de 1 cm.
- Definición operacional: Paley A; menor grado de severidad de la enfermedad, Paley B; mayor grado de severidad de la pseudoartrosis.
- Escala: Cualitativa/cuantitativa
- Medición: clasificación obtenida durante el procedimiento y referida en la nota postquirúrgica

Tipo de fijación primaria (material de osteosíntesis utilizado)

- Definición conceptual. Tipo de material de osteosíntesis utilizado al momento de la fractura para promover la consolidación de la misma
- Definición operacional: Osteosíntesis con placas, osteosíntesis con clavo centromedular, osteosíntesis mixta; donde se utilizaron más de 1 método de fijación (placa y fijador externo o clavo y fijador externo) y conservador,

paciente en los que no se realizó tratamiento quirúrgico al momento de la fractura y fueron tratados mediante molde de yeso.

- Escala: cualitativa
- Medición: placa, claco centromedular, osteosíntesis mixta, tratamiento conservador.

XI. Aspectos éticos

La investigación se realizó en base al reglamento de la Ley General de Salud en relación en materia de investigación para la salud, que se encuentra en vigencia actualmente en nuestro país:

- Título primero: de disposiciones generales en su artículo 3º apartado II
- Título segundo: de los aspectos éticos de la investigación en Seres humanos capítulo 1 de disposiciones comunes, en el artículo 23.
- Título tercero: de la investigación de nuevos recursos profilácticos, de diagnósticos, terapéuticos y de rehabilitación capítulo III de la investigación de otros nuevos recursos en su artículo 73.
- Título sexto. De la ejecución de la investigación en las instituciones de atención a la salud capítulo único, contenido en los artículos 113 al 120.

Igualmente nos apegamos a los códigos internacionales de ética: declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (18ª Asamblea Venecia Mundial Helsinki, Finlandia, Junio 1964. Y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, Octubre 1975; 35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, Octubre de 1983; 41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong China, Septiembre 1989; 48ª Asamblea general Somerset West Sudáfrica Octubre 1996; 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia Octubre 2000; nota de clarificación del párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM , Washington USA, 2002; Nota de clarificación del Párrafo 30, agregada por la asamblea general de la AMM , Tokio, Japón 2004 ; 59ª Asamblea general de la AMM, Seúl, Corea Octubre 2008); y su actualización en 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013.

Así como a la aceptación por el Comité de Ética Local del Hospital de Traumatología de la UMAE “Dr. Victorio de la Fuente Narváez” cumpliendo con los principios básicos de la bioética: beneficencia, no maleficencia, justicia, autodeterminación o autonomía, y las normas de investigación del IMSS, siendo los resultados obtenidos estrictamente confidenciales y su uso será únicamente académico.

De acuerdo a la naturaleza y requerimiento del estudio, se solicitó el consentimiento informado correspondiente (anexo 2), con la libertad de elección de participación, sin repercusión alguna sobre el protocolo de estudio y manejo médico-quirúrgico habitual.

XII. Recursos, Factibilidad e infraestructura.

– Recursos Humanos

Se contó con la colaboración de los médicos ortopedistas adscritos y residentes del servicio de Rescate Osteoarticular, los cuales apoyaron durante el procedimiento quirúrgico de revisión de foco de pseudoartrosis, en la toma del tejido óseo correspondiente así como el cultivo/biopsia, previa capacitación del personal.

El médico residente responsable del proyecto fue el encargado de verificar la disponibilidad del fijador previo a los procedimientos quirúrgicos programados y traslado las muestras obtenidas correspondientes a los servicios de laboratorio clínico y anatomía patológica para su procesamiento.

Se contó con el apoyo de los servicios de laboratorio clínico y anatomía patológica para el procesamiento de las muestras, así como de médicos patólogos clínicos y anatomopatólogos para la interpretación de los resultados de las mismas

Una vez obtenidos los resultados, el médico residente responsable del proyecto elaboró la base de datos, de acuerdo a las variables de estudio señaladas anteriormente.

Al término de la captura de la información y el análisis estadístico correspondiente, el grupo de investigación responsable del proyecto analizó la misma y determinó las conclusiones.

– **Recursos materiales**

Equipamiento en el laboratorio de anatomía patológica.

Equipamiento para análisis microbiológico a cargo del laboratorio clínico: equipo

Vitek, tarjetas, medio de transporte, medios de cultivo.

– **Factibilidad**

Factible.

XIII. Cronograma de actividades

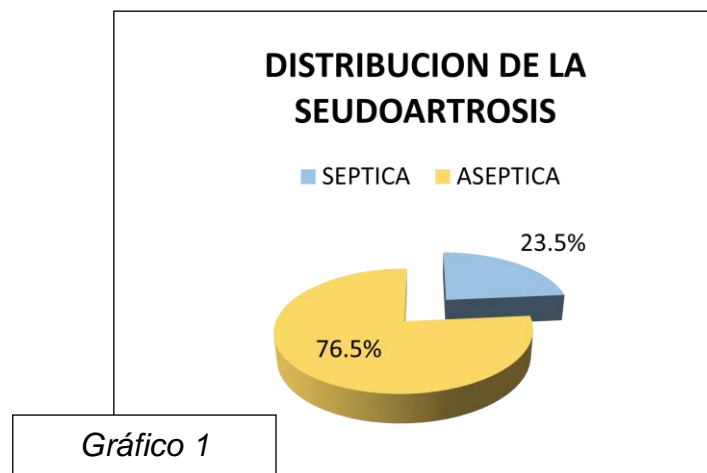
Actividad	Descripción	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL
A	FASE DE PLANEACIÓN							
1	Búsqueda bibliográfica	X						
2	Redacción del proyecto		X					
3	Revisión del proyecto			X				
4	Presentación en seminario de investigación			X				
5	Registro CLIEIS				X	X		
B	FASE DE EJECUCIÓN							
1	Recolección de muestras, procesamiento y análisis					X	X	X
2	Interpretación de resultados y redacción e informe final							X

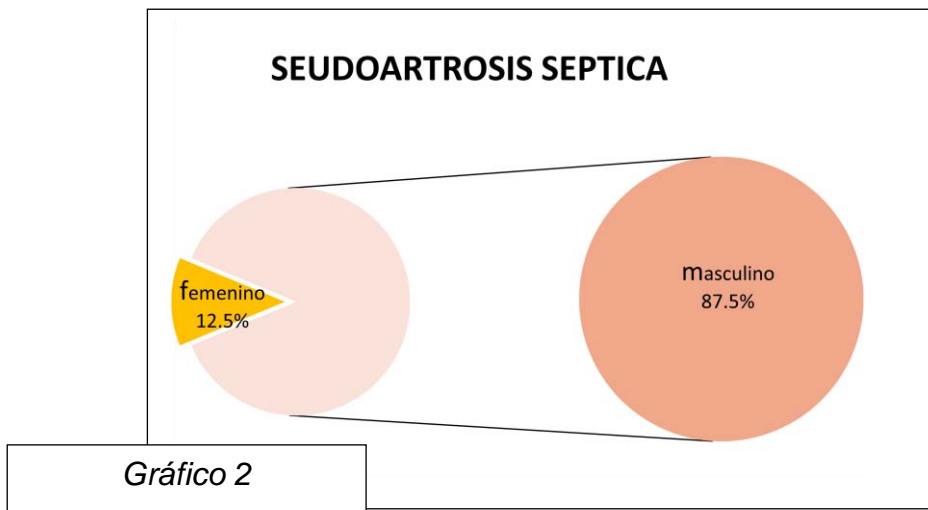
XIV. Resultados

Se obtuvieron un total de 34 muestras de tejido óseo de pacientes con diagnóstico clínico de pseudoartrosis, éstas fueron tomadas durante el transquirúrgico en condiciones de esterilidad y preservadas en formalina al 10%. Se excluyeron 2 muestras de tejido óseo que no fueron colocadas inmediatamente en el medio de fijación, lo cual condicionó problemas en la preservación y visualización microscópica.

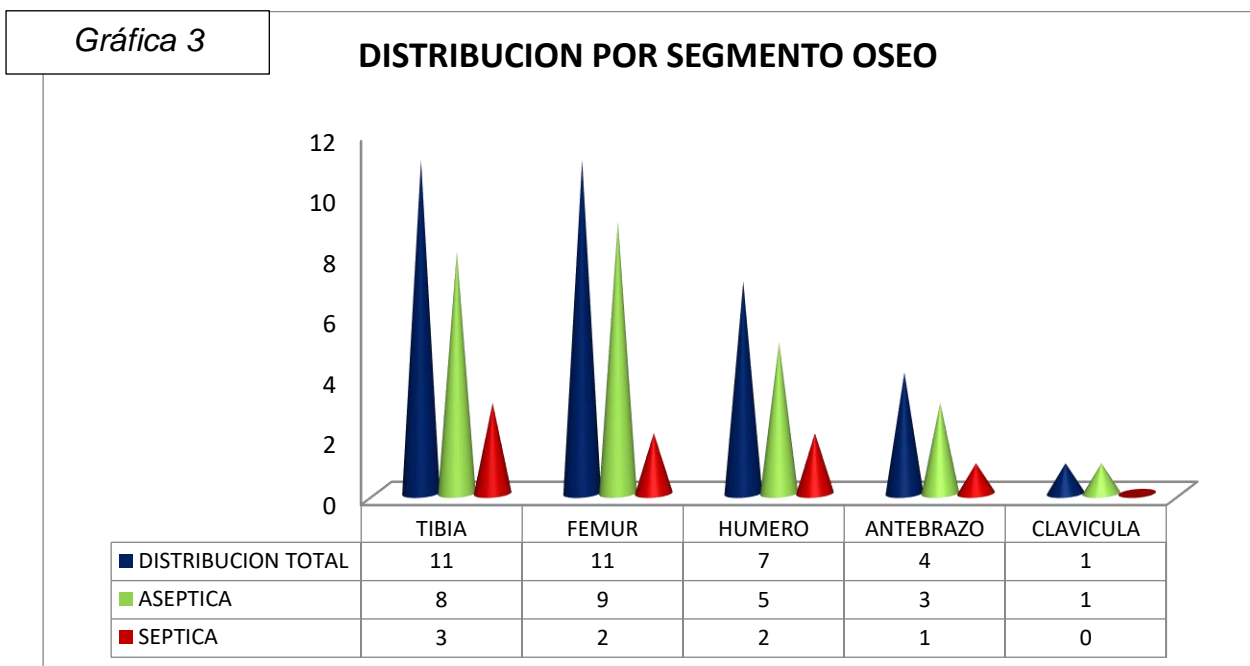
La edad media de los pacientes con diagnóstico de pseudoartrosis incluidos en el estudio fue de 40 años (con un rango de 23 a 57 años), con una mayor proporción en hombres (70.6%) que en mujeres (29.4%) y una relación de aproximada de 2.4:1. El tiempo de evolución de la pseudoartrosis al momento del diagnóstico y el manejo quirúrgico osciló entre los 9 y 36 meses con una media de 17 meses.

De acuerdo al tipo de pseudoartrosis, 26 pacientes se clasificaron como pseudoartrosis aséptica (76.5%), y 8 pacientes como pseudoartrosis séptica (23.5%) corroborada mediante cultivo biopsia, bajo los criterios institucionales [Gráfico 1]. En este último grupo (pseudoartrosis séptica), el 87.5% se presentó en hombres y el 12.5% en mujeres con una relación 7: 1 [Gráfico 2].





Del total de los casos de seudoartrosis, los segmentos óseos mayormente afectados fueron la tibia y el fémur con 11 pacientes (32.3%) respectivamente, seguido en orden de frecuencia el húmero con 7 pacientes (20.5%), antebrazo, radio y/o cúbito con 4 pacientes (11.7%) y finalmente la clavícula en un paciente (3.2%). De éstos, la seudoartrosis aséptica predominó en el fémur (34.6%) y la tibia (30.7%); y en seudoartrosis séptica se afectó más frecuentemente la tibia en un 37.5%, el húmero y el fémur en un 25% respectivamente [Gráfica 3].



Los agentes infecciosos asociados a pseudoartrosis séptica más comúnmente aislados fueron *Staphylococcus aureus* en 6 pacientes (75%) y *Escherichia coli* en 2 casos (25%). Ningún paciente categorizado con ausencia de infección reportó cultivo positivo.

Respecto al manejo quirúrgico de la pseudoartrosis séptica, el 37.5 % de los pacientes fueron tratados mediante fijación interna con placa, en el 37.5% se utilizó fijación mixta con más de un método de fijación de la fractura, y en el 25% se realizó colocación de clavo centro medular, siendo este método el que menos reportó asociación a infección [Gráfico 4].

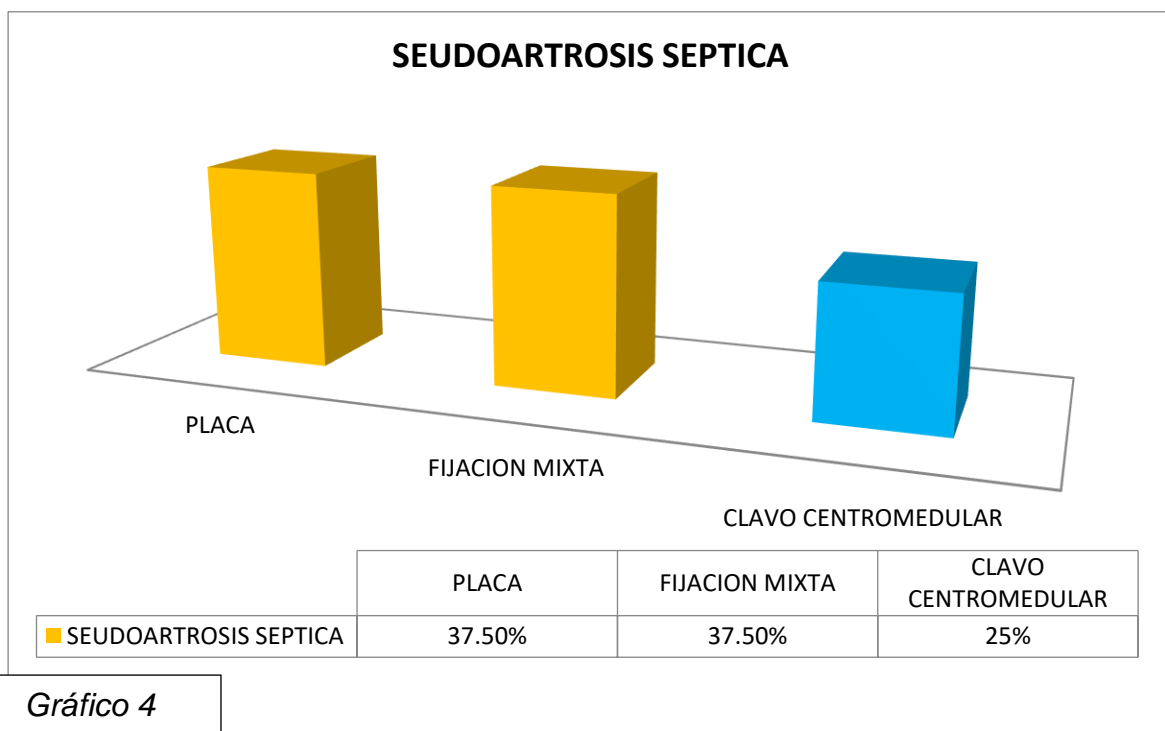
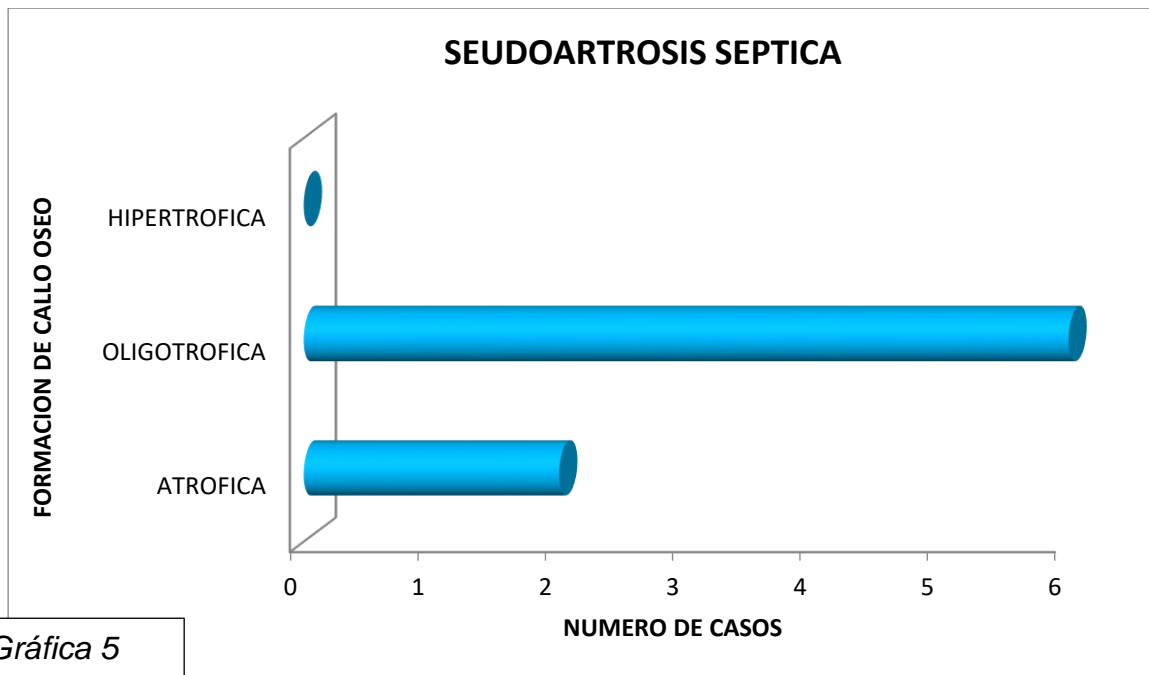


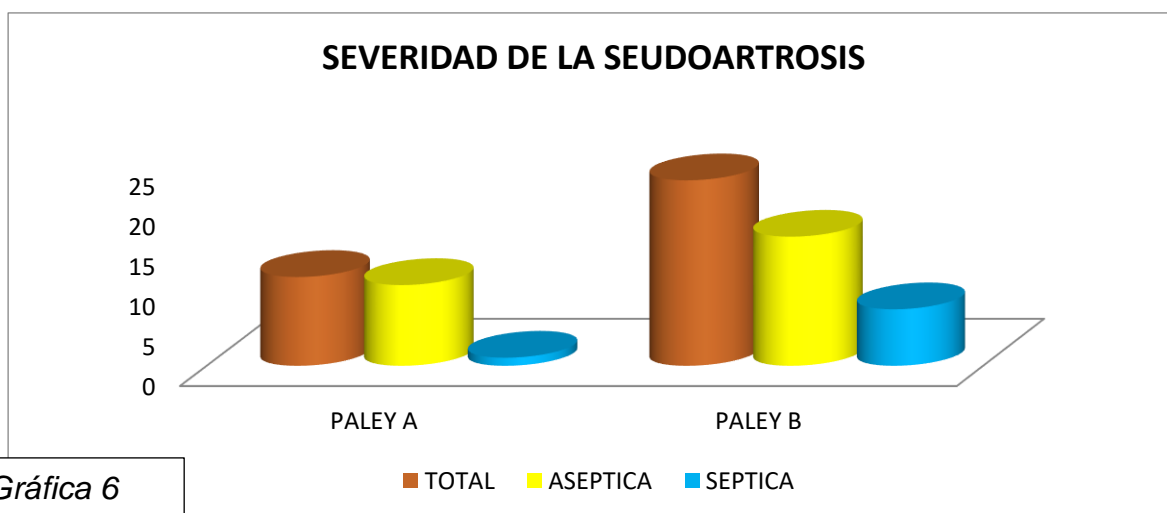
Gráfico 4

Respecto a la evolución clínico-patológica, la formación de callo óseo en ausencia de consolidación óptima mostró 24 casos de pseudoartrosis oligotrófica (70.6%), 6 con pseudoartrosis atrófica (17.6%) y 4 con pseudoartrosis hipertrófica (11.8%). Correlacionando dichos hallazgos con la presencia de infección, se determinó una mayor incidencia de infección en ausencia o mínima formación de callo, en 6 pacientes con pseudoartrosis oligotrófica (75%) y en 2 pacientes con pseudoartrosis atrófica (25%). Ningún caso de infección se asoció a pseudoartrosis hipertrófica [Gráfico 5].



En relación a la severidad de la enfermedad, 11 pacientes del total se clasificaron como Paley A (32.4%), es decir, con una presentación de un defecto óseo menor de 1 cm y 23 pacientes como Paley B (67.6%), o sea, con defecto óseo mayor de 1 cm (Figura 1).

La asociación con infección se observó más frecuente en las pseudoartrosis de mayor severidad, de los 8 casos con reporte de infección, 7 fueron clasificados como Paley B (87.5%) y solo un caso fue reportado como Paley A (12.5%) [Gráfica 6].



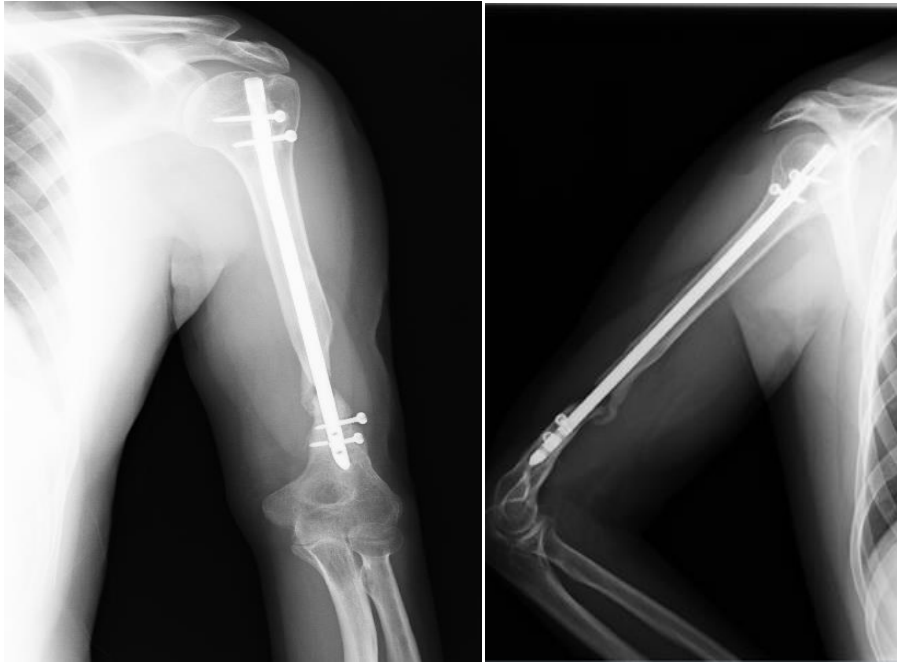


Figura 1. Seudoartrosis oligotrónica de húmero izquierdo Paley B tratada de forma inicial con reducción cerrada y fijación interna con clavo centro medular con bloqueo distal y proximal, con mínima formación de callo óseo y evidencia de ausencia de consolidación ósea, tiempo de evolución 18 meses.

Descripción microscópica

Las secciones histológicas evaluadas mostraron heterogeneidad en los patrones morfológicos, con variabilidad en la proporción, sin embargo, no se observó significancia estadística específica para los tipos de seudoartrosis. Estas características se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Comparación histomorfológica de los tipos de pseudoartrosis.

Característica	Atrófica	Oligotrófica	Hipertrófica
Tejido fibroconjuntivo	++ (hipocelular, densamente colagenizada)	++ (hipocelular)	+++ (hipercelular)
Cartílago fibroso o fibrocartílago	+	+ (degeneración quística)	++
Cartílago hialino	+		+ (aspecto hipertrófico)
Neoformación ósea	+ (a partir de osificación endocondral)	+	++ ó +++ (a partir de osificación endocondral e intramembranosa)
Desvitalización ósea o necrosis	+		-
Vascularidad reactiva	+	+	++
Actividad osteoclástica	++		+++
Seudoartrosis sinovial		+	+
Fragmentación de espículas óseas	++		++

El tejido fibroconjuntivo o fibroconectivo mostró variabilidad en la densidad celular, siendo predominantemente hipocelular en los tipos de atrófico y oligotrófico de pseudoartrosis. La población celular se caracterizó por fibroblastos de morfología habitual, sin atipia, dispuestos en haces cortos, con formación de palizadas nucleares y con proporciones variables de matriz extracelular (colágena), incluyendo áreas densamente colagenizadas, hialinizadas. La densidad celular fue predominantemente mayor en las formas hipertróficas de pseudoartrosis (Figura 1 A y B).

Se identificaron básicamente dos tipos de cartílago, fibrocartílago reparativo y cartílago de tipo hialino. La proporción de cartílago fibroso se observó mayormente asociado a la variedad hipertrófica de pseudoartrosis, formando parte del callo óseo exuberante. Así mismo se identificaron cambios degenerativos quísticos sobre todo en el tipo oligotrófico. La presencia de cartílago hialino dispuesto en islas o lóbulos entre el tejido fibroóseo se observó en las formas atróficas así como en las hipertróficas, sin embargo en ésta última, la disposición de los condrocitos y sus características morfológicas simulan cartílago hipertrófico de la placa de crecimiento.

La formación de hueso nuevo o neoformación ósea fue una característica común en los tipos de pseudoartrosis, ya sea a partir de focos de osificación endocondral (predominantemente en las variedades atrófica y oligotrófica) y/o además a partir de áreas de osificación intramembranosa (más frecuente en la forma hipertrófica) (Figura 1, C y D).

Contrariamente las áreas de desvitalización ósea o necrosis fueron más prevalentes en las formas atrófica y oligotrófica. Estos cambios fueron también observados conjuntamente con fragmentación de espículas óseas, así como la identificación de líneas de osteoesclerosis (Figura 1, E y F).

La actividad osteoblástica se observó en algunas muestras tanto en la forma oligotrófica como hipertrófica, no así la actividad osteoclástica o resortiva identificada predominantemente en la forma atrófica (Figura 2, A).

La vascularización o neoformación vascular se visualizó en los diferentes tipos de pseudoartrosis con variaciones mínimas en la proporción vascular (Figura 2 B, C) así mismo en algunas muestras se asoció a agregados de células inflamatorias de predominio linfoplasmocitario, de disposición difusa y perivascular, además de zonas de edema y proliferación de fibras de tejido conjuntivo (Figura 2 D, E)

Otro cambio asociado a la forma hipertrófica fue la sinovialización o pseudoartrosis sinovial caracterizada por tejido fibrovascularizado con proliferación celular semejante a sinoviocitos y formación de pseudomembranas (Figura 2, F).

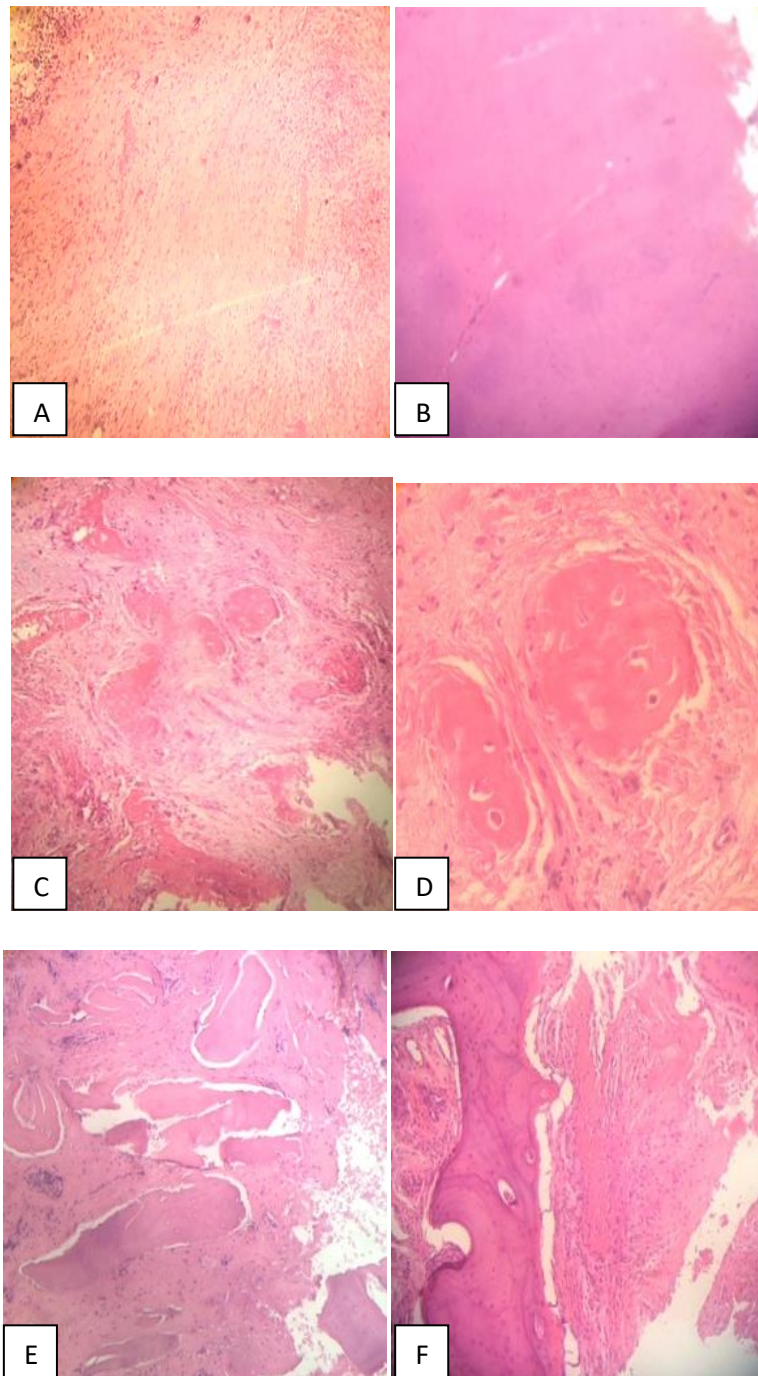


Figura 1. Aspecto histomorfológico en los tipos de pseudoartrosis. A, B tejido fibroso celular e hipocelular, C, D neoformación ósea, E espículas óseas desvitalizadas, F líneas de osteoesclerosis. HE 10x, 20x.

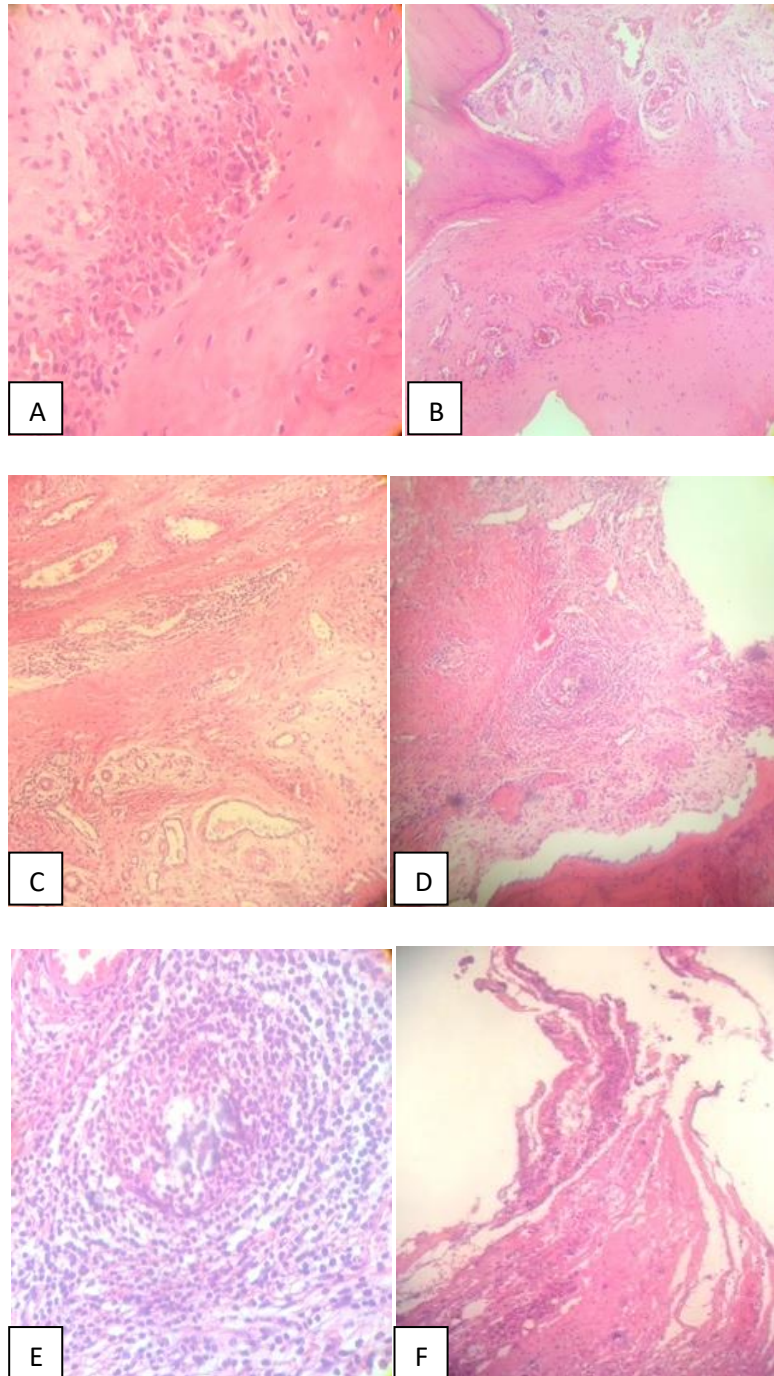


Figura 2. A Actividad resortiva, B-C neovascularización, D-E inflamación crónica, F sinovialización. HE 10x, 20x.

Las formas de pseudoartrosis séptica y aséptica mostraron igualmente heterogeneidad morfológica y proporciones variables de patrones morfológicos, estas características se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Comparativo morfológico de la pseudoartrosis aséptica y séptica.

Característica	Aséptica	Séptica
Áreas de diferenciación condroide	++	+
Formación de hueso nuevo	++	++
Tejido fibroso	++	+++
Tejido de granulación	+	++
Vascularización	++	+++
Inflamación	+ (mononuclear)	++ (polimorfonucleares)
Necrosis	+	++
Depósitos de fibrina		++

Algunas de las características referidas en la tabla como la presencia de tejido de granulación, los depósitos de fibrina, necrosis tisular y el tipo de proceso inflamatorio correlacionaron con los tipos de pseudoartrosis séptica y aséptica, aún cuando no se demostró significancia estadística (Figura 3).

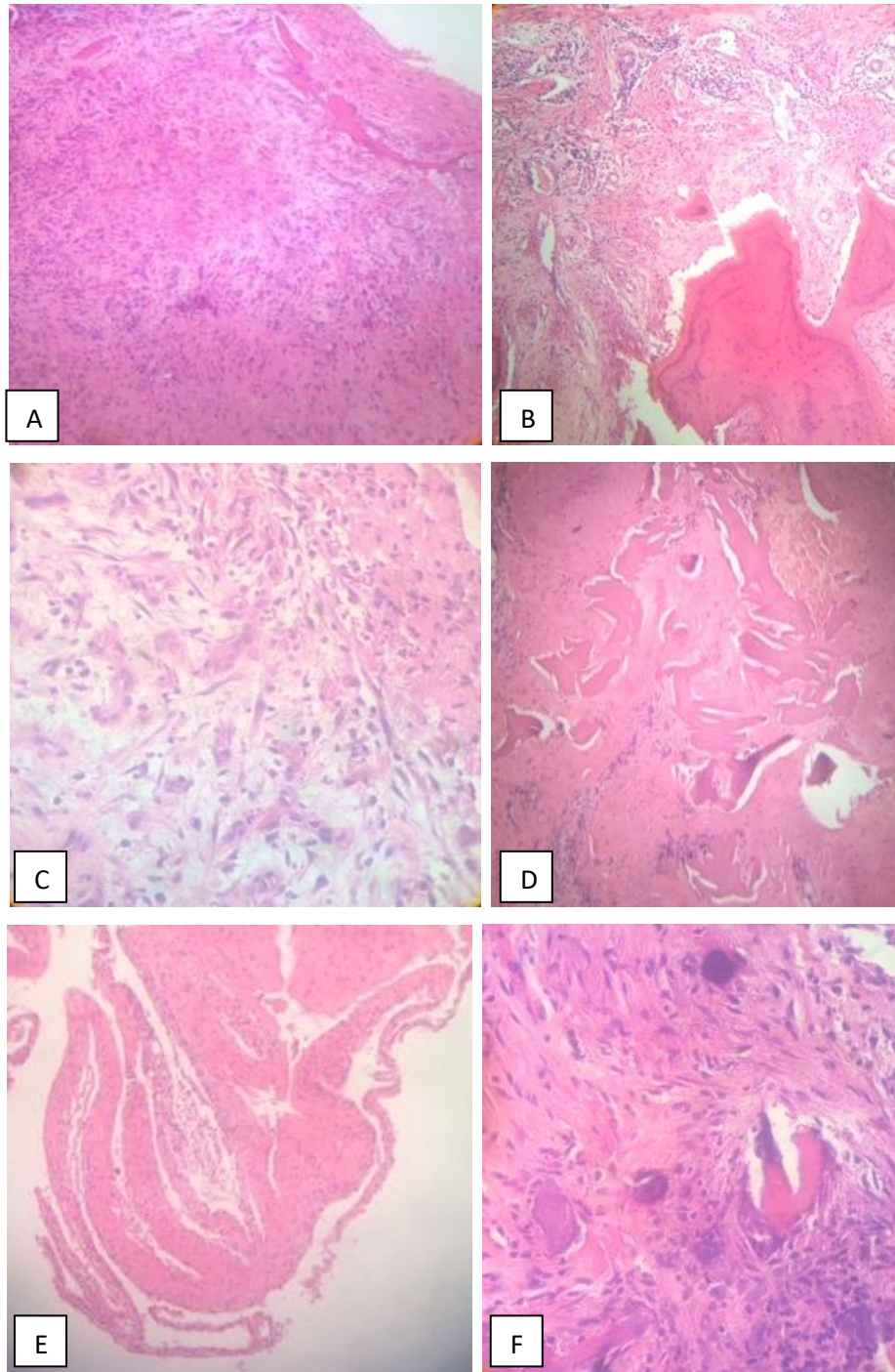


Figura 3. Aspecto histomorfológico de la pseudoartrosis séptica y aséptica. A tejido fibroso, B inflamación, C tejido de granulación, D desvitalización ósea o necrosis, E depósitos de fibrina, F concreciones de hidroxapatita. A y B forma aséptica, C-F forma séptica.

XV. *Discusión:*

La pseudoartrosis o no unión representa un problema de salud pública con consecuencias adversas en la calidad de vida de los pacientes. Los mecanismos que conllevan a pseudoartrosis son multifactoriales y por lo tanto el tratamiento se ha ido adaptando a las necesidades, desde las inmovilizaciones prolongadas en los años 50s (23).

Pocos artículos en la literatura científica examinan la caracterización global de la pseudoartrosis que incluyan aspectos radiográficos, clínicos e histológicos, así mismo los sistemas de clasificación en la actualidad no incluyen hallazgos histopatológicos, que podrían ser determinantes para el tratamiento de la enfermedad, conjuntamente con los aspectos biomoleculares.

Como se describió en la literatura, la clasificación de Weber-Cech incluye tanto observaciones radiográficas como la estabilidad de fijación, a partir de ésta caracterización se reconocen los diferentes tipos de pseudoartrosis: hipertrófica, donde existe adecuado potencial curativo debido a la abundante formación de callo y se asocia con hipervascularidad; oligotrófica, que es vascularizada pero con mínima formación de callo; y atrófica, en la que hay ausencia de formación de callo y nula vascularidad ósea.

En este estudio, se describieron las características histopatológicas de las diferentes formas de pseudoartrosis desde la variante atrófica, oligotrófica hasta la hipertrófica. Como se observó, existe un espectro morfológico amplio, heterogéneo, que correlacionó proporcionalmente con la formación del callo óseo escaso a exuberante, sin embargo, no se identificaron patrones histológicos característicos de un subtipo específico. Lo que conlleva a dificultad para la integración de escalas o patrones morfológicos asociados.

Sin embargo, las proporciones variables de celularidad, así como los componentes de la matriz extracelular definitivamente participan en el fenómeno de no unión. Al respecto, como se ha referido en algunas publicaciones, los elementos formes como solubles del tejido conjuntivo pueden ser blanco de factores de crecimiento con fines

de estimular de manera eficaz y controlada la consolidación ósea. El uso de modelos biológicos in vitro como cultivos y cocultivos celulares, construcción de monocapas, uso de factores estimulantes e inhibitorios del proceso de cicatrización, etc., son líneas de investigación aún pendientes.

Así mismo la influencia de factores concomitantes además de las variables demográficas, como las comorbilidades sobre todo en poblaciones como la nuestra, son también motivo de investigación. No obstante la asociación con procesos infecciosos, el tipo de agentes etiológicos y sus mecanismos de resistencia antimicrobiana, etc., son igualmente aspectos importantes a considerar en la consolidación ósea, siendo enfáticos en la educación del personal que interviene en los procesos de atención a la salud, así como la educación a la comunidad, a fin de prevenir las complicaciones asociadas.

XVI. Conclusiones:

La pseudoartrosis de huesos largos actualmente es uno de los grandes retos ortopédicos, esto se debe no solo a la complejidad de la enfermedad sino a los efectos óseos devastadores cuando no se trata de manera efectiva y precoz.

Podemos concluir que existe heterogeneidad en la caracterización histopatológica de la pseudoartrosis, la cual correlaciona proporcionalmente con la formación del callo óseo, sin embargo, no es posible integrar patrones morfológicos específicos con fines de clasificación.

La asociación de la pseudoartrosis con un proceso infeccioso (pseudoartrosis séptica), mostró mayor lisis tisular, lo cual clínicamente retarda e interfiere con el proceso de consolidación ósea.

XVII. Referencias bibliográficas

1. Fiehn, O., 2002. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 48, pp. 155–171.
2. Clinton R, Mark B. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83:259
3. Escarpenter J. Factores de riesgo para la aparición de pseudoartrosis en las fracturas diafisarias. *Rev Cubana Ortop Traumatol* 1996;9(1)
4. Meskens M, Stuyck J, Feys H, Mulier J. Treatment of nonunion using pulsed electromagnetic fields: a retrospective follow-up study. *Acta Orthop Belg* 1990;(562):483-8.
5. Perez S, Escarpenter JC, Cevallos A. Diagnóstico morfológico funcional: Aplicación práctica en pseudoartrosis diafisarias. 1992
6. Raymond YL. Treatment of established and anticipated nonunion of the tibia in childhood. *J Ped Orthop* 2002;22:754- 760.
7. Smith VA, Wright TW. Nonunion of the distal radius. *J Hand Surg Br* 1999; 24:601-603
8. Bassett, C.A.L. Current concepts of bone formation. *J Bone Joint Surg Am* 44:1217–1244, 1962.
9. Harley, B.J.; Beaupre, L.A.; Jones, C.A.; et al. The effect of time to definitive treatment on the rate of 86 SECTION 1 Section Title 10022 Browner, 978-1-4160-2220-6 nonunion and infection in open fractures. *J Orthop Trauma* 16:484–490, 2002.
10. Calori GM, Phillips M, Jeetle S, Tagliabue L, Giannoudis PV. Classification of non-union: need for a new scoring system? *Injury* 2008; 39 (Suppl 2): S59-63
11. Motsitsi NS. Management of infected nonunion of long bones: the last decade (1996-2006). *Injury* 2008; 39: 155-60.

12. Müller ME. Treatment of nonunions by compression. *Clin Orthop Relat Res* 1965; 43: 83-92.
13. Weber BG, Brunner C. The treatment of nonunions without electrical stimulation. *Clin Orthop Relat Res* 1981; 161: 24-32.
14. Wu CC, Chen WJ. A revised protocol for more clearly classifying a nonunion. *J Orthop Surg* 2000; 8: 45-52.
- 15., Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury*. 2007;38:S3–6
16. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42:551–5.
17. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*. 2007;38:S11–25.
18. Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today*. 2003;8:980–9.
19. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42:551–5.
20. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, et al. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16:427–34
21. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*. 2005;36:S5–7
22. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;355 Suppl:S7–21.
23. Urist MR, Mazet R, Jr, McLean FC. The pathogenesis and treatment of delayed union and non-union; a survey of eighty-five ununited fractures of the shaft of the tibia and one hundred control cases with similar injuries. *J Bone Joint Surg Am*. 1954;36-A:931–80.
24. Heppenstall RB, Brighton CT, Esterhai JL. Synovial pseudarthrosis: a clinical, roentgenographic-scintigraphic, and pathologic study. *J Trauma*. 1987;27:463–70

25. Quacci D, Dell'Orbo C, Salvi M, et al. Ultrastructural aspects of human nonunion. *Histol Histopathol.* 1991;6:87–93
26. Bajada S, Marshall MJ, Wright KT, et al. Decreased osteogenesis, increased cell senescence and elevated Dickkopf-1 secretion in human fracture non union stromal cells. *Bone.* 2009;45:726–35
27. Bajada S, Marshall MJ, Wright KT, et al. Decreased osteogenesis, increased cell senescence and elevated Dickkopf-1 secretion in human fracture non union stromal cells. *Bone.*
28. Reed AA, Joyner CJ, Brownlow HC, et al. Human atrophic fracture non-unions are not avascular. *J Orthop Res.* 2002;20:593–9.
29. Iwakura T, Miwa M, Sakai Y, et al. Human hypertrophic nonunion tissue contains mesenchymal progenitor cells with multilineage capacity *in vitro*. *J Orthop Res.* 2009;27:208–15
30. Guerkov HH, Lohmann CH, Liu Y, et al. Pulsed electromagnetic fields increase growth factor release by nonunion cells. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;384:265–79.
31. Michalis P, Ippokratis P, et al. Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights, *J Cell Mol Med.* 2015, 19(4): 685–713.