



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

FACTORES DE CRECIMIENTO QUE SE INVOLUCRAN EN EL PROCESO REPARATIVO DE LA FRACTURA ÓSEA Y SU POSIBLE APLICACIÓN CLÍNICA PARA ESTIMULAR ESTE PROCESO

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

JUAN FRANCISCO HERNÁNDEZ CHÍCHARO

DIRECTORA DE TESINA: C.D. GRACIELA LLANAS Y CARBALLO

*Graciela Llanas y C.*

MÉXICO, D.F.

2000

225/21



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# ÍNDICE

Introducción .....	1
Capítulo 1 EL TEJIDO ÓSEO .....	2
Características macroscópicas del hueso .....	2
Características histológicas del tejido óseo .....	3
Hueso compacto .....	4
Hueso esponjoso .....	5
Osificación .....	6
Osificación intramembranosa .....	7
Osificación endocondral .....	7
Células del tejido óseo .....	9
Osteoblastos .....	10
Osteocitos .....	11
Osteoclastos .....	11
Bioquímica del hueso .....	13
Capítulo 2 LA FRACTURA ÓSEA .....	16
Concepto de fractura .....	16
Tipos de fractura .....	17
Eventos celulares durante la reparación de la fractura .....	18
Capítulo 3 FACTORES DE CRECIMIENTO QUE SE INVOLUCRAN EN LA REPARACIÓN DE LA FRACTURA ÓSEA .....	23
Concepto de factor de crecimiento .....	23
Tecnología del DNA recombinante .....	24
Factores de crecimiento presentes en el hueso .....	25
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) .....	26
Factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF) .....	27
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) .....	29
Factor de crecimiento transformante- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) .....	30
Proteína ósea morfogenética (BMP) .....	32
Otros factores y citocinas .....	33
Capítulo 4 FUNCIONES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA REPARACIÓN DE LA FRACTURA ÓSEA .....	35
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) .....	35

Fuentes	35
Datos de estudios in vitro	35
Efecto in vivo en animales adultos	37
Factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF)	38
Fuentes	38
Actividades de IGF in vitro	39
IGF in vivo	40
Interacciones de IGF y la hormona del crecimiento en el esqueleto	41
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	42
Disponibilidad en hueso	42
Actividades in vitro	42
Actividades de PDGF in vivo	43
Factor de crecimiento transformante- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	45
Disponibilidad local	45
Actividades in vitro	45
Efectos de TGF- $\beta$ in vivo	47
Proteína ósea morfogenética (BMP)	48
Disponibilidad en hueso	48
Estudios in vitro con BMP	48
Actividades in vivo	49
Efecto de las combinaciones de los factores de crecimiento sobre el metabolismo de los osteoblastos	51

## Capítulo 5 APLICACIONES CLÍNICAS EXPERIMENTALES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN MODELOS ANIMALES ....53

Posibles aplicaciones clínicas de los factores de crecimiento .....53

La proteína ósea morfogenética-2 recombinante humana (rhBMP)  
estimula la formación ósea alrededor de los implantes dentales  
endoóseos .....55

En la osteogénesis por distracción de la mandíbula  
se presentan los factores de crecimiento .. .. 57

Estimulación de la reparación de la fractura por el factor de  
crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en ratas normales y  
diabéticas .....58

Conclusiones .....63

Referencias bibliográficas .....65

# INTRODUCCIÓN

El presente trabajo examina el proceso reparativo de la fractura ósea con especial atención en los factores locales que actúan en el sitio de fractura, éstos tienen un gran papel en la sanación del hueso

Las células se comunican unas a otras por medio moléculas específicas que son generalmente proteínas. Un ejemplo de estas proteínas son los factores de crecimiento, que tienen importantes efectos reguladores en el desarrollo, remodelado y reparación del hueso, esto se debe a sus potentes acciones en el metabolismo celular.

El hueso contiene numerosos factores de crecimiento, pero se han elegido principalmente a cinco para esta revisión por su destacada actividad en la formación ósea. Estos son: factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF), factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) y la proteína ósea morfogénica (BMP)

Comprendiendo las bases celulares y moleculares en los procesos reparativos de la fractura, la presente y futura información será útil para el diseño de nuevas terapias que aceleren el proceso reparativo óseo y, por consecuencia, *aumentar la habilidad del médico para regenerar activamente el hueso*

# CAPÍTULO 1

## EL TEJIDO ÓSEO

### CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL HUESO.

Es posible analizar la estructura macroscópica de los huesos considerando en primer término la anatomía de un hueso largo, que en forma característica consiste de las siguientes partes:

1. **Diáfisis.** Es la porción principal y larga del hueso.
2. **Epífisis.** Son los extremos del hueso
3. **Metáfisis** Es la región del hueso maduro en la que se une la diáfisis con la epífisis. En un hueso en crecimiento, se trata de la región en que se refuerza el cartilago calcificado y después tiene lugar la sustitución por tejido óseo también llamada placa epifisiaria.
4. **Cartilago articular.** Delgada capa de cartilago hialino que cubre la epífisis en el área en que el hueso forma una articulación con otro.
5. **Periostio.** Recubrimiento fibroso, denso y de color blanco de la superficie restante del hueso. El periostio consiste de dos capas. La capa fibrosa externa se compone de tejido conectivo que incluye vasos sanguíneos, linfáticos y nervios que penetran en el hueso. La capa osteogénica interna consiste en fibras elásticas, vasos sanguíneos y células llamadas osteoblastos, que producen nuevo tejido óseo durante el crecimiento, el remodelado y reparación ósea. El periostio es indispensable para el crecimiento, reparación y nutrición del hueso. Además, es el sitio de inserción de ligamentos y tendones.
6. **Cavidad medular.** Es el espacio dentro de la diáfisis que contiene la médula ósea amarilla, de carácter grasoso en los adultos, consiste

principalmente de adipositos y unos cuantos elementos formes de la sangre muy dispersos.

7. Endostio. Capa que cubre la cavidad medular que incluye osteoblastos y osteoclastos

El hueso no es un tejido homogéneo y sólido. De hecho tiene espacios entre sus componentes duros Tales espacios son conductos para los vasos sanguíneos que aportan nutrimentos a las células óseas Las regiones de un hueso pueden clasificarse en esponjosa o compacta, según el tamaño y la distribución de los espacios. (44)

El hueso esponjoso o trabeculado contiene espacios grandes y numerosos, que pueden constituir en algunos huesos una área de almacenamiento de médula roja. Esta presente en la mayoría de los huesos cortos, planos o de forma irregular, así como en la epífisis de huesos largos. El hueso compacto, en comparación incluye menos espacios Se deposita en forma de capas sobre el hueso esponjoso y es más grueso y denso; desempeñando funciones de protección y sostén. (45)

## CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE EL TEJIDO ÓSEO.

El hueso o tejido óseo, al igual que otros tejidos conectivos, contiene abundante sustancia intercelular que rodea a células muy dispersas. Las células maduras del tejido óseo son los osteocitos A diferencia de otros tejidos la sustancia intercelular del hueso contiene sales minerales abundantes en especial fosfatos de calcio ( $(Ca_3(PO_4)(OH)_2)$ ) y algo de carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ) La denominación genérica de estas sales es la de hidroxiapatitas. Al depositarse estas en la estructura que forman las fibras colágenas de la sustancia intercelular, el hueso se osifica. Las hidroxiapatitas

comprenden el 67% del peso en el hueso, y las fibras colágenas, células óseas y otros componentes orgánicos el 33% restante. Aunque las células óseas sólo constituyen el 2% del peso del hueso, son las responsables de su *formación y mantenimiento durante la vida.* (28, 42)

## HUESO COMPACTO.

Una característica importante en el hueso compacto del adulto es el tener una estructura de anillos concéntricos, *no así el hueso esponjoso.* Los vasos sanguíneos y nervios provenientes del periostio penetran en el hueso compacto a través de los canales perforantes (canales de Volkman) (32, 42)

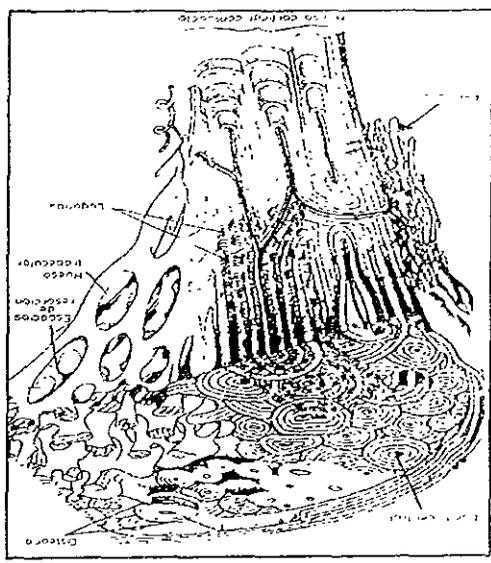
Los vasos sanguíneos de estos canales se conectan con los vasos de la cavidad medular y de los canales centrales (conductos de Havers). Estos tienen una disposición longitudinal con relación al eje del hueso. Los rodean las láminas concéntricas, que son anillos de sustancia intercelular calcificada y dura. Entre las láminas se observan pequeños espacios, llamados lagunas, que contienen osteocitos. Los osteocitos son osteoblastos maduros que ya no producen tejido óseo y cuya función es participar en las actividades celulares cotidianas del tejido óseo. En las lagunas se originan conductos diminutos, los canalículos, dispuestos en forma radial, que contienen finas prolongaciones de los osteocitos, conectan con otras lagunas y, finalmente, con los canales centrales. De tal suerte, se forma una red intrincada en el hueso misma que equivale a la existencia de numerosas rutas por las que llegan nutrimentos a los osteocitos y salen los desechos de ellos (32, 42)

A diferencia del hueso compacto, el hueso esponjoso no posee osteonas verdaderas sino que consiste de una red irregular de placas delgadas de hueso, llamadas trabéculas. Los espacios que hay entre las trabéculas están llenos de médula roja. Las células de ésta son las productoras de los

### HUESO ESPONJOSO.

Cada canal central, con los osteocitos, láminas, lagunas y canales, forman una osteona (sistema haversiano), que es una estructura característica de los huesos del adulto. Las áreas que hay entre las osteonas contienen laminitas intersticiales. Estas también presentan lagunas con osteocitos y canales, pero es usual que sus laminitas no conecten con las osteonas. Las laminitas intersticiales son fragmentos de viejas osteonas destruidas parcialmente durante la remodelación ósea. (43, 45)

Figura 1 Vista transversal del hueso compacto



elementos formes la sangre. En el interior de las trabéculas hay lagunas, que contienen osteocitos. Vasos sanguíneos provenientes del periostio penetran el hueso esponjoso, y los osteocitos de las trabéculas se nutren directamente de la sangre que circula por las cavidades medulares. (32, 42)

## OSIFICACIÓN (OSTEOGÉNESIS)

El proceso por el que se forman los huesos en el cuerpo recibe el nombre de osificación u osteogénesis. El "esqueleto" del embrión humano consiste de membranas fibrosas y cartílago hialino, cuya forma corresponde a la que tendrán los huesos futuros, y ambas estructuras constituyen el medio en que ocurre la osificación. Ésta se inicia hacia la sexta o séptima semanas de la vida embrionaria y continúa hasta la edad adulta. Son dos las clases de osificación que ocurren. Una de ellas es la intramembranosa, término que se refiere a la formación de hueso directamente en las membranas fibrosas o sobre ellas. La segunda clase es la osificación endocondral, con formación de hueso a partir de cartílago. Estos dos tipos de osificación no originan diferencias en la estructura de los huesos maduros; tan sólo son dos tipos diferentes de formación del tejido óseo. Ambos dan lugar a la sustitución de tejido conectivo pre-existente con tejido óseo. (38, 42)

La primera etapa del desarrollo de los huesos es la migración de células mesenquimatosas (células del tejido conectivo embrionario) al área en que se efectuará la osificación. Dichas células aumentan en número y tamaño. En algunas estructuras del esqueleto, que no poseen capilares, tales células se convierten en condroblastos (que originarán cartílago), mientras que en otras que sí están vascularizadas, se transforman en osteoblastos, éstos forman tejido óseo por osificación intramembranosa o endocondral. (32, 43)

## OSIFICACIÓN INTRAMEMBRANOSA.

De los dos tipos de osificación, la intramembranosa es la más sencilla y directa. Gran parte de los huesos del cráneo, así como las clavículas, se forman por este método. Los aspectos esenciales de este proceso se describen a continuación.

Los osteoblastos derivados de células mesenquimatosas se agrupan en la membrana fibrosa, en sitios llamados centros de osificación. Acto seguido, secretan sustancias intercelulares compuestas en parte de fibras colágenas que forman una estructura o matriz, en la que se depositan las sales de calcio. fenómeno llamado calcificación. Toda vez que un grupo de osteoblastos queda totalmente rodeada de matriz calcificada, constituye una trabécula. Al formarse las trabéculas en los centros de osificación cercanos, se fusionan en la forma de red abierta que es característica del hueso esponjoso. Algunos osteoblastos quedan atrapados en las lagunas y, con la formación de capas sucesivas de tejido óseo, pierden su capacidad para producir hueso y se llaman osteocitos. Los espacios que hay entre las trabéculas se llenan de médula roja. El tejido conectivo original que rodea a la masa ósea en crecimiento se convierte en periostio. En este punto, el área osificada se ha transformado en hueso esponjoso verdadero. A la larga, se reconstruyen las capas superficiales de este último y se transforman en hueso compacto, gran parte del cual se destruye y reforma hasta que el hueso adquiere la forma y el tamaño adulto. (13, 38, 42, 45)

## OSIFICACIÓN ENDOCONDAL.

La osificación endocondral o intracartilaginosa es la sustitución de cartilago con tejido óseo. Muchos de los huesos del cuerpo y algunas partes del

cráneo se forman por esta vía. Este tipo de osificación se observa más satisfactoriamente en un hueso largo, de modo que se ejemplificará en éste último.

En los comienzos de la vida embrionaria, se forma un modelo cartilaginoso del hueso futuro, mismo que queda cubierto por una membrana llamada pericondrio. En el punto medio de la diáfisis de este modelo, un vaso sanguíneo penetra en el pericondrio y estimula el crecimiento de las células de la capa interna del pericondrio y su transformación en osteoblastos. Estas células inician la formación de un "collar" de hueso compacto en derredor de la porción media de la diáfisis del modelo cartilaginoso. Una vez que el pericondrio comienza la formación de tejido óseo, recibe el nombre de periostio. En forma simultánea, ocurren cambios en el cartílago y el centro de la diáfisis. En esta área, el centro de osificación primario, las células cartilaginosas experimentan hipertrofia (aumento en su tamaño), probablemente a causa de que acumulan glucógeno como fuente de energía y producen enzimas que catalizarán reacciones químicas futuras. Estas células finalmente se rompen, lo que da por resultado un cambio en el pH extracelular, que se vuelve más alcalino, lo que hace que se calcifique la sustancia intercelular; es decir, se depositen minerales en ella. Una vez calcificado el cartílago, los materiales nutritivos que requieren sus células ya no difunden por la sustancia intercelular, lo que origina la muerte de tales células. Esto hace que empiece la degradación de dicha sustancia, lo que deja grandes cavidades en el modelo cartilaginoso. Los vasos sanguíneos crecen por los espacios que ocupaban previamente las células cartilaginosas y agrandan todavía más las cavidades. Poco a poco se fusionan estos espacios en la porción media de la diáfisis y se forma la cavidad medular.

(13 32 42)

Al mismo tiempo que ocurren estos cambios del desarrollo, los osteoblastos

del periostio depositan capas sucesivas de hueso en la superficie externa, de modo que se engruesa el collar, particularmente en la diáfisis. Se continúa el crecimiento del modelo cartilaginoso en sus extremos, con lo que aumenta de manera constante su longitud. A la larga, los vasos sanguíneos penetran en las epífisis y aparecen centros de osificación secundarios en ellas, en los que se forma hueso esponjoso. A manera de ejemplo, en la tibia se desarrolla un centro de osificación secundaria en su epífisis proximal poco después del nacimiento, mientras que los demás centros aparecen en la epífisis durante el segundo año de vida. (42)

Una vez formados los dos centros de osificación secundarios, el tejido óseo sustituye por completo al cartílago, con excepción de dos regiones. Éstas son las superficies articulares de las epífisis, donde recibe el nombre de cartílago articular, y una placa que está entre la epífisis y la diáfisis, llamada placa epifisiaria (metáfisis de un hueso en crecimiento). (42)

## **CÉLULAS DEL TEJIDO ÓSEO.**

La cavidad medular de los huesos posee un estroma, compuesto por elementos de tejido conectivo que sirve de base estructural para la hematopoyesis. En dicho estroma, se distinguen los siguientes tipos de células: adipocitos, células madre o reticulares, células endoteliales, mastocitos, macrófagos y osteoblastos. Estudios experimentales relacionan a las células madre con la osteogénesis. Así, estas células mesenquimatosas indiferenciadas ascienden a diferentes familias de células progenitoras (proeritrocitos, mieloblastos, linfoblastos, megacarioblastos), podrían ser también el origen de las dos estirpes de células osteogénicas: osteoblastos y condroblastos (32, 43, )

## OSTEOBLASTOS.

Los osteoblastos, son derivados de los preosteoblastos, a su vez provenientes de células mesenquimatosas primitivas. Son de dos formas diferentes. osteoblastos activos (o tipo I) y osteoblastos inactivos (o tipo II). (43)

Los osteoblastos activos sintetizan la sustancia o matriz osteoide y, aunque esta sustancia se mineralice, los osteoblastos siguen siendo células vivas. Poseen un núcleo ovalado, con 2 a 4 nucleolos. Su citoplasma es basófilo (por su alto contenido de RNA), con un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado, característico de las células que llevan a cabo una síntesis de proteínas. Además, mediante histoquímica puede demostrarse en los osteoblastos activos una gran actividad de la fosfatasa alcalina (enzima que libera fosfato inorgánico). (43, 45)

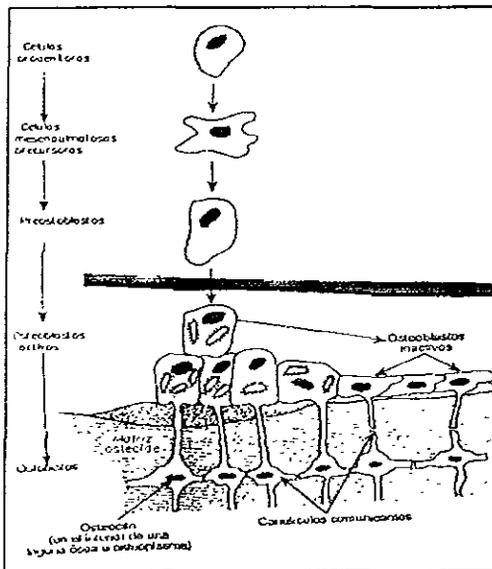


Figura 2 Familia del osteoblasto.

Los osteoblastos activos, una vez sintetizada la matriz apropiada para un área ósea determinada, pueden seguir dos caminos: quedar englobados en la matriz osteoide, dando lugar a los osteocitos, o bien derivar a osteoblastos inactivos (o tipo II), también llamados osteocitos superficiales y células de revestimiento, que poseen en comparación con los osteoblastos activos, un núcleo más pequeño y una cromatina más densa. (42, 43, 45)

#### OSTEOCITOS.

Los osteocitos se ubican en lagunas u osteoplásmas incluidas en la matriz osteoide y se intercomunican entre sí por un sistema de canaliculos. La ultraestructura de los osteocitos depende de su grado de actividad. Al microscopio electrónico pueden verse osteocitos activos, dotados de un núcleo redondo y bien delimitado, con un retículo endoplásmico y aparato de Golgi bien desarrollados (con una activa síntesis de matriz ósea). Algunos de estos osteocitos activos poseen vacuolas y abundantes mitocondrias, que se relacionan con la intervención de la resorción ósea.(42, 43, )

#### OSTEOCLASTOS.

Son células grandes, multinucleadas y con un citoplasma rico en mitocondrias, vacuolas y lisosomas. Una enzima característica de estas células y sus precursoras es la fosfatasa ácida.

Su origen es discutido. Se ha postulado que: 1) derivan de células del tejido conectivo, 2) proceden de células hematopoyéticas, como resultado de la fusión de fagocitos mononucleares, 3) derivan de células madre hematopoyéticas, que se diferenciarían hacia dos líneas celulares diferentes: una hacia monocitos y otra hacia preosteoclastos y, 4) los osteoclastos podrían originarse localmente a partir de células mesenquimales perivasculares. (36, 43)

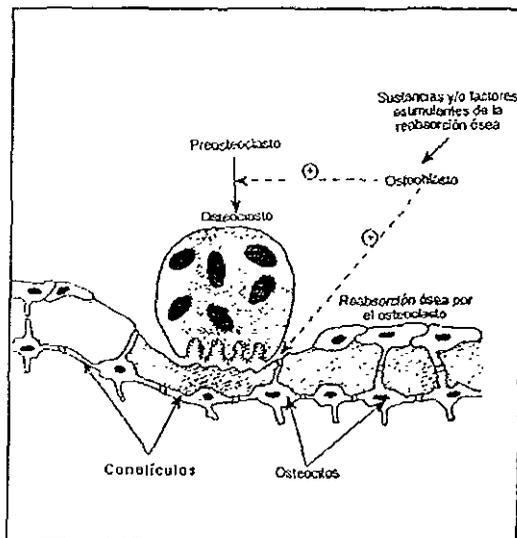


Figura 3. Acción del osteoclasto.

En cualquier caso, y sin importar su origen embriológico, los osteoclastos son las células encargadas de la resorción ósea. Tienen una vida media de unos dos días, se mueven a lo largo de las laminillas óseas y poseen la capacidad de reabsorber la matriz osteoide mineralizada. Para ello se forman en su citoplasma unas invaginaciones que a la vez desarrollan prolongaciones filiformes, semejantes a un cepillo que penetran entre las fibrillas de la matriz osteoide para fragmentarlas. (32, 43)

## BIOQUÍMICA DEL HUESO.

El hueso se compone de células y matriz extracelular, ésta última comprende un 35% de sustancia orgánica y un 65% de sustancia inorgánica. Los componentes inorgánicos son principalmente calcio y fosfato en forma de hidroxiapatita. Los componentes orgánicos de la matriz ósea son normalmente divididos en proteínas colágenas y no colágenas. (28, 42, 45)

**COLÁGENO** Aproximadamente un 90% de la matriz osteoide es colágeno tipo I, que es fibrilar e insoluble y constituye la mayor proteína estructural del hueso. No posee gran afinidad al calcio y muy probablemente son las proteínas no colágenas las que median el depósito mineral en la matriz orgánica. (29, 43, 45)

**OSTEOCALCINA** Es sintetizada por los osteoblastos, representa aproximadamente el 1.5% de las proteínas no colágenas de la matriz osteoide. Su papel fisiológico es el de unirse al calcio e iniciar el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita durante la mineralización. (29, 43)

**OSTEONECTINA.** Es una glucoproteína que constituye cerca del 2.5 % de las proteínas no colágenas. Tiene gran afinidad al colágeno tipo I, al calcio y por la hidroxiapatita. Además en presencia de colágeno tiene la capacidad de precipitar iones calcio y fosfato, teniendo una función similar a la osteocalcina (28, 43)

La presencia de osteonectina se ha demostrado en osteoblastos y sustancia osteoide. así también en plaquetas, fibroblastos y condrocitos. Tiene la

propiedad de adherirse a las membranas celulares y favorecer la agregación celular. Ello sugiere que la osteonectina puede actuar como un medio de anclaje de las células óseas a la propia matriz osteoide (29, 43)

**TROMBOSPONDINA.** Se encuentra en la matriz osteoide. Posee la capacidad de combinarse con iones calcio y su acción fisiológica sería similar a la de la osteonectina (28, 43)

**FIBRONECTINA.** Se compone de dos subunidades, cada una de ellas con regiones definidas para su combinación con sustancias específicas (colágeno, heparina, fibrina, superficies celulares). Probablemente su acción es similar a las anteriores. (43)

**OSTEOPONTINA.** Es sintetizada por osteoblastos, osteocitos, condrocitos y fibroblastos. Tiene la capacidad de combinarse con la hidroxiapatita y también facilitar el anclaje de las células óseas a la matriz mineralizada. La osteopontina puede anclar al osteoclasto durante la resorción ósea por medio de receptores de vitronectina (28, 43)

**SIALOPROTEÍNA ÓSEA.** Contiene una secuencia especial de aminoácidos que permite adherirse a las células óseas, tiene una función similar a la de la osteopontina (29)

**FACTORES DE CRECIMIENTO.** Constituyen menos del 1% de las proteínas no colágenas, sus funciones se describen más adelante. (28)

Tabla 1 Componentes orgánicos del hueso

PROTEINAS ÓSEAS	TAMAÑO (kD)	PORCENTAJE	FUNCIÓN
Colágena tipo I	320	90	Proteína estructural mayor, proporciona fuerza tensil
Colágena tipo V, VIII, XII		< 1	Se asocian con la colágena tipo I para controlar la estructura fibrilar.
Osteocalcina	6.5	1.5	Adherencia a la hidroxiapatita.
Osteonectina	33	2.5	Adherencia al calcio
Fosfoproteinas			Adherencia al calcio y celular.
-Osteopontina	32	0.2	
-Sialoproteína ósea	34	1.0	
Trombospondina	150	0.2	Adherencia al calcio, osteonectina y celular.
Factores de crecimiento		< 0.1	Regula el balance entre la formación y resorción ósea. Inicia y mantiene la respuesta reparadora después del daño óseo.

## CAPÍTULO 2

# FRACTURAS ÓSEAS

### CONCEPTO DE FRACTURA.

Una fractura es la pérdida de continuidad ósea como resultado de una injuria. Esto desencadena localmente una reacción inflamatoria con vasodilatación, aumento de la temperatura, aumento de la permeabilidad y edema. Estos componentes determinan grados variables de equimosis y tumefacción. Los músculos desarrollan hipertonia y los ligamentos vecinos se endurecen. En los extremos de los huesos se presenta una reacción ácida desde el décimo día hasta dos semanas después. La acidez conduce a la disolución de las sales de calcio y absorción de restos óseos incluidos. En el hematoma aparecen fagocitos que invaden y limpian el material de desecho. (32, 36, 38)

Posteriormente debido a la activación osteoblástica, se aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina y empiezan a aparecer depósitos de calcio en el material osteoide que invade el hematoma. Este tejido neoformado recibe el nombre de callo óseo y una vez que la fractura se ha cubierto por él, comienza la remodelación. La arquitectura del patrón trabecular original del hueso afectado se restablece y se absorbe el exceso del callo. El tiempo requerido para que el hueso sea reparado varía con su estructura y función, pero en términos generales puede ser de 3 a 12 semanas. En este período los extremos deben permanecer inmóviles y en la posición más cercana posible a la que ocupaba normalmente. Si los fragmentos óseos se desplazaron, debido al mecanismo de rotura o a la acción de los músculos insertados en dichos fragmentos, se hace necesaria la reducción

(enderezamiento de los fragmentos) antes de la inmovilización (por medio de enyesado, férulas, etc.). En ocasiones en que es considerable la pérdida de tejido o en que sea necesaria la estimulación del proceso de reparación, se recurre a los injertos de tejido óseo. El injerto brinda bloques constructivos de calcio y fósforo además de que forma una red que orienta el proceso de reparación, después este tejido se reabsorbe y se sustituye por hueso nuevo. (12. 32 )

## TIPOS DE FRACTURA

Son diversas las clasificaciones de las fracturas, pero en términos generales, la siguiente resulta útil

1. **PARCIAL O INCOMPLETA.** En esta fractura la ruptura del hueso es parcial en sentido transversal.
2. **COMPLETA.** La ruptura ósea es total en sentido transversal, de modo que éste se separa en dos fragmentos.
3. **CERRADA O SIMPLE.** Fractura en la que el hueso no sobresale a través de la piel
4. **ABIERTA O COMPUESTA.** Fractura en que los extremos de los fragmentos del hueso sobresalen a través de la piel.
5. **CONMINUTA.** Fractura en que el hueso queda reducido a esquirlas en el sitio de impacto y se observan pequeños fragmentos óseos entre los dos principales fragmentos.
6. **CON DESPLAZAMIENTO.** Fractura en la que no se preserva la alineación anatómica de los fragmentos óseos.
7. **SIN DESPLAZAMIENTO.** Fractura en que se conserva la alineación anatómica de los fragmentos óseos.
8. **POR ESTRÉS.** Es una fractura parcial que resulta de la incapacidad del

hueso para soportar el estrés repetido que resulta, por ejemplo, de cambios en el ritmo de entrenamiento físico.

**9. PATOLÓGICAS.** Son fracturas resultantes del debilitamiento del hueso a causa de enfermedades, tales como neoplasias, osteomielitis, osteoporosis, osteomalacia, entre otras (42)

## EVENTOS CELULARES DURANTE LA REPARACIÓN DE UNA FRACTURA.

El primer suceso después de un trauma físico que resulta en una fractura es el sangrado de los fragmentos óseos dañados. El acumulamiento de sangre forma un coágulo que llena el espacio entre los dos fragmentos óseos. Con la formación del coágulo y la activación de la cascada de coagulación, comienza una *respuesta inflamatoria aguda* y el *tejido blando que rodea el sitio de fractura* es invadido por células inflamatorias. Se forma tejido de *granulación* en el sitio del coágulo y con él llegan células mesenquimatosas indiferenciadas. (15, 38)

Se inician dos cascadas celulares; una se involucra con la formación de cartilago en el sitio del hematoma, y la otra, con la nueva formación de hueso. La primera respuesta en la reparación ósea es la proliferación de células del periostio en los dos extremos de los fragmentos en un intento por formar un puente entre el espacio óseo creado por la fractura, esto se da con un involucramiento del hematoma que se ha formado en el espacio de fractura. Luego de que esto ha ocurrido, las células mesenquimatosas en el área central empiezan a diferenciarse y a cubrir la matriz extracelular cartilaginosa creando el callo de fractura. El callo de fractura proporciona cierta estabilidad a la región y proporciona una función limitada al hueso mientras continúa la reparación. El callo cartilaginoso es posteriormente remplazado por hueso

nuevo por una osificación endocondral (15, 28, 38)

Los osteoclastos, de origen hematopoyético conducidos al sitio por la revascularización del hueso, remueven el cartílago extracelular y crean un espacio en el que los osteoblastos son capaces de cubrir con cantidades significantes de hueso trabecular. El hueso nuevo es entonces remodelado para que la arquitectura final en el sitio de fractura se asemeje a la forma original antes del trauma, con una cortical densa que rodee a la médula ósea activa (38 43)

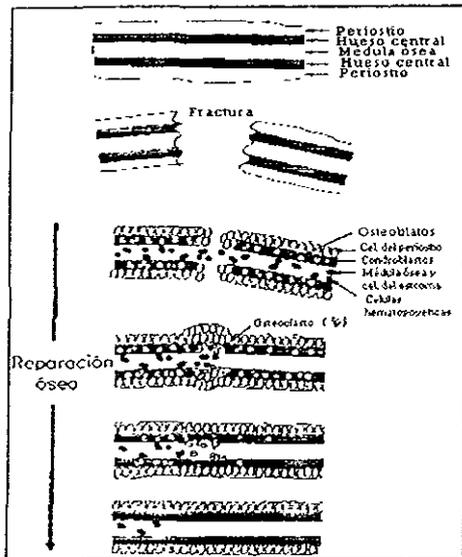


Figura 4. Eventos celulares durante la reparación de la fractura ósea

Se sabe poco acerca de el origen de las células responsables de reparar la fractura. Pero el hecho de que ocurra una nueva formación ósea en vez de un tejido cicatrizal en el sitio fracturado, sugiere que hay un reservorio de células capaces de diferenciarse tanto en cartílago como en hueso que esta presente en el esqueleto adulto totalmente formado. También se dice que

estas células son capaces de responder a ciertas señales que inician una vía que recapitula los procesos de la *formación esquelética en el embrión*. (29, 38)

Actualmente se cree que son dos las distintas poblaciones celulares involucradas en la reparación de fracturas y que por lo mismo hay dos distintos procesos: una población *procedente de el puente de células del periostio* y la otra población que origina el *callo cartilaginoso*. Esta hipótesis se apoya en los estudios histológicos que detallan la morfología celular durante el proceso reparativo. (38)

#### POBLACIONES PROCEDENTES DEL PERIOSTIO.

Se piensa que determinadas células osteoprogenitoras residentes en el periostio son inducidas por señales liberadas en el sitio de fractura para proliferar y posteriormente *diferenciarse en osteoblastos activos* que depositan grandes cantidades de matriz extracelular en el sitio de fractura. Luego de que la nueva matriz es mineralizada, se crea el *primer puente físico* en el espacio de fractura. La activación de las células osteoprogenitoras del periostio se conoce como osteoconducción y requiere la presencia de superficies óseas para que sirva de base sobre la cual se deposite nuevo hueso (15, 29, 38, 43)

También existe la posibilidad de que se originen células osteoprogenitoras de la médula ósea y migren al periostio para participar en la nueva formación ósea. Se sabe que esta población celular proviene de distinto lugar al de las células osteoprogenitoras residentes del periostio. Análisis experimentales, usando un modelo de formación ósea ectópico a demostrado la presencia de células madre o reticulares mesenquimatosas (que producen eritrocitos,

linfocitos, megacariocitos, etc.), residen en otros tejidos no óseos, y son capaces de diferenciarse en células formadoras de hueso con la presencia de señales adecuadas. Estas células madre que pueden estar en los tejidos blandos y músculos que rodean al hueso pueden ser las responsables de formar el puente de periostio luego de diferenciarse, y depositar proteínas de la matriz ósea. Se sabe que ciertas citocinas tienen actividad quimiotáctica sobre las células mesenquimatosas que se presentan en la fractura y así poder guiar la migración de estas células. ( 38, 43)

#### POBLACIÓN QUE ORIGINA EL CALLO CARTILAGINOSO.

Se sabe también que hay células de los tejidos blandos que rodean a la fractura que migran dentro del hematoma y pueden participar en la formación de cartilago al diferenciarse en condroblastos en respuesta a factores liberados en el hematoma. Esta diferenciación podría ser análoga a la diferenciación inducida por BMP que se lleva a cabo en el ensayo de la formación ósea ectópica. Durante este proceso, las células mesenquimatosas responden a señales inductivas y empiezan a producir matriz semejante a la de los condrocitos, que luego es eliminada y remplazada por hueso. Similarmente pasa cuando el callo de fractura, que es cartilaginoso, madura para luego ser reemplazado por hueso (28, 38, 41)

También se cree que el estroma de la médula ósea contiene una célula capaz de diferenciarse en condrocito. Sin embargo, los datos de este estudio son escasos y son basados en líneas celulares derivadas de la médula ósea que pueden expresar moléculas de matriz extracelular cartilaginosa después del tratamiento con citocinas. Es también posible que el periostio contenga una célula condroprogenitora que pudo ser dejada por el pericondrio (una

fuelle de células condroprogenitoras) durante la formación ósea embrionaria. La teoría de que hay condroblastos en el periostio se apoya en el hecho de que huesos que se formaron por *osificación intramembranosa* (sin cartilago de por medio), se reparan a través de la formación de un callo de fractura que es de tejido cartilaginoso. Otra evidencia de este fenómeno se observa cuando las células del periostio son capaces de *mostrar fenotipos* semejantes al condroblasto in vitro. Finalmente, es posible que las células madre mesenquimatosas que se diferencian en osteoblastos, puedan también diferenciarse en células de tipo condroblastico en el medio local adecuado (26, 29, 38)

## CAPÍTULO 3

# FACTORES DE CRECIMIENTO QUE SE INVOLUCRAN EN LA REPARACIÓN DE FRACTURAS

### CONCEPTO DE FACTOR DE CRECIMIENTO.

Al igual que otros procesos biológicos, el crecimiento y diferenciación celular está regulado por una serie de señales que actúan bien en forma autocrina, paracrina o endocrina, entre ellas, los factores de crecimiento juegan un papel especialmente importante. (41, 43)

*Los factores de crecimiento son proteínas que estimulan la proliferación celular, éstos pueden también estimular la transformación fenotípica de las células. Todos ellos producen sus efectos por interacción con receptores específicos de membrana en las células blanco, para desencadenar un proceso de transducción de señales a nivel intracelular en una región o dominio de este receptor (activación de enzimas tirosin-quinasa, que son características de los factores de crecimiento), para luego actuar a nivel nuclear y afectar la expresión de una serie de genes que darán lugar a un aumento o disminución de la mitogénesis, hipertrofia celular, diferenciación celular, entre otras acciones que se verán más adelante. (21, 22, 30, 39)*

Los factores de crecimiento se involucran tanto en el desarrollo normal de los tejidos (como la embriogénesis y la hematopoyesis), así como en la evolución tumoral. También se presenta en los procesos reparativos como la cicatrización de heridas en tejido blando y la reparación de fracturas. (2, 20, 21 43)

Las diferencias entre los factores de crecimiento y otros péptidos considerados clásicamente como hormonas son varias. Los factores de crecimiento, aunque algunos de ellos pueden ser detectables en plasma y actuar de forma endocrina, generalmente ejercen sus efectos biológicos a través de mecanismos autocrinos o paracrinos. A esto hay que sumar el que su síntesis no suele estar restringida a una glándula o tejido celular específico, sino que suele ocurrir en un gran número de tejidos. Por otra parte, las acciones biológicas de un factor de crecimiento determinado son moduladas en gran medida por efectos realizados por otros factores de crecimiento sobre las mismas células blanco. (31, 43)

## TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE.

La tecnología del DNA recombinante se inició a partir de la década de los 70, llegando a ser potencialmente accesible para el estudio de los componentes codificados por los organismos debido al desarrollo de una metodología para aislar genes.

Esta tecnología ha aumentado el entendimiento de los procesos tan fundamentales como la expresión genética, haciendo posible la realización de gran parte de la investigación básica, modificando totalmente la medicina y acelerando el desarrollo de agentes terapéuticos para el hombre, los animales y la agricultura. ( 27, 35)

La tecnología del DNA recombinante, popularmente llamada ingeniería genética tiene numerosas aplicaciones, que han fascinado y alarmado al público pero se ha percibido que los beneficios de esta tecnología superan, por lo general, a los riesgos.

Estas técnicas permiten la producción en masa de varias sustancias biológicas, entre ellas, los factores de crecimiento, que sería muy difícil obtener e impracticable para su uso clínico por medio de purificación, debido a las pequeñas cantidades en que se presentan en los tejidos. Además es más conveniente usar sustancias recombinantes que preparaciones purificadas en la aplicación clínica por la seguridad de no transmitir infecciones o biomoléculas de células tumorales, además se obtiene una mejor calidad en la homogeneidad de la sustancia. (3, 7, 35)

## FACTORES DE CRECIMIENTO PRESENTES EN EL HUESO

Junto con las proteínas estructurales, la matriz ósea también contiene pequeñas cantidades de proteínas reguladoras muy potentes. los factores de crecimiento, éstos son producidos por los osteoblastos e incorporados dentro de la matriz durante la formación del hueso, pero también pueden ser captadas pequeñas cantidades sistémicas del suero e incorporarse en la matriz. Los factores de crecimiento se encuentran en la matriz hasta que el remodelado o un trauma causa la liberación de estas proteínas. Después de que son liberados, los factores de crecimiento son capaces de regular el metabolismo de los osteoblastos y osteoclastos durante el remodelado óseo, iniciando y controlando la respuesta reparativa después del trauma del hueso. Por lo tanto se consideran los principales reguladores del metabolismo celular del hueso (4, 28, 19)

Los factores de crecimiento tienen sus efectos sólo en el entorno celular local estimulando las células óseas vecinas para proliferar e incrementar la síntesis de la matriz ósea (efectos paracrinos). Similarmente, los

osteoblastos, que producen los *factores de crecimiento*, pueden estimularse a sí mismos para tener una actividad metabólica adicional (efecto autócrino). El número total de factores de crecimiento relacionados con las funciones de las células óseas es desconocido, pero el número de éstos está en continuo crecimiento como resultado de las nuevas técnicas de investigación en bioquímica y biología molecular. (15, 39)

A continuación se citan los factores de crecimiento y sus respectivos receptores que más se involucran en la reparación de las fracturas, describiendo sus principales características moleculares

## FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF).

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es una proteína con un peso molecular de 30 kD y está formada por dos cadenas de aminoácidos distintas llamadas PDGF-A y PDGF-B. Fueron inicialmente aisladas de las plaquetas y subsecuentemente se encontró que eran sintetizadas por una variedad de células óseas y no óseas. Estas dos cadenas pueden combinarse para formar cadenas dobles PDGF-AA, PDGF-BB o PDGF-AB. (1, 8, 23)

Los efectos de PDGF son mediados por proteínas receptoras para PDGF, que contienen subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , que análogamente, pueden tomar conformaciones  $\alpha$ - $\alpha$ ,  $\beta$ - $\beta$  o  $\alpha$ - $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  se une a PDGF-A y a PDGF-B, mientras que la subunidad  $\beta$  sólo se une a PDGF-B. De esta forma, el receptor  $\alpha$ - $\alpha$  se une a las tres formas de PDGF, los receptores  $\alpha$ - $\beta$  se unen sólo a PDGF-AB y los receptores  $\beta$ - $\beta$  se unen sólo a PDGF-BB.

Constan de un dominio o región intracelular tirosín-quinasa y un dominio extracelular que contiene cinco secuencias repetidas similares a inmunoglobulinas. (1, 29, 38)

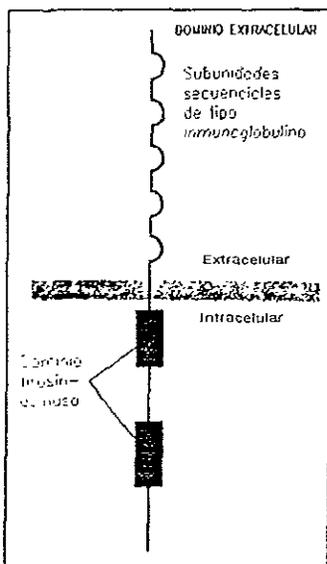


Figura 5. Receptor de la familia PDGF

## FACTOR DE CRECIMIENTO DE TIPO INSULÍNICO (IGF).

Los factores de crecimiento de tipo insulínico (IGFs), también llamados somatomedinas son una familia de proteínas que son, en parte, dependientes de la hormona del crecimiento (GH) y que media muchas de las acciones anabólicas y mitógenas de la GH. Se observó que cuando se administraba directamente GH a los condrocitos cultivados fuera del organismo, por lo general no se producía proliferación o aumento de tamaño de los mismos. Sin embargo, la inyección de GH en el animal intacto produce proliferación y crecimiento de éstas células. En resumen, se encontró que la

hormona del crecimiento hace que el hígado (y en mucho menor grado otros tejidos) forme las somatomedinas, las cuales poseen a su vez un potente efecto magnificador de todos los aspectos del crecimiento, principalmente el óseo. Estos factores se encontraron primero en el plasma como resultado de la secreción hepática, pero también son sintetizadas localmente por muchos tejidos, incluyendo el hueso. (2, 25, 45)

Originalmente identificadas en 1957 por su habilidad para estimular la incorporación de sulfatos en el cartilago de la rata, también fue llamado factor de sulfatación. En 1972 el nombre restrictivo de factor de sulfatación fue reemplazado por el de somatomedinas. En la purificación de éstas se obtuvo dos somatomedias, una básica y una ácida. En 1978 Rinderknecht y Humbel aislaron estas dos somatomedinas activas en el plasma humano, demostrando una sorprendente semejanza estructural con la proinsulina. Después se acordó que estos dos péptidos se les cambiara el nombre por el de factores de crecimiento de tipo insulínico (IGFs). (38, 45)

IGF-I (o básico) es un péptido de 70 aminoácidos; IGF-II (o ácido) es un péptido de 67 aminoácidos. Ambas tienen una semejanza aproximada de un 50% con la insulina humana. (1, 28, 30)

Los efectos de IGFs sobre las células son mediados por receptores específicos para IGF. El receptor para IGF-I es una proteína de cuatro cadenas que contiene dos subunidades extracelulares  $\alpha$  unidas por un enlace disulfuro, éstas a su vez se unen a dos subunidades transmembrana  $\beta$ . Las subunidades  $\beta$  contienen un dominio intracelular tirosín-quinasa que es un requisito para la transferencia de la señal. En contraste el receptor para IGF-II es una proteína de una cadena que carece intracelularmente de un dominio tirosín-quinasa. En base a la diferencia de los dominios

extracelulares de estos dos receptores, las uniones específicas de los receptores IGF-I y II son distintas. El receptor tipo I para IGF se une a IGF-I y IGF-II con una alta afinidad, con la insulina se une débilmente (con cien veces menos afinidad). El receptor tipo II tiene una alta afinidad para IGF-II, una baja afinidad para IGF-I y no se une a la insulina. (28, 38, 41)

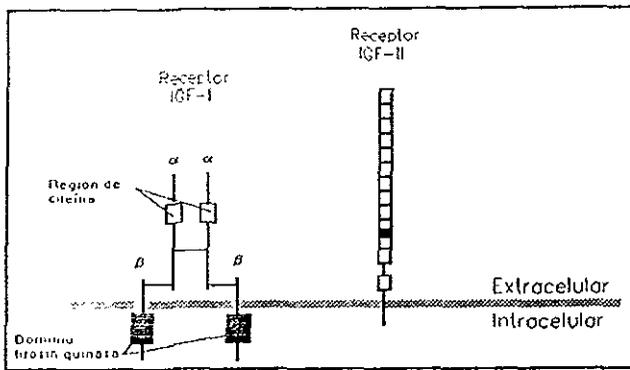


Figura 6 Receptores de la familia IGF.

## FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGF).

El factor de crecimiento de fibroblastos-1 (FGF-1) y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), también conocidos como FGF ácido y FGF básico, respectivamente; fueron las primeras proteínas descubiertas de éste tipo y en consecuencia, las mejor estudiadas (2, 24)

La forma básica de FGF se presenta en todos los órganos, demostrando inducir la diferenciación de varios tipos celulares como condrocitos, neuronas, fibroblastos y células endoteliales. In vivo, ambas formas de FGF tienen propiedades angiogénicas. La forma ácida de FGF se presenta mayormente en el cerebro y la retina. (2, 18, 24)

No es muy claro el mecanismo por el que estos factores son secretados por las células. Se ha reportado que FGF-2 puede ser liberado de las células después de daño o muerte celular. Esto se puede relacionar durante la formación ósea *endocondral*, cuando los *condrocitos* que contienen FGF-2 son lisados durante el remplazo del cartílago por tejido óseo. Otra posibilidad de la secreción de FGF-1 y 2 es por el *clásico mecanismo de la translocación a través del aparato de Golgi*. A la fecha se conocen cuatro diferentes receptores para FGF, todos ellos son miembros de los receptores *tirosín-quinasa* (13, 38)

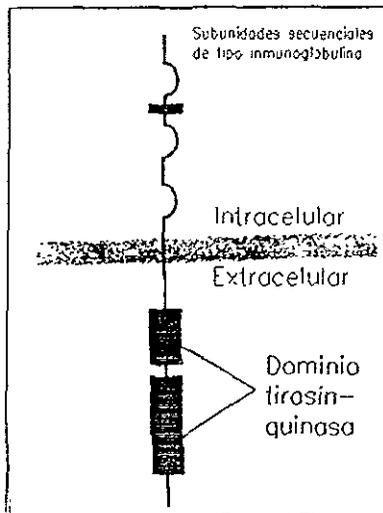


Figura 7 Receptor de la familia FGF

## FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE- $\beta$ (TGF- $\beta$ )

El factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es producido por muchas células incluyendo las plaquetas (donde fue descubierto) y en la matriz ósea,

en la que curiosamente es abundante. La mayoría de las células que lo sintetizan contienen receptores específicos para TGF- $\beta$  y de esta manera se cree que muchas de sus actividades de control de crecimiento se realizan de manera paracrina y autocrina (4, 28, 30)

TGF- $\beta$  es sintetizada como una proteína precursora con un peso molecular de 26 kD y esta constituida por dos cadenas idénticas de 112 aminoácidos, ocho cisteínas forman cuatro enlaces disulfuro intracadena y una novena cisteína forma un enlace disulfuro intercadena que mantiene unida a las dos cadenas. Esta proteína precursora debe ser disociada de un complejo de secreción latente y llegar a ser biológicamente activa. Hasta ahora se conocen 5 subtipos de TGF- $\beta$ , que han sido denominadas TGF- $\beta$ 1 a 5. (4, 29, 38)

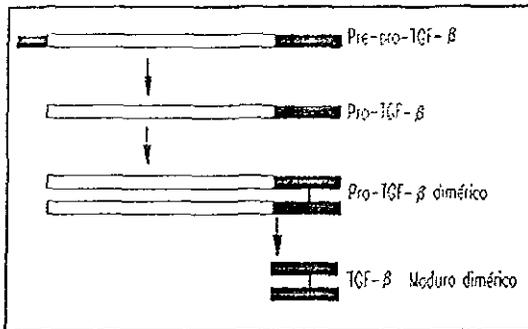


Figura 8. Síntesis de TGF- $\beta$

Los tres tipos de receptores más comunes para TGF- $\beta$  son designados como I, II y III, que son expresados por muchos tipos de células, incluyendo los osteoblastos. Se ha visto que contienen un dominio intracelular serina/treonina-quinasa para la transducción de señales. (4, 29, 38)

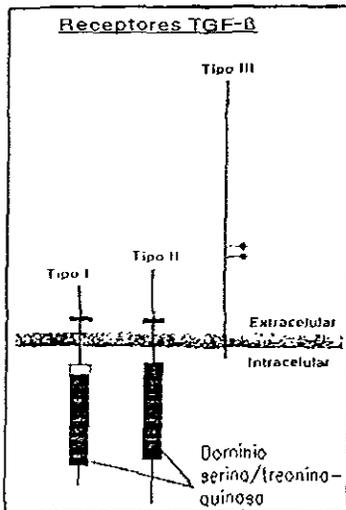


Figura 9. Receptores de TGF-β

## PROTEÍNAS ÓSEAS MORFOGENÉTICAS (BMPs).

En 1965 Marshall Urist descubrió que la matriz ósea desmineralizada podía inducir la formación de hueso cuando se colocaba ectópicamente en tejido subcutáneo. Observó que esta matriz producía la formación completa de tejido óseo trabecular y médula ósea. La capacidad de que la matriz ósea desmineralizada pudiera formar hueso se atribuyó a una proteína que Urist llamó "Proteína Ósea Morfogenética". En 1988 se purificaron y secuenciaron tres diferentes BMPs. (28, 38, 37)

Actualmente se conocen 12 BMPs que se denominan BMP-1 a 12. Se consideran miembros de la superfamilia TGF-β. Las BMPs son sintetizadas como grandes precursores que luego sufren proteólisis para luego

secretarse. Las moléculas activas son proteínas de dos cadenas de 114 y 139 aminoácidos, respectivamente; seis cisteínas forman tres enlaces disulfuro intracadena y una séptima cisteína forma un enlace disulfuro intercadena que mantiene unida a las dos cadenas. (5, 38)

Los receptores que median los efectos de BMP se empiezan a describir. Son similares en tamaño a los receptores para TGF- $\beta$ . Se ha encontrado un dominio intracelular serina/treonina-quinasa, semejante al receptor de TGF- $\beta$ . (3, 5, 38)

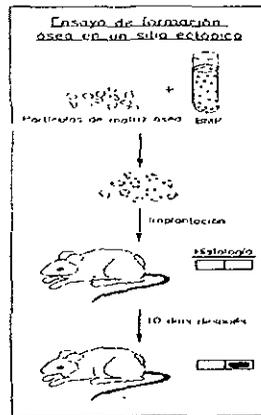


Figura 10. Inducción ósea ectópica

## OTROS FACTORES Y CITOCINAS.

Las células sanguíneas secretan citocinas que son principalmente reguladores de las respuestas inmunológicas, pero también pueden tener funciones en la regulación de las células óseas. Debido a la estrecha proximidad de las células de la médula ósea con el hueso, algunas citocinas pueden actuar como reguladores paracrinos del metabolismo celular óseo. Las citocinas pueden ser divididas en interleucinas (IL-1, IL-3, IL-6), en

factores estimulantes de colonias (M-CSF, GM-CSF) y en factor de necrosis tumoral ( $TNF-\alpha$ ) Estos factores pueden ser producidos por los osteoblastos y probablemente ejercer sus principales acciones en interacciones de osteoblasto-osteoclasto, donde los factores estimulantes de colonias estimulen la línea celular monocito/osteoclasto, mientras que las interleucinas y factores de necrosis tumoral inhiben la actividad osteoblastica y estimulan la actividad osteoclastica. El efecto general sobre el hueso es por lo tanto, estimular la resorción ósea, aunque algunos estudios indican efectos estimulatorios en dosis bajas de IL-1 en osteoblastos aislados. Las prostaglandinas, en especial PGE-2, que son reguladores no proteicos, han demostrado estimular tanto la formación y resorción ósea. La aplicación local de PGE-2 in vivo conduce a una formación masiva de hueso inmaduro e incrementa los niveles de IGF-1 en los tejidos vecinos. Sin embargo, existen altos niveles de PGE-2 en áreas de resorción ósea. (14, 21, 29, 45,)

## CAPÍTULO 4

### FUNCIONES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA REPARACIÓN DE FRACTURAS

En este capítulo se describen las funciones de los factores de crecimiento, que en su papel de mensajeros celulares, se involucran importantemente en la reparación de las fracturas. Se menciona primero la fuente tisular donde se encuentran estas proteínas; luego los estudios *in vitro* donde se han estudiado sus acciones (en cierta forma aisladas de otros factores) en cultivos celulares, finalmente se citan sus acciones *in vivo* en diferentes modelos animales.

#### FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGF)

##### FUENTES

FGF-1 y 2 se encuentran en los purificados del tejidos óseo del adulto, mientras que FGF 2 sólo se ha encontrado en el cartilago del adulto. Estudios sugieren que FGF 2 se encuentran en cartilago y hueso por síntesis local más que por un secuestro de la circulación sistémica. (24, 41)

##### DATOS DE ESTUDIOS IN VITRO

*In vitro*, FGF-2 es un potente estimulador en la proliferación del condrocito y se puede potencializar este efecto de manera sinérgica con la presencia de TGF- $\beta$ . Además, FGF puede preservar el fenotipo del condrocito en cultivos que en situación normal, se perdería rápidamente. ( 31, 38, 39)

Cuando los aislados frescos de condrocitos de costilla crecen en presencia

de FGF 2, producen una abundante matriz cartilaginosa. En contraste, si estos crecen en ausencia de FGF 2 producen una matriz insignificante de proteoglicanos. Estos datos indican que si FGF esta presente, puede tener un importante efecto regulador en el tamaño del callo de fractura. (31, 39)

En los huesos largos en crecimiento, los condrocitos residentes de la placa epifisaria sufren una etapa de proliferación, seguidos por un periodo en que se forma matriz en abundancia y luego terminar diferenciandose en condrocitos hipertróficos. Parece que FGF 2 puede promover la maduración temprana en los condrocitos de la placa epifisaria, estimular su proliferación y posiblemente inducir la formación de matriz en los condrocitos no proliferantes. Sin embargo, la hipertrofia del condrocito se inhibe en la etapa final de la maduración por FGF 2. Cuando los condrocitos de la placa epifisaria son cultivados in vitro, espontáneamente progresan al fenotipo hipertrófico, mostrando característicamente niveles elevados de fosfatasa alcalina y calcificación de la matriz. En contraste, si los condrocitos se tratan con FGF 2 no se presentan estas características. Estos datos indican que FGF es importante para regular la eliminación del callo y su reemplazo por hueso en el sitio de fractura. (29, 38, 41)

En células osteoblasticas del cráneo de ratón FGF 1 y 2 se demostró que estimulan su proliferación celular in vitro. En osteoblastos tratados con FGF 2 se inhibe el fenotipo osteoblastico. Además, FGF 2 reduce la actividad de la fosfatasa alcalina y la producción de colágena tipo I y de la proteína osteocalcina. Sin embargo, FGF 2 aumenta la capacidad de las células del estroma medular óseo para formar hueso mineralizado en los cultivos, y todo o parte de este efecto fue debido a la proliferación celular inducida por FGF 2. Desde que el estroma de la médula ósea se ha postulado como una fuente que abastece de células osteoprogenitoras durante la fractura, como se describió anteriormente, esta observación in vitro apoya a FGF como

promotor para la formación ósea durante la reparación del hueso. (24, 29, 38)

Tabla 2 Efectos de FGF en células óseas y de cartílago in vitro

TIPO DE CÉLULAS	PROLIFERACIÓN	SÍNTESIS DE MATRIZ
Condrocitos	+	+ - x
Cel osteoprogenitoras	+	
Osteoblastos	+	

(+) aumenta; (-) disminuye; (x) no tiene efecto

#### EFFECTO IN VIVO EN ANIMALES ADULTOS

Cuando un defecto se crea en el cartílago articular del conejo y se le aplica FGF 2 por dos semanas, se observa la reparación de la zona después de 20 días. El examen histológico revela que el defecto se ha cubierto con condrocitos y una gran matriz extracelular, aunque la organización estructural del nuevo tejido es diferente al del cartílago original. Este defecto no se repara cuando los animales no se tratan con FGF. Un resultado similar se obtiene cuando FGF-2 se aplica en modelos de fractura ósea. En este caso, FGF-2 se aplicó como una inyección única en el sitio de fractura en ratas normales y diabéticas. En ambos grupos FGF-2 aumenta el volumen y contenido mineral del callo de fractura, además de proporcionar fuerza mecánica. Este estudio demostró que el FGF-2 endógeno se presentó en el callo de fractura de las ratas control. (24, 34, 38)

En otro estudio, una fractura se trató con FGF-1, aplicándolo diariamente con inyecciones en el sitio de fractura del fémur de ratas, esto fue por 9 días. La fractura mostró una mayor formación del callo cartilaginoso. Sin embargo, en

comparación con el estudio de FGF-2 , la formación de hueso en la fractura no se presentó con FGF-1. Por otro lado FGF-1, 2 y 4 han demostrado incrementar la formación ósea endosteal con el tratamiento sistémico de estos factores. (38)

FGF puede también influenciar el crecimiento óseo en virtud de sus efectos sobre la vascularización FGF-2 a demostrado ser angiogénico por medio de sus efectos proliferativos y quimiotácticos en las células endoteliales. Se ha observado que la aplicación de FGF-2 en la placa epifisaria en crecimiento del conejo acefera la invasión vascular y se osifica. (28, 13, 38)

FGF produce una respuesta proliferativa de los condroblastos, osteoblastos y células del estroma medular in vitro y similarmente, FGF promueve la reparación ósea en parte por aumentar el número de células disponibles en el sito de fractura. FGF estimula en los condrocitos la síntesis de matriz extracelular, lo que indica que puede facilitar la formación temprana del callo de fractura (24, 29, 41)

## FACTOR DE CRECIMIENTO DE TIPO INSULÍNICO (IGF)

### FUENTES

Se ha observado que IGF-I y II son sintetizados en los cultivos celulares de hueso humano. Pero IGF II se encuentra 10 veces en mayor cantidad que IGF I El cartilago también lo sintetiza Los receptores tipo I y II de IGF se encuentran en las células del cartilago y hueso. (11, 18, 28)

IGF-I y II tienen similares actividades biológicas, pero IGF-I es 4 a 7 veces

más potente que IGF-II. Las células óseas también secretan proteínas adherentes a IGF (IGF-BPs), que se unen a IGF modulando las actividades biológicas. El papel preciso de las IGF-BPs no se comprende completamente, pero parecen prolongar la vida media de IGF, neutralizando o incrementando la actividad biológica, o involucrándose en la transportación de IGF cuando se dirigen a las células blanco. (29, 41)

#### ACTIVIDADES DE IGF IN VITRO

En los primeros estudios cuando se descubrió IGF en el suero, se observó que tenía una actividad de tipo insulínico in vitro. También se demostró el efecto mitógeno de IGF I y II en los fibroblastos. Subsecuentemente se notó el efecto proliferativo en condrocitos humanos, de rata y conejo. (38, 41, 45)

Los osteoblastos humanos con características maduras también responden mitogenamente a IGF I y II. IGF afecta el metabolismo y el crecimiento en las células óseas. Esto se demostró por la habilidad de IGF I para estimular la incorporación de sulfatos en el cartílago y condrocitos in vitro. IGF II también incorpora sulfatos, pero es menos potente. (13, 45)

Se han combinado los efectos de IGF I y FGF 2 mostrando sinergismo en la proliferación celular de condrocitos. Similarmente TGF- $\beta$  sinergiza con IGF I en la proliferación de condrocitos, pero no afecta la incorporación de sulfatos. (13, 38)

En los osteoblastos IGF ha demostrado estimular la síntesis de colágena, pero sin afectar la proliferación celular. IGF I estimula la fosfatasa alcalina de los osteoblastos en la rata recién nacida, pero esta enzima no se ve afectada en los osteoblastos adultos por IGF I o II. (38)

Tabla 3 Efecto de IGF sobre las células óseas in vitro

TIPO DE CÉLULAS	PROLIFERACIÓN	SÍNTESIS DE MATRIZ
Condrocitos	+	+
Osteoblastos	+	

(+) aumenta, (-) disminuye, (x) no tiene efecto

### IGF IN VIVO

La habilidad de IGF I para estimular el crecimiento esquelético in vivo se ha demostrado en animales cuando se suprime la IGF endógena. Por ejemplo, en ratas diabéticas y sin hipófisis, la aplicación de IGF I aumenta el grosor epifisial de los huesos, el crecimiento de huesos largos y la formación de hueso trabecular, reflejando la capacidad de IGF I para estimular a los osteoblastos. El crecimiento longitudinal resulta de los efectos mitógenos en la placa epifisaria. (13, 41)

En el animal intacto también se incrementa la formación ósea con el tratamiento de IGF I exógeno. En ratas de 4 semanas de edad, la administración sistémica de IGF I por 7 días aumentó la estatura y el grosor de la epífisis tibial en una pequeña pero significativa cantidad sobre los controles. Dosis relativamente bajas de IGF I aumentó la formación de hueso cortical y trabecular, pero no la longitud del hueso en las ratas de 6 meses, mientras que en altas dosis se notó incremento en el crecimiento de los huesos largos y su cortical, pero se inhibe la formación de hueso trabecular en ratas de 4 meses. En ambos estudios también se describieron modestos efectos IGF I sobre el número de osteoclastos. Se observó que el tratamiento con IGF I reduce los niveles sistémicos de la hormona del crecimiento (GH), la cual estimula la resorción ósea. El aumento del número de osteoclastos debido a IGF I puede ser un efecto secundario relacionado a los niveles de (GH) disminuidos. (38, 45)

Los estudios de IGF I en humanos son limitados, éstos muestran efectos estimulatorios tanto en la formación como en la resorción ósea. No se ha comprendido bien la causa, y por lo tanto, IGF I no es útil como tratamiento, por ejemplo, en la osteoporosis. Estudios indican que IGF I estimula la reparación de defectos óseos en el cráneo de la rata, lo que sugiere ser terapéuticamente útil para estas injurias (38)

### INTERACCIONES DE IGF Y LA HORMONA DEL CRECIMIENTO (GH) EN EL ESQUELETO

En el contexto de que IGF I tiene efecto en el crecimiento del esqueleto, es apropiado analizar brevemente estas interacciones con la hormona del crecimiento (GH). GH es sintetizada y secreta por la adenohipófisis y actúa en muchos tejidos en una manera endocrina clásica. GH efectúa su acción de crecimiento en el esqueleto por intervención de IGF I como mediador. GH estimula la secreción de IGF I en el hígado, luego IGF I por vía sistémica llega a las placas epifisarias en crecimiento y produce el efecto de crecimiento en los huesos. Esto se demostró al ver que en ratas sin hipófisis, al inyectarles GH producía crecimiento de los huesos, pero si se inyectaba también un suero anti-IGF I el efecto de crecimiento se bloqueaba. Estudios posteriores confirmaron que GH produce la síntesis local (en huesos) y sistémica (del hígado) de IGF I, que es la directamente responsable del crecimiento óseo (38, 45)

Se puede resumir que IGF I y II estimula la proliferación celular y la síntesis de matriz extracelular en los condrocitos y osteoblastos adultos in vitro. El papel fisiológico de IGF I como estimulador del crecimiento esquelético al probarlo en animales jóvenes indica claramente el potencial terapéutico de

este factor en los casos clínicos de pacientes que tendrían corta estatura. Sin embargo el valor terapéutico de IGF I o IGF II en la reparación de fracturas no se ha aclarado del todo. (25, 38)

Como el principal efecto de IGF en las células óseas es estimular la replicación celular, se incrementa el número de células capaces de sintetizar matriz ósea. Pero este efecto mitogénico es menos pronunciado que otros factores de crecimiento, tales como TGF- $\beta$  o PDGF-BB IGF también tiene otros efectos independientes sobre las diferentes funciones de los osteoblastos, incrementa la producción de colágena ósea e inhibe la degradación de ésta. Como resultado de estos efectos, IGF incrementa la masa ósea. (13, 25, 29)

## FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

### DISPONIBILIDAD EN HUESO

PDGF es sintetizado por muchos tipos de células presentes en el sitio de fractura incluyendo plaquetas, macrófagos y células del músculo También es sintetizado por las células óseas adultas en cultivo. PDGF A es producido por las células óseas adultas en el humano, no así la PDGF B. Los receptores para PDGF se han encontrado en las células óseas humanas para PDGF A y B (1, 8, 21)

### ACTIVIDAD IN VITRO

Los cultivos de condrocitos articulares tienen una respuesta proliferativa a

PDGF, además de estimular la síntesis de proteoglucanos También se ha visto que PDGF-AB estimula la síntesis de otras moléculas en la matriz y osteocalcina en los cultivos de condrocitos articulares. Los condrocitos de la placa epifisaria y de la superficie articular tiene una respuesta proliferativa a PDGF-BB y en menor grado a PDGF-AA. Sin embargo, los condrocitos de la placa epifisaria tratados con PDGF no muestran cambios en la incorporación de sulfatos Las células óseas adultas humanas muestran respuestas proliferativas a PDGF, pero no hay cambios en la producción de osteocalcina (1, 8, 23, 38)

Tabla 4 Efecto de PDGF sobre las células óseas in vitro

TIPO DE CÉLULAS	PROLIFERACIÓN	SÍNTESIS DE MATRIZ
Condrocitos	+ x	+ x
Osteoblastos	+	x

(+) aumenta; (-) disminuye; (x) no tiene efecto

#### ACTIVIDADES DE PDGF IN VIVO

Los estudios *in vivo* indican que PDGF no induce formación ósea por si mismo, pero lo puede hacer bajo ciertas condiciones cuando se combina con otros factores. Por ejemplo, la implantación de PDGF en sitios no óseos de las ratas induce sólo la formación de tejido de granulación. Cuando PDGF se combina con una matriz ósea desmineralizada que contiene factores de crecimiento *endógenos* y se implanta subcutáneamente, aumentan las propiedades del material para la inducción ósea. En un modelo de estudio en conejo se realizó una osteotomía en la tibia, luego se trató con PDGF mostrando después de 4 semanas una fuerza y estabilidad similar al hueso

*contralateral no operado, mientras que el defecto no tratado con PDGF fue muy débil ( 23, 38)*

Se ha observado que cierto número de factores de crecimiento endógenos al sitio de fractura son necesarios para que PDGF tenga efecto en la reparación de ésta. Similarmente, en un estudio se combinó PDGF con IGF I y se observó que promueve la regeneración ósea en la enfermedad periodontal en perros, mientras que en los controles no tratados no se observó dicha formación. PDGF combinado con dexametasona induce un efecto similar en la enfermedad periodontal en un modelo primate. También se ha reportado que PDGF con osteogenina inhibe la formación ósea en defectos craneales. En este estudio PDGF parece inducir una respuesta inflamatoria sostenida que interfiere con la inducción ósea de la osteogenina. Las investigaciones in vitro indican efectos positivos de PDGF en las células del hueso y cartilago, pero estos resultados a veces son inconstantes. Se cree que PDGF puede actuar favorablemente en la reparación ósea con un régimen adecuado de distribución y dosis (17, 38)

Se puede resumir que la expresión local de PDGF parece estimular la proliferación celular en hueso y cartilago en modelos animales adultos. Hay un efecto estimulatorio en la síntesis de matriz extracelular en condrocitos articulares, pero no así en los condrocitos de la placa epifisaria en crecimiento o en los osteoblastos. Aunque PDGF no parece ser capaz de inducir diferenciación en las células progenitoras de osteoblasto o condrocitos puede aumentar la osteogénesis con ayuda de otros factores endógenos presentes en el sitio de fractura. (1, 8, 23)

El principal efecto de PDGF sobre las células óseas es mitogénico, pero la más potente isoforma es PDGF-BB, que puede incrementar en 6 veces más esta propiedad. PDGF también es un potente factor quimiotáctico para las

células mesenquimatosas. (1, 28)

## FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE- $\beta$ (TGF- $\beta$ )

### DISPONIBILIDAD LOCAL

Se ha encontrado TGF 1 y 2 en los huesos de bovino y TGF 1, 2 y 3 en el pollo. Se han localizado las tres isoformas en los osteoblastos, condrocitos hipertrofiados, osteoclastos y en fibroblastos del pericondrio y periostio. En cambio, los condrocitos maduros de la placa epifisiaria en crecimiento muestran pocas cantidades de TGF- $\beta$ . Se ha demostrado la síntesis de TGF- $\beta$  en las células del hueso y cartilago. Los condrocitos articulares del humano adulto secretan las tres isoformas de TGF- $\beta$  en el cultivo. Las células que sintetizan TGF- $\beta$  tienen alguna habilidad para regular la expresión de las tres isoformas. Por ejemplo, la secreción de TGF- $\beta$ 2 es regulado por la misma TGF- $\beta$ 2 pero no por TGF- $\beta$  1 o 3, mientras que TGF- $\beta$ 1 es inducida por TGF- $\beta$ 1 o 3 pero no por TGF- $\beta$ 2. TGF- $\beta$  activa a sido recuperada en cultivos de condrocitos de la placa epifisiaria en crecimiento. Además se ha demostrado que los osteoblastos sintetizan TGF- $\beta$  in vitro. (4, 33, 38 39, 40)

### ACTIVIDADES IN VITRO

Los efectos de crecimiento de TGF- $\beta$  en el cartilago son complejos, igualmente son los resultados obtenidos en algunos casos. Esta información puede ser reflejo de los diferentes métodos, así como de las diferentes poblaciones celulares. En los condrocitos articulares tratados con TGF- $\beta$  por

más de tres días se observó estimular la proliferación de las células humanas en presencia de suero, pero este efecto es inconstante en la proliferación de los cultivos de condrocitos de conejo y bovino con o sin suero. La presencia de otros factores en el suero puede alterar la respuesta de TGF- $\beta$ . Por ejemplo los condrocitos de la placa epifisaria del conejo que proliferan con TGF- $\beta$  y suero, no lo hacen bajo condiciones *sin suero*. En un estudio con osteoblastos del cráneo de rata, TGF- $\beta$  estimula la proliferación celular, pero en otros animales se muestra inhibición (4, 38)

Como en otros factores de crecimiento, TGF- $\beta$  afecta tanto la proliferación y la expresión fenotípica *in vitro* de las células del hueso y cartilago. En los condrocitos articulares, TGF- $\beta$  ha demostrado incrementar la síntesis de la matriz extracelular sin presencia de suero, esto se nota por el aumento en la incorporación de prolina en la colágena, además de la incorporación de glucosamina y sulfato en los glucosaminoglucanos. Otros reportes muestran lo contrario, se ve inhibida la síntesis de colágena y la incorporación de sulfatos en los condrocitos al ser tratados con TGF- $\beta$  y suero. Parece ser que el suero agrega otros factores que puede modular la respuesta de TGF- $\beta$ . (29, 33)

TGF- $\beta$  puede limitar la maduración de los condrocitos de la placa epifisaria del conejo y rata en su etapa hipertrófica. Cuando estos condrocitos son cultivados, se diferencian espontáneamente al fenotipo hipertrófico, caracterizado por el aumento de colágena, metaloproteasas y su calcificación. Esta diferenciación fue inhibida por el tratamiento con TGF- $\beta$ . (12, 38)

En los osteoblastos, los efectos de TGF- $\beta$  en la expresión del fenotipo varía según el linaje celular. En algunas, por ejemplo, inhibe la actividad de la fosfatasa alcalina y la síntesis de osteocalcina, en otras sucedo lo contrario.

(28)

Tabla 5. Efecto de TGF- $\beta$  sobre las células óseas *in vitro*

TIPO DE CÉLULAS	PROLIFERACIÓN			SÍNTESIS DE MATRIZ	
	+	-	X	+	-
Condrocitos			X	+	-
Osteoblastos	+				

(+) aumenta; (-) disminuye; (x) no tiene efecto

### EFFECTOS DE TGF- $\beta$ IN VIVO

Estudios en que TGF- $\beta$  se aplica en la superficie del periostio de huesos largos o parietales en roedores, se ha demostrado que estimula la formación ósea. Dosis de 1 a 5 microg de TGF- $\beta$  al día, entre 5 y 12 días, se observa formación ósea sin apariencia cartilaginosa. Huesos largos como el fémur, se han tratado con 200 ng de TGF- $\beta$  diariamente, siendo evidente la formación ósea y cartilaginosa a los 4 días. TGF- $\beta$ 1 también ha demostrado éxito en la reparación de grandes defectos óseos en el cráneo del conejo, acelerando la osteoinducción. En los estudios anteriores no queda claro si TGF- $\beta$  provoca una respuesta proliferativa de los osteoblastos y condrocitos o una inducción a la diferenciación de las células mesenquimatosas. Por la incapacidad de TGF- $\beta$  para inducir la formación de hueso o cartílago en un sitio ectópico, lo más seguro es que sólo tenga un efecto proliferativo. Se observó sólo en un estudio que TGF- $\beta$  estimula la formación de nuevo cartílago, y parece ser que se debió a la dosis y/o el sitio anatómico de administración. (33, 38)

En resumen, los efectos de TGF- $\beta$  en condrocitos y osteoblastos son variados, con resultados contradictorios entre un estudio y otro. En muchos casos la presencia de suero que contiene otros factores de crecimiento altera significativamente los efectos de TGF- $\beta$  en los estudios *in vitro*. Los estudios

in vivo indican que TGF- $\beta$  promueve la formación ósea. Esto no parece ser por una diferenciación osteogénica de las células progenitoras, si no por un efecto estimulador en la síntesis de la matriz extracelular y/o por un efecto en la proliferación celular. (6, 40)

Los efectos de TGF- $\beta$  en la diferenciación celular ósea es controversial. La producción de colágena puede ser estimulada por TGF- $\beta$ , pero la actividad de la fosfatasa alcalina es generalmente disminuida y por lo tanto, también la mineralización. (6, 12, 29)

Los datos in vivo sobre la capacidad de TGF- $\beta$  para estimular la formación de hueso es muy prometedora. TGF- $\beta$  junto con BMP son probablemente los candidatos más realistas para ser usados en la estimulación de la reparación ósea (41 30)

## PROTEÍNA ÓSEA MORFOGENÉTICA (BMP)

### DISPONIBILIDAD EN HUESO

La purificación y expresión de BMP en el hueso del adulto se ha reportado varias veces. BMP-2 también ha sido localizada inmunológicamente en los osteoblastos del sitio de fractura. Similarmente el RNAm de BMP-4 fue expresado transitoriamente en las células osteoprogenitoras cercanas a la fractura (5, 26, 36, 38)

### ESTUDOS IN VITRO CON BMP

En varios reportes BMP demuestra promover el crecimiento de cartílago y la diferenciación de las células osteoprogenitoras. También aumenta la incorporación de sulfatos en los proteoglicanos y la expresión del RNAm de

la colágena tipo II en los condrocitos articulares. En estos estudios, BMP-3 y 4 también tienen efecto proliferativo en los cultivos de condrocitos articulares y en la síntesis de proteoglicanos (38)

El efecto estimulador de BMP sobre el fenotipo de los osteoblastos está bien documentado por estudios in vitro. BMP-2,3,4 y 7 han demostrado estimular la actividad de la fosfatasa alcalina y la síntesis de colágeno. En algunos osteoblastos de humano y rata, BMP-7 estimula la proliferación celular. BMP-2 también ha sido probada en células osteoprogenitoras del estroma medular óseo, que no expresan osteocalcina naturalmente, pero en presencia de este factor induce la expresión del RNAm y la síntesis de la proteína osteocalcina. Además estimula la actividad de la fosfatasa alcalina. Lo anterior sugiere que BMP-2 induce el fenotipo osteoblastico. (3, 7, 26)

Tabla 6 Efecto de BMP sobre las células óseas in vitro

TIPO DE CÉLULAS	PROLIFERACIÓN	SÍNTESIS DE MATRIZ
Condrocitos	+ x	+
Osteoblastos	+	+

(+) aumenta; (-) disminuye; (x) no tiene efecto

### ACTIVIDADES DE BMP IN VIVO

BMP induce la nueva formación ósea cuando se coloca en un sitio ectópico (no óseo), esto lo han demostrado numerosos estudios, que también lo sugieren como un valioso agente terapéutico en su forma recombinante, para la regeneración de daños óseos (3, 26, 36)

BMP-2 recombinante humano (rhBMP-2) ha demostrado ser efectivo en la reparación ósea del fémur de ovejas. En este estudio se probó la fuerza mecánica 3 meses después de la fractura. Los individuos tratados con

rhBMP-2 mostraron una fuerza mecánica similar a el fémur contralateral no operado, y una mejor condición en comparación con los defectos tratados con aloinjerto. En otro estudio similarmente al anterior, pero en fémur de ratas, rhBMP-2 también reparó grandes defectos óseos, mostrando una unión estable en los fragmentos. (3, 7, 10)

En un gran defecto óseo en la mandíbula de perros, BMP-2 induce la unión del defecto, verificandose histologica y radiograficamente. Se estimó una fuerza mecánica del 27% en comparación con la región no operada a los 6 meses de la injuria, esperando una mayor mejoría con el tiempo. BMP-7 recombinante también a mostrado reparar defectos óseos en conejos y perros, mostrando una fuerza mecánica comparable al hueso intacto. Otros estudios han señalado a los purificados parciales de BMP como agentes terapéuticos para la regeneración de varios defectos óseos en animales. (3, 7, 26)

BMP es el único factor de crecimiento conocido que es capaz de estimular la diferenciación de la células mesenquimatosas primitivas en condroblastos y osteoblastos. Por lo mismo, estas proteínas se involucran en el mantenimiento y diferenciación de las poblaciones celulares óseas. (15, 26, 28, 41)

Los vehiculos funcionales de BMP son la matriz de colágena, la matriz ósea desmineralizada y varias matrices sintéticas de polisacaridos. La función de los vehiculos es la de inmovilizar la proteína en el sito el tiempo suficiente para permitir que ocurra la inducción ósea. Los estudios in vivo se han enfocado principalmente en estimular la reparación de defectos óseos, que en otros casos no sanarían por sí solos. (29)

Aunque el mecanismo celular por el que BMP estimula la inducción ósea es

comprendido vagamente, esta propiedad característica promete ser usada en más situaciones clínicas que otros factores de crecimiento

## EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE EL METABOLISMO DE LOS OSTEÓBLASTOS.

Los efectos de los factores de crecimiento sobre los osteoblastos son observados con base en el metabolismo celular y la quimiotaxis. Los efectos metabólicos son evaluados al medir el índice de proliferación en base a la síntesis de DNA. La diferenciación es evaluada por la actividad de la fosfatasa alcalina y la síntesis de colágena. *El estímulo de la respuesta quimiotáctica se observa por la migración celular en cámaras especiales. (28, 29)*

La proliferación es una actividad metabólica que se considera característica de las células osteoblasticas poco diferenciadas con el fin de obtener suficiente cantidad de células para la producción de componentes de la matriz ósea. Esto ocurre en las fases tempranas de la reparación. *Se ha visto que 100 ng/mL de TGF- $\beta$  es el mejor agente sencillo que estimula la proliferación. TGF- $\beta$  en combinación PDGF-BB es la mejor combinación doble para estimular la síntesis de DNA en un 250 % más, pero al combinar EGF, TGF- $\beta$  y PDGF-BB se incrementa la síntesis de DNA aún más. Este gran efecto sinérgico es fisiológicamente interesante por el hecho de que las plaquetas contienen estos tres factores de crecimiento. En cualquier lesión ósea se forma un coágulo, que al desintegrarse, las plaquetas liberarán estos factores de crecimiento en el medio local, provocando una alta actividad*

proliferativa en los osteoblastos que se involucran en la lesión del hueso. (28, 29, 37)

Los osteoblastos muestran una alta diferenciación cuando se presenta la actividad de la fosfatasa alcalina. Esta enzima cataliza un proceso químico en el inicio y mantenimiento del proceso de mineralización en las últimas etapas de la reparación ósea. La combinación de TGF- $\beta$  y PDGF tiene un efecto sinérgico en la diferenciación osteoblástica. Pero la combinación de TGF- $\beta$  con BMP muestran el mayor efecto estimulador en la actividad de la fosfatasa alcalina (15, 29)

## CAPÍTULO 5

### APLICACIONES CLÍNICAS EXPERIMENTALES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN MODELOS ANIMALES.

#### POSIBLES APLICACIONES CLÍNICAS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO.

Los factores de crecimiento, en especial TGF- $\beta$  y BMP han demostrado su potente actividad estimuladora en la reparación y formación ósea. El mayor problema para el uso clínico de estos factores es el uso del apropiado sistema de entrega que asegure una *suficiente actividad biológica para los efectos óptimos en la formación ósea*. BMP tiene poca actividad biológica en solución, por lo que necesita un vehículo adecuado. La matriz ósea desmineralizada, la matriz de colágena, la hidroxiapatita y varias matrices de polisacáridos son algunos de los mejores vehículos conocidos para BMP. (29-37)

La capacidad inductora de las BMPs hace de este grupo el ideal para el llenado de *grandes defectos óseos, por ejemplo en cavidades grandes después de resecciones tumorales o para facilitar la reparación ósea en pseudoartrosis o fracturas complicadas de huesos largos, donde la pérdida ósea puede comprometer la sanación ósea normal*. Para este propósito, BMP puede ser usado con un vehículo adecuado o con un material de injerto biológico o no biológico si se desea una estabilidad mecánica inicial. Los injertos óseos autógenos y alogénicos son *ampliamente usados en la cirugía*

ortopédica. El uso de hueso autólogo tiene varias desventajas que incluyen dolor posoperatorio adicional, incomodidad a largo plazo del sitio donador, fuentes y cantidades limitadas de hueso y tiempo operatorio prolongado. Con el uso de injertos óseo alogénicos, existe el riesgo de infección. En un futuro, el uso de injertos óseos probablemente se disminuirá considerablemente con el uso de factores de crecimiento. Experimentos en animales han demostrado que BMP puede formar hueso en los mismos casos en que se necesitaría un injerto óseo autólogo. (7, 10, 26)

Actualmente sólo existen datos de experimentos preclínicos de los factores de crecimiento usados en animales. Sin embargo no se conoce aún o no hay buenos resultados de estudios en animales que puedan ser traspolados a humanos con igual éxito

Pocos estudios han indicado posibles efectos secundarios a corto plazo por la estimulación local con factores de crecimiento. La reparación de defectos óseos en perros ha demostrado la formación heterotópica de hueso y la formación de quistes óseos cuando se utilizan altas dosis de BMP-2. Los factores de crecimiento también podrían tener efectos colaterales a largo plazo que podrían presentarse después de décadas en un futuro. Las BMPs se presentan en algunas células tumorales lo que sugiere que el tratamiento con BMP podría ser carcinogénico. A la fecha, no se conocen informes que se relacionen con este problema. (3, 7, 10, 29)

El interés comercial por el uso de factores de crecimiento en ortopedia se enfoca actualmente en las BMPs. Dos compañías, Genetics Institute (que desarrolló y ahora promueve BMP-2) y Creative Biomolecules (que promueve BMP-7, también llamada Proteína Osteogénica-1) han iniciado ensayos clínicos para el uso de BMPs en la reparación de defectos y la fusión espinal. Los primeros datos de estas pruebas clínicas se presentarán

probablemente en un futuro cercano y al parecer, las BMPs estarán comercialmente disponibles en pocos años. Los factores de crecimiento *abrirán una nueva gama* en modalidad de tratamientos, que capacitarán al cirujano para mejorar la formación y reparación ósea en situaciones donde la capacidad natural de reparación del hueso sería inadecuada para obtener buenos resultados clínicos. Se espera que en la siguiente década se definan las indicaciones para estas nuevas herramientas clínicas en la cirugía ortopédica (29, 37)

A continuación se describen algunos estudios enfocados a aplicaciones clínicas de los factores de crecimiento en modelos animales, que proporcionarán una idea más exacta de como se estudian estas sustancias

## LA PROTEÍNA ÓSEA MORFOGENÉTICA-2 RECOMBINANTE HUMANA (rhBMP-2) ESTIMULA LA FORMACIÓN ÓSEA ALREDEDOR DE IMPLANTES DENTALES ENDOÓSEOS.

El éxito en la colocación de implantes endoóseos requiere que el implante *permanezca* estable en el hueso alveolar. En ciertos casos el implante puede ser estabilizado en el hueso nativo, pero algunas partes del implante no son cubiertas por hueso. Esto ocurre frecuentemente cuando se colocan implantes en sitios de extracciones donde ha ocurrido resorción ósea extensa y el proceso alveolar no es suficiente para cubrir completamente el implante. En estos casos el cirujano *emplea normalmente un procedimiento* que estimule la formación ósea. Estos procedimientos incluyen generalmente un tratamiento con injerto óseo y/o membrana (9, 17)

Un estudio realizado por Cochran y col. comprobó que la proteína ósea morfogenética-2 recombinante humana (rhBMP-2), utilizando como vehículo esponja de colágeno estimula la formación de hueso alrededor de implantes dentales endoóseos colocados en diferentes defectos óseos en la mandíbula de perros

Se colocaron 48 implantes, de los cuales en 24 se colocó también la colágena que contenía rhBMP-2, en los 24 restantes sólo se colocó el vehículo de colágena. Algunos sitios de los implantes fueron cubiertos con una membrana no reabsorbible de polimetilfluoruroetileno. Se realizó un análisis histológico después de 4 y 12 semanas. El área de nueva formación ósea fue calculada basándose en el porcentaje de contacto entre el hueso y el implante y por el porcentaje de hueso que cubrió el defecto óseo.

Los resultados mostraron que la adición de rhBMP-2 produjo grandes cantidades de hueso que cubrió el defecto óseo, además de un mayor contacto en toda la superficie rugosa del implante. Los sitios tratados con membrana a las 4 semanas mostró poca formación ósea y a las 12 semanas no se observó alguna diferencia entre los sitios tratados o no tratados con membrana. En algunas de las muestras tratadas con rhBMP-2 se encontró mayor cantidad de hueso nuevo a nivel coronal de las membranas que los sitios no tratados con rhBMP-2. (9)

Estos datos demuestran que rhBMP puede ser usado para estimular la formación ósea alrededor de los implantes dentales en defectos óseos, que se pudiera llegar a pensar, ser sitios inadecuados para que el implante sea cubierto adecuadamente.

## EN LA OSTEOGÉNESIS POR DISTRACCIÓN DE LA MANDÍBULA SE PRESENTAN LOS FACTORES DE CRECIMIENTO.

La osteogénesis por distracción consiste en la elongación de los huesos por medio de dispositivos con tornillos que separan los fragmentos óseos. Este método es útil para generar, en ocasiones, gran cantidad de hueso en los casos indicados, principalmente en la población infantil. (13)

En el estudio realizado por Farhadieh y col., demuestran la importancia biológica de la cascada de los factores de crecimiento presentes en la distracción de la mandíbula en un modelo ovino.

La reparación de una fractura es principalmente por osificación endocondral, pero también hay regiones con osificación intramembranosa. La formación ósea por distracción es principalmente una osificación intramembranosa. La base biológica de la diferencia de estos dos procesos todavía no se comprende bien. (13, 15, 38)

En 4 grupos de ovinos se usaron varios rangos de distracción (1, 2, 3 y 4 mm / día), usando un distractor en el ángulo de la mandíbula. Las mandíbulas fueron elongadas 24 mm para luego ser inmovilizadas por un periodo de 5 semanas y posteriormente, sacrificar a los animales. Las muestras mandibulares se sometieron a estudios *inmunohistológicos* para buscar la presencia de TGF- $\beta$ , IGF-I y bFGF.

En los resultados se obtuvo que los 4 grupos presentaron los factores de crecimiento estudiados. Interesantemente resultó que, los grupos con una

distracción más rápida, mostraron una presencia más fuerte de los factores de crecimiento.

En la reparación de una fractura, se ha visto que, la localización de TGF $\beta$  corresponde a la precisa región de la osificación intramembranosa. En la osificación observada en la distracción, TGF $\beta$  tiene una difusa presencia por toda la región alargada, por ser toda esta zona de osificación intramembranosa (13)

En la fractura, IGF-I y bFGF promueven la proliferación y diferenciación de los osteoblastos a partir de las células precursoras. La intensa presencia de IGF-I y bFGF en la región distraída se puede relacionar a la proliferación osteoblástica a partir de células mesenquimatosas. (18, 25, 29)

En este estudio se demuestra la importante relación entre los factores de crecimiento y la osteogénesis por distracción, que es en sí una tensión mecánica inductora de nueva formación ósea

#### **ESTIMULACIÓN DE LA REPARACIÓN DE LA FRACTURA POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS BÁSICO (FGF-2) EN RATAS NORMALES Y DIABÉTICAS.**

bFGF tiene un efecto estimulador principalmente en la proliferación de las células mesenquimatosas, su actividad mitógena se observa más en los fibroblastos y preosteoblastos que en los osteoblastos diferenciados. (18, 24, 38)

En este estudio se compara como la aplicación de bFGF en el sitio de fractura puede facilitar el proceso reparativo de la fractura en ratas diabéticas

y ratas normales. Las ratas diabéticas tienen disminuida su capacidad para regenerar hueso en la fractura.

La fractura se realizó a la mitad de la fibula izquierda y se administró bFGF en concentraciones de 0, 0.4, 2, 10 y 50 microg en un gel de fibrina como vehículo. Fue inyectada inmediatamente en el sitio de fractura y se cerró la herida.

Se midió el volumen del callo y contenido mineral del callo óseo. Se realizó también un análisis radiográfico e histológico en busca de bFGF endógeno en los dos grupos. Finalmente se midió la fuerza biomecánica de los fragmentos óseos.

#### EFFECTOS DE rhFGF EN LA REPARACIÓN DE LAS FRACTURAS EN RATAS NORMALES.

En las ratas normales con tratamiento de rhFGF se observó durante la primera semana tejido de granulación con contenido de células inflamatorias y posteriormente fue remplazado por tejido cartilaginoso. Al mismo tiempo se presentó osificación intramembranosa bajo el periostio. A las 3 semanas de la fractura el tejido cartilaginoso comenzó a calcificarse por medio de una osificación endocondral.

Cuando se aplicó inmediatamente 50 microg de rhFGF en el sitio de fractura, se aceleró grandemente la formación del callo. A la semana se observó un gran callo con condrogénesis y osificación periosteal en comparación con el grupo control. A las tres semanas hubo formación de un puente óseo generado por la osificación endocondral en el sitio de fractura que no se observó en el grupo control.

La aplicación de rhFGF incrementó el volumen del callo 2.1 veces más, y el contenido mineral del callo óseo aumentó 1.8 veces más que la rata control.

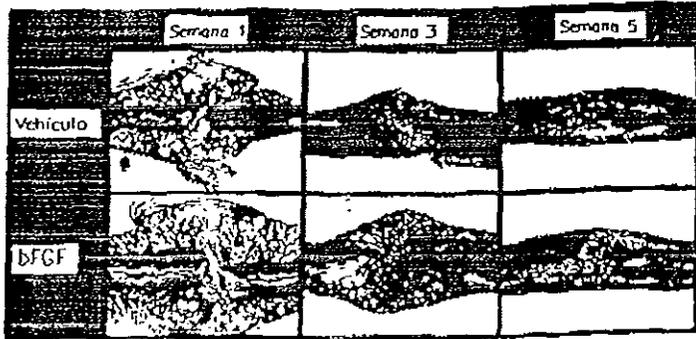


Figura 11 . Características histológicas del sitio de fractura en ratas normales con la administración de FGF o vehículo sólo

## EFFECTOS DE rhFGF EN LA REPARACIÓN DE LA FRACTURA EN RATAS DIABÉTICAS

La reparación de fracturas en ratas diabéticas fue menor en comparación a las ratas normales. El tamaño del callo óseo fue mucho menor en 1 y 3 semanas y a la semana 5 ni siquiera se hubo un tejido fibroso en la fractura.

La aplicación de 50 microg de rhFGF en el sitio de fractura estimuló el proceso reparativo en grado similar a las ratas normales, produciendo un gran callo óseo a la semana 1 y 3, en la semana 5 el callo se había remodelado como se observó en las ratas normales. El tratamiento con bFGF aumentó significativamente las propiedades mecánicas de la fíbula

fracturada en las ratas diabéticas similarmente a las ratas normales no tratadas. (24)

El volumen del callo y el contenido mineral óseo de las ratas diabéticas sin tratamiento de rhFGF fue cerca de una tercera parte en comparación con las ratas control. rhFGF estimuló importantemente el proceso reparativo de la fractura en las ratas diabéticas, principalmente por la producción de un gran callo de fractura en las etapas tempranas de la reparación. (24, 29, 38)

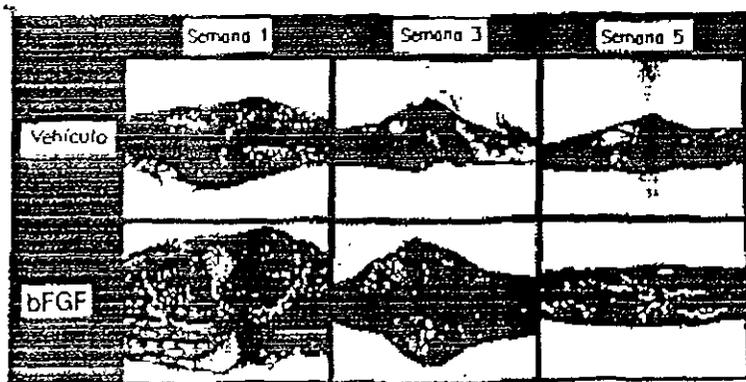


Figura 12. Características histológicas del sitio de fractura en ratas diabéticas con la administración de FGF o vehículo sólo.

La inmunohistoquímica de bFGF endógeno en el sitio de fractura demostró que en las ratas normales este factor estuvo ampliamente distribuido especialmente en el callo y periostio en la semana 1 y 3, mientras que en las ratas diabéticas se observó mucho menor cantidad de bFGF en toda el área. El tratamiento con insulina normalizó los niveles de glucosa sanguínea, restaurando la inmunotinción para bFGF en el área de fractura. (24)

Con este estudio se demostró que la aplicación local de rhFGF en el sitio de fractura estimuló la formación del callo y facilitó la reparación de la fractura en ratas normales. Las ratas diabéticas recobraron su capacidad regeneradora en grado similar a las ratas normales cuando se les aplicó localmente rhFGF en la fractura o cuando se les aplicó insulina para normalizar los niveles de glucosa.

bFGF  
( $\mu$ g)

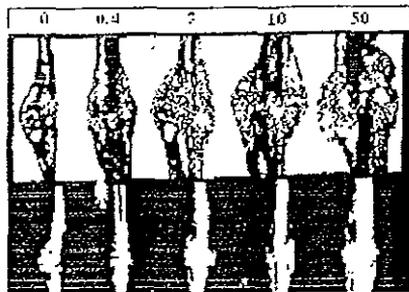


Figura 13 Características histológicas y radiológicas de la respuesta de FGF en la reparación de una fractura después de 3 semanas en ratas normales

bFGF  
( $\mu$ g)

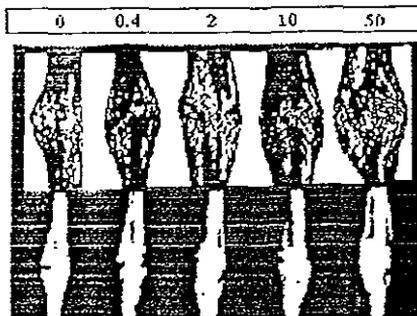


Figura 14. Características histológicas y radiológicas de la respuesta de FGF en la reparación de una fractura después de 3 semanas en ratas diabéticas

## CONCLUSIONES

Los factores de crecimiento aumentan la replicación celular y estimulan la diferenciación de las funciones metabólicas de las células óseas. Ejercen sus efectos a través de receptores específicos de membrana en la célula blanco o de manera autócrina, es decir estimulándose una célula a sí misma. Esto conduce a una cascada de eventos intracelulares que afectan la expresión genética manifestándose en diferentes funciones metabólicas como la división celular, diferenciación celular y la síntesis de proteínas.

El comportamiento de las células óseas depende del factor de crecimiento o la combinación de éstos que afecte a estas células. TGF- $\beta$  existe en altas cantidades en el hueso y plaquetas a comparación de otros tejidos TGF- $\beta$  es probablemente el más potente regulador multifuncional en el metabolismo celular del hueso, su principal acción es la de estimular la proliferación de células osteoprogenitoras y ser un agente quimiotáctico para los osteoblastos. Las BMPs son el único factor de crecimiento conocido que estimulan las células mesenquimatosas primitivas para diferenciarlas en osteoblastos y condroblastos. PDGF es un potente estimulador tanto en la proliferación celular como en la síntesis de matriz osteoide, además, la isoforma PDGF-BB es uno de los más fuertes agentes quimiotácticos para los osteoblastos. IGF se encuentra en la matriz ósea, pero especialmente IGF-II esta en mayor concentración. IGF estimula principalmente la proliferación de osteoblastos indiferenciados. FGF también esta presente en la matriz osteoide y es secretado por los osteoblastos. FGF básico esta en concentraciones diez veces más que FGF ácido FGF es principalmente mitógeno en las células óseas normales, además de fomentar la angiogénesis en la lesión

Los estudios sugieren que los *factores de crecimiento* podrán ser usados en casos clínicos para estimular la nueva formación ósea usando dosis correctas y métodos de aplicación adecuados. Así también, se investiga para conocer las posibles combinaciones de factores de crecimiento para tener un efecto sinérgico en las diferentes funciones metabólicas de las células óseas.

*La revisión anterior nos da una idea de la gran gama de procesos celulares y moleculares que se llevan a cabo conjuntamente para reparar una lesión ósea.*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Andrew, J. G. PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR EXPRESSION IN NORMALLY HEALING HUMAN FRACTURES. *Bone*. 16(4):455-460, 1995.
2. Baulieu, Etienne-Emile. HORMONES. Ed Hermann Publishers in Arts and Science. France, 1990.
3. Bessho, K. COMPARASION OF RECOMBINANT AND PURIFIED HUMAN BONE MORPHOGENETIC PROTEIN. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 37.2-5, 1999.
4. Bonewald, L. F. ROLE OF ACTIVE AND LATENT TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA IN BONE FORMATION. *Journal of Cellular Biochemistry*. 55:350-357, 1994.
5. Bostroom, Mathias. EXPRESSION OF BONE MORPHOGENETIC PROTEINS IN FRACTURE HEALING. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 355 Supplement:S116-S123, 1998.
6. Bostroom, Mathias. TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA IN FRACTURE REPAIR *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 355 Supplement:S124-S131, 1998.
7. Boyne, Philip. ANIMAL STUDIES OF THE APPLICATION OF rhBMP-2 IN MAXILLOFACIAL RECONSTRUCTION. *Bone*. 19(1)Supplement, 83S-92S, 1996.

8. Centrella, Michael. PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR ENHANCES DEOXYRIBONUCLEIC ACID AND COLLAGEN SYNTHESIS IN OSTEOBLAST-ENRICHED CULTURES FROM FETAL RAT PARIETAL BONE. *Endocrinology*. 125:13-19, 1989.
  
9. Cochran, D. L. RECOMBINANT HUMAN BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 STIMULATION OF BONE FORMATION AROUND ENDOSSEOUS DENTAL IMPLANTS. *Journal of Periodontology*. 70:139-50, 1999
  
10. Cook, Stephen D. RECOMBINANT HUMAN BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-7 INDUCES HEALING IN A CANINE LONG-BONE SEGMENTAL DEFECT MODEL. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 301:302-312, 1994.
  
11. Cornell, Charles N. NEWEST FACTORS IN FRACTURE HEALING. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 227:297-311, 1992.
  
12. Critchlow, M. A. THE EFFECT OF EXOGENOUS TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$ 2 ON HEALING FRACTURES IN THE RABBIT. *Bone*. 16(5) 521-527, 1995
  
13. Darius Farhadieh, Ross. THE ROLE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA, INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I, AND BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN DISTRACTION OSTEOGENESIS OF MANDIBLE. *The Journal of Craniofacial Surgery*. 10:80-86, 1999.
  
14. Doan, Nghiem. IN VITRO EFFECTS OF THERAPEUTIC ULTRASOUND ON CELL PROLIFERATION, PROTEIN SYNTHESIS, AND CYTOKINE PRODUCTION BY HUMAN FIBROBLAST, OSTEOBLAST, AND MONOCYTES. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 57:409-419, 1999
  
15. Einhorn, Thomas A. THE CELL AND MOLECULAR BIOLOGY OF

FRACTURE HEALING. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 355 Supplement S7-S21, 1998.

16. Elima, Kati. OSTEOINDUCTIVE PROTEINS. *Annals of Medicine*. 25:395-402, 1993.

17. Giannobile, W V. PERIODONTAL TISSUE ENGINEERING BY GROWTH FACTORS. *Bone* 19(1)Supplement:23S-37S, 1996.

18. Glowacki, Julie. ANGIOGENESIS IN FRACTURE REPAIR. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 355 Supplement:S82-S89, 1998.

19. Greenhalgh, David. THE ROLE OF GROWTH FACTORS IN WOUND HEALING. *The Journal of Trauma: Injury, Infections, and Critical Care*. 41(1):159-165, 1996.

20. Greenspan, Irma S. ENDOCRINOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA. 3a edición. Ed Manual Moderno. México, 1993. Pp 331-335.

21. Habenicht, Andreas. GROWTH FACTORS, DIFFERENTIATION FACTORS AND CITOKINES. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 1990. Pp. 476.

22. Herrera, Emilio. ELEMENTOS DE BIOQUÍMICA. Ed Interamericana McGraw-Hill México, 1993. Pp 1045.

23. Hock Janet M. PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR ENHANCES BONE CELL REPLICATION, BUT NOT DIFFERENTIATED FUNCTION OF OSTEOBLAST. *Endocrinology* 134:1423-1428, 1994.

24. Kawaguchi, Hiroshi. STIMULATION OF FRACTURE REPAIR BY RECOMBINANT HUMAN BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN NORMAL AND STREPTOZOTOCIN-DIABETIC RATS. *Endocrinology*.

135:774-781, 1994.

25. Kabayashi, Kazuo. THE EFFECT OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 ON CRANIOFACIAL BONE HEALING. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 97(6): 1129-1135, 1996.

26. Lane, Joseph M. BONE MARROW AND RECOMBINANT HUMAN BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 IN OSSEOUS REPAIR. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 361:216-227, 1999.

27. Lehninger, Albert BIOQUÍMICA. 2a edición. Ed Omega. Barcelona, 1982. Pp 1095

28. Lind, Martin. GROWTH FACTORS: POSSIBLE NEW CLINICAL TOOLS. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 67(4):407-417, 1996.

29. Lind, Martin. GROWTH FACTOR STIMULATION OF BONE HEALING. *Acta Orthopaedica Scandinavica. Supplementum* 283(69):1-32, 1998.

30. Linkhart, Thomas. GROWTH FACTORS FOR BONE GROWTH AND REPAIR: IGF, TGF- $\beta$  AND BMP. *Bone*. 19(1)Supplement: 1S-12S, 1996.

31. Nilsen- Hamilton, Marit GROWTH FACTORS AND DEVELOPMENT. Academic Press. San Diego California, 1990. Pp. 347.

32. Ninomiya, Jesús G. FISILOGÍA HUMANA, ENDOCRINOLOGÍA Y METABOLISMO. Ed Manual Moderno México, 1995. Pp 101-113.

33. Noda, Masaki. IN VIVO STIMULATION OF BONE FORMATION BY TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA. *Endocrinology*. 124:2991-2994, 1989

- 34 Radomsky, Michael. POTENTIAL ROLE OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN ENHANCEMENT OF FRACTURE HEALING. Clinical Orthopaedics and Related Research. 355 Supplement: S283-S293, 1998.
35. Rawn, David. BIOQUÍMICA. Ed Interamericana McGraw-Hill. Madrid, 1989. Pp 975 - 977
36. Reddi A H. INITIATION OF FRACTURE REPAIR BY BONE MORPHOGENETIC PROTEINS. Clinical Orthopaedics and Related Research. 355 Supplement: S66-S72, 1998.
- 37 Riley, Edward. BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2, BIOLOGY AND APPLICATIONS. Clinical Orthopaedics and Related Research. 324:39-46, 1996
38. Rosen, Vicki. THE CELLULAR AND MOLECULAR BASIS OF BONE FORMATION AND REPAIR Springer / RG Landes. Texas, 1995.
39. Sara, Vicki GROWTH FACTORS, FROM GENES TO CLINICAL APLICATION. Raven Press New York, 1990. Pp 265.
40. Sherris, David A. MANDIBULAR RESCONSTRUCTION WITH TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA1. The Laryngoscope. 108:368-372, 1998.
41. Solheim, E. GROWTH FACTORS IN BONE International Orthopaedics. 22:410-416, 1998
42. Tortora, Gerard J. PRINCIPIOS DE ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA. 5a edición Ed Harla México, 1991 Pp 145-163.
43. Tresguerres Fernández, Jesús A. FISIOLÓGÍA HUMANA. Ed

Interamericana McGraw-Hill. Madrid, 1992. Pp 1199.

44. West, John B. BASES FISIOLÓGICAS DE LA PRÁCTICA MÉDICA. 11a edición. Ed Médica Panamericana. Buenos Aires, 1990. Pp 1531.

45. Willson, Jean. WILLIAMS TEXTBOOK OF ENDOCRINOLOGY. 9th edition. Ed W. B. Saunders. Philadelphia, 1998. Pp 1211-1446.