



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Evaluación clínica y radiográfica de la
osteogénesis en perros (*canis familiaris*)
utilizando aloinjertos desmineralizados
laminares tratados con TGF- β 1.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A N :

**TERESA YURIDIA CHEHIN PÉREZ
DAVID CHAIRES GRIJALVA**

**ASESOR: M. en C. ENRIQUE FLORES GASCA
COASESORES: Dr. MIGUEL ANGEL CARMONA MEDERO
MVZ. MARIA DEL ROCÍO MORALES MÉNDEZ**



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.

DEDICO MI TRABAJO:

A DIOS

***QUE ES EL MOTOR Y LA MÁS GRANDE INSPIRACIÓN
PARA CADA UNO DE MIS LOGROS; EL MEJOR AMIGO;
MI CONSEJERO MÁS CERTERO, GRACIAS POR NO
SOLTARME NUNCA DE LA MANO, POR ENSEÑARME
QUE DE LOS ERRORES TAMBIÉN SE APRENDE Y QUE
NUNCA HAY QUE PERDER LA FÉ, POR MOSTRARME
SIEMPRE EL MEJOR DE LOS CAMINOS, POR DARME
UNO DE LOS MÁS PRECIADOS TESOROS: LA SALUD;
PERO SOBRE TODO GRACIAS POR DERRAMAR EN MÍ
LA MARAVILLOSA FUERZA DE... LA VIDA!***

A MI AMOR, MI COMPLICE

EL QUE ME HA ENSEÑADO EL ENORME SIGNIFICADO DE LA PALABRA AMAR; QUE ES UN SENTIMIENTO MÚTUO EL CUAL SE DEMUESTRA CON HECHOS Y NO CON PALABRAS, ME ENSEÑAS A ANTEPONER LA SIEMPRE LA VERDAD HACIÉNDOME SABER LO INCONDICIONAL DE LA AMISTAD OFRECIÉNDOME SIEMPRE UN HOMBRO PARA LLORAR, PERO TAMBIÉN UNA MANO FIRME PARA LEVANTARME CUANDO CAIGO. CONTIGO HE APRENDIDO QUE LA FELICIDAD SÓLO ESTÁ EN NUESTRAS MANOS; QUE EL RESPETO DEL UNO POR EL OTRO SE CULTIVA PARA COSECHAR JUNTOS APRENDIZAJES Y ADMIRACIONES DEL UNO POR EL OTRO; PARA QUE PARALELAMENTE CREZCA EL AMOR.

ME HAS HECHO COMPRENDER EL “TU A NADIE LE IMPORTAS” Y HACES QUE VEA LA VIDA COMO UN HERMOSO JUEGO, DONDE SIEMPRE HAY QUE REÍR Y DISFRUTAR, Y NO COMO UNA PESADA RUTINA; HACES QUE VEA MIS ERRORES Y TE MOLESTA QUE ELIJA MAL, MAS SE QUE LO HACES, PARA CRECER COMO COMPAÑERA, COMO PROFESIONISTA, COMO SER HUMANO...MAS SIN EMBARGO, TAMBIÉN APLAUDES MIS ACIERTOS Y RESALTAS MIS VIRTUDES. TE AMO ENRIQUE, PORQUE UN DÍA ME DIJISTE QUE YO PUEDO, QUE SÓLO ERA CUESTIÓN DE CREERMELO; ADMIRO AL HOMBRE DECIDIDO, PERSEVERANTE E INTELIGENTE, QUE APRENDE A DISFRUTAR Y COMPARTIR CADA MOMENTO DE SU VIDA, AL HOMBRE CREATIVO Y CON UN CORAZÓN DE ORO, QUE LES DEMUESTRA A TODOS, QUE EL HOMBRE NO VALE POR LO QUE TIENE, SINO POR SUS HECHOS Y LO QUE HA DEJADO. AMO A MI CONFIDENTE, QUE NUNCA LLORA PERO QUE SE BIEN DE SUS HERMOSOS SENTIMIENTOS ANTE LAS PALABRAS, MADRE, HERMANOS, HIJA Y SOBRINAS...QUE ADEMÁS DE AMARLOS PROFUNDAMENTE ESTÁN SOBRE TODAS LAS COSAS. AMO AL CABALLERO, AL QUE NO LE GUSTA PERDER Y QUE SIEMPRE ME ACONSEJA NO DEJARME DE NADIE, SER UNA MUJER, MAS NO UNA MUÑECA. GRACIAS PORQUE CON SÓLO MIRARME, SE CUANTO ME AMAS, GRACIAS POR SER SINCERO, ESPONTÁNEO NUNCA HIPÓCRITA. GRACIAS POR SER TÚ Y SER PARA MÍ, PERO MÁS AÚN, GRACIAS POR TU CONFIANZA, POR CREER EN MÍ!...

*-JUNTOS SIEMPRE, MANO SOBRE MANO-
TE AMO, MIGUEL ENRIQUE.*

A MI PADRE

*SER PADRE ES CONTAR CON:
EL EJEMPLO A SEGUIR
UN APOYO SÓLIDO
LA CONFIANZA DE UN SANTO
LA PERSEVERANCIA DE LOGRAR LLEGAR A LA META
FIJADA
LA INTEGRIDAD EN LOS HECHOS
LA CONGRUENCIA DEL PENSAR
LA INTELIGENCIA PARA SORTEAR TODOS LOS
OBSTÁCULOS
LA SENSIBILIDAD DE UN ABRAZO
EL CARÁCTER DE UN ¡NO!
LA FORTALEZA QUE NOS SALVAGUARDA
EL VALOR DE LA PALABRA EMPEÑADA
LA HUMILDAD DE SABERSE VULNERABLE
LA VIRTUD DEL SACRIFICIO
EL DON DE CREAR
EL OFICIO DE DAR ANTES QUE RECIBIR
SOÑAR PARA VIVIR
CREER PARA GOZAR
ESTAR PARA AMAR Y MORIR POR VOLUNTAD*

GRACIAS NENE.

A MI MADRE

***SER MADRE ES CONTAR CON:
LA TERNURA DE DIOS
EL ENTUSIASMO DE VIVIR
LA CONFIDENCIA DEL AMANTE ESPOSO
LA FIDELIDAD DE LA RELIGIÓN
LA DIGNIDAD DE LA SANGRE
LA HUMILDAD DE LA GRANDEZA
LA BELLEZA DE UNA FLOR
LA FUENTE DE LOS VALORES
EL APRECIO AL AMOR
LA FORTUNA DE LOS HIJOS Y LA BENDICION DEL
TODO PODEROSO***

GRACIAS MAMÁ.

*A LA UNAM
(FESC)*

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU”

*UN AGRADECIMIENTO MUY ESPECIAL A TODAS LAS
PERSONAS QUE CULTIVANDO EL VALOR DEL
CONOCIMIENTO, EL SERVICIO, LA SABIDURIA, LA
BONDAD, EL HONOR Y LA ESPERANZA EN LOS
MEXICANOS, HAN FORJADO CIUDADANOS DE
PRESTIGIO CON UNA FILOSOFÍA DE ATENCIÓN A LOS
PROBLEMAS QUE AQUEJAN A LOS MÁS
NECESITADOS; ME COMPROMETO A SEGUIR SU
IMBORRABLE EJEMPLO.*

*EN MEMORIA DE MI PAJARITO EL “BEBE”
BENDITO SEAS POR SER UNA PEQUEÑA LUZ EN MI CAMINO.*

*EN MEMORIA DE MIS PERROS
LOS LLEGUÉ A QUERER MUCHO... GRACIAS POR SER EL PRINCIPAL
INSTRUMENTO Y EL ALMA DE MI TRABAJO.*

AGRADEZCO MI TRABAJO:

A MI ASESOR

EL MAESTRO ENRIQUE FLORES GASCA, MUCHISIMAS GRACIAS POR SU TIEMPO, SUS ENSEÑANZAS, POR SU TOLERANCIA Y POR SUS CONSEJOS QUE TENDRÉ SIEMPRE MUY EN CUENTA.

A MIS COASESORES

EL DOCTOR MIGUEL ÁNGEL CARMONA MEDERO POR TODO SU TIEMPO, POR SU GRAN PACIENCIA, PERO SOBRE TODO POR EL INVALUABLE CONOCIMIENTO TRANSMITIDO, MIL GRACIAS!

A LA MVZ MARÍA DEL ROCÍO MORALES MÉNDEZ, GRACIAS POR TU AMISTAD Y POR ESE GESTO QUE TUVISTE CONMIGO QUE NUNCA OLVIDARÉ.

AL MAESTRO OSCAR PERALTA ZARAGOZA, QUE FUE EL ÚNICO, QUE DESDE LEJOS TUVO LA AMABILIDAD DE ORIENTARME Y AYUDARME CON LA INFORMACIÓN DEL TGF-B, INFINITAS GRACIAS!

**A LA POLICLINICA Y UNIDAD DE CIRUGÍA
YA QUE SIN EL APOYO BRINDADO NO HUBIESE REALIZADO MI SUEÑO.**

**A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MORELOS
POR LA APRECIABLE DONACIÓN DEL TGF-B.**

**AL CENTRO DE CONTROL CANINO DE CUAUTITLÁN IZCALLI
POR LA AMABLE DONACIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

**AL CENTRO CLÍNICO Y DIAGNÓSTICO MÉDICO VETERINARIO
POR EL APOYO CON LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS.**

**A PETS FOODS
POR LA DONACIÓN DEL ALIMENTO.**

A TI, GRACIAS.

TERESA CHEHIN

Dedico este trabajo a:

Mis padres:

Gracias por todo el apoyo incondicional brindado a lo largo de este camino, no tengo palabras para agradecer su paciencia y esfuerzo hacia mi y mis hermanas, y por que ese es el mejor regalo que me han podido dar, por que por ello he logrado alcanzar uno de tantos sueños.

Mi esposa

Gracias, por todos los gratos momentos que has compartido conmigo, por tu cariño y dedicación, por apoyarme en esos momentos adversos y sobre todo haberme dado ese tesoro tan hermoso.

Payo

Gracias pequeña, por tus travesuras, por tu alegría, por que todo eso es lo que me da fuerzas para seguir luchando y alcanzar mis metas.

Mis Hermanas

Gracias Paty y Mary. Por sopórtame como soy, por todo su apoyo y comprensión, por las peleas y todos los momentos tan lindos que hemos compartido. Pero sobretodo por que se que puedo seguir contando con ustedes.

Salvador Chávez

Gracias Elvis por todos los consejos y apoyo que me has brindado.

Miguel Servin y Azucena Campos

Gracias por todo el apoyo que me han brindado, y por haber creído en mi.

Mis amigos

Deyes, Abraham, Rene, Miriam, Carolina, Carlos, Toño, Miguel, Ivan, Uriel y a todos los que no mencione pero que de antemano se que es tan presentes. Gracias por todos esos momentos compartidos.

Teresa Yuridia

Gracias por tu apoyo y tiempo para que se realizara este trabajo.

Familia Serrato Chávez

Gracias por su apoyo en todo momento.

Mc. Enrique Flores

Gracias por todo el tiempo que nos brindo y por su asesoramiento durante el desarrollo de este trabajo.

La Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

DAVID CHAIRES

INDICE

1.0 RESUMEN	1
2.0 INTRODUCCIÓN	
2.1. <i>ANATOMIA Y FISIOLÓGIA DEL HUESO</i>	2
2.1.1. Osteogénesis.....	4
2.2. <i>PATOLOGÍAS ÓSEAS</i>	5
2.2.1. Tumores óseos.....	5
2.2.2. Enfermedades óseas	6
2.2.3. Fracturas óseas.....	8
2.3. <i>INJERTOS ÓSEOS</i>	12
2.3.1. Tipos de injertos.....	13
2.3.2. Funciones de los injertos óseos.....	13
2.3.3. Características de los injertos óseos.....	14
2.4. <i>CITOQUINAS</i>	17
2.4.1. Propiedades generales de las citoquinas.....	18
2.4.2. Categorías funcionales de las citoquinas.....	19
2.4.3. Receptores de las citoquinas y señalización	20
2.4.4. Factor de crecimiento transformante $\beta 1$	21
3.0 HIPÓTESIS	28
4.0 OBJETIVOS	
4.1. <i>OBJETIVO GENERAL</i>	28
4.2. <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	28
5.0 MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1. <i>MANEJO DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN</i>	29
5.2. <i>TRATAMIENTOS</i>	29
5.3. <i>OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS INJERTOS</i>	30
5.4. <i>PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO</i>	31
5.5. <i>EVALUACIÓN CLÍNICA</i>	32
5.6. <i>EVALUACIÓN SANGUÍNEA</i>	33
5.7. <i>EVALUACIÓN RADIOGRÁFICA</i>	33
5.8. <i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	35
6.0 RESULTADOS	
6.1. <i>RESULTADOS DE EVALUACIÓN CLÍNICA</i>	38
6.2. <i>RESULTADOS DE EVALUACIÓN SANGUÍNEA</i>	41
6.3. <i>RESULTADOS DE EVALUACIÓN RADIOGRÁFICA</i>	44
6.4. <i>PLACAS RADIOGRÁFICAS</i>	47
6.5. <i>RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	51
7.0 DISCUSIÓN	55
8.0 CONCLUSIONES	59
9.0 RECOMENDACION.....	59
10.0 BIBLIOGRAFÍA	60

1.0 RESUMEN

Durante el ejercicio profesional el médico veterinario se enfrenta a ciertas patologías del tejido óseo, las cuales no pueden ser corregidas o tratadas por procedimientos quirúrgicos ortopédicos convencionales; entre estas lesiones óseas (genéticas, congénitas o adquiridas), sobresalen aquéllas en las cuales existe una pérdida de material óseo (osteomielitis, fracturas conminutas o con pérdida de hueso, artrodesis, etc.) o donde se requiere para su tratamiento el uso de materiales que permitan optimizar la reparación del hueso .

Es aquí donde el uso de implantes e injertos y sus diversas técnicas de aplicación tienen un papel preponderante dentro de la ortopedia veterinaria, por lo que es necesaria la investigación de los diferentes tipos de injertos.

Para este trabajo de experimentación se utilizaron *aloinjertos* desmineralizados laminares, obtenidos de perros sanos (escápulas) los cuales fueron injertados en pacientes a los que se les realizó una osteotomía (1 cm.) en la tibia y la fractura fué estabilizada con la técnica de Fijación esquelética externa.

El experimento se conformó por tres grupos (n=4 cada grupo); al primer grupo (**Control**) sólo se le realizó la osteotomía, al segundo grupo (**Injerto**) se le practicó la osteotomía y se injerto el aloinjerto en el espacio interfragmentario, por último al tercer grupo (**TGF- β**) se le practicó la osteotomía y se injerto el aloinjerto tratado con **TGF- β 1** en el espacio interfragmentario producto de la fractura inducida.

Para la valoración clínica y radiográfica realizada a los tres grupos, se efectuaron controles diarios y semanales. Los controles diarios consistieron en la recopilación de las constantes fisiológicas, grado de apoyo clínico e inflamación. Los controles semanales se basaron en el muestreo sanguíneo y la toma de placas radiograficas de los animales.

Parte fundamental de esta tesis fué el estudio de los resultados estadísticos obtenidos, la estadística se realizó bajo un modelo cuantitativo de Regresión lineal de todos los datos recopilados de las variables determinadas para los grupos y mediante la correlación de Pearson se explicó la confianza del modelo. En los resultados no hubo diferencias estadísticas significativas que evidenciaran cambios en el proceso de reparación.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL HUESO

Se le llama **hueso** al órgano del sistema esquelético cuyo componente estructural es el tejido óseo y que se compone de una matriz extracelular mineralizada. Se forma por tejido conectivo que esta constituido por células y fibras que forman una sustancia rígida y dura, conformadas por una capa de tejido óseo denso o compacto denominada corteza o cortical; que es la que se sitúa siempre superficialmente, está envuelta por una membrana fibrosa, (excepto donde se localiza el cartilago articular); que cubre toda la superficie denominada **periostio**; el cual a su vez se compone de dos capas una interna y una externa, la capa interna se forma por tejido conectivo laxo vascularizado y donde también se localizan células osteógenas u osteoprogenitoras y células formadoras de hueso u osteoblastos; la capa externa se compone de tejido conectivo denso con escasos vasos sanguíneos; la segunda capa se compone de placas (espículas) dispuestas en forma de red porosa denominada esponjosa.

Por otro lado los huesos presentan una cavidad medular tapizada de una membrana fibrosa denominada **endostio**; que recubre la cavidad medular y los canales osteonales, dando sostén y fortaleza con el mínimo peso posible y que a su vez, nos da un soporte interno para todo el cuerpo y proporciona el punto de fijación para tendones musculares, los cuales son indispensables para dar la movilidad muscular. Las fibras de colágeno que comunican la capa externa con la interna, se denominan fibras perforantes o de **Sharpey** (Dieter, 1993; Ross, 1997).

La matriz extracelular, dispone de una matriz orgánica (30%) de la masa ósea; que contiene fibras de colágeno principalmente del tipo I, y sustancia fundamental (10%) básicamente lípidos, proteoglucanos y proteínas no colagenosas como la osteocalcina, que se forma por los osteoblastos bajo la influencia del 1,25 dihidroxicolecalciferol; pasando parte de ella al torrente sanguíneo, por lo que la concentración sérica de esta se utiliza en la clínica para valorar el grado de formación de tejido óseo.

La matriz inorgánica (70%), son sales de calcio hidratadas y sales de fosfato cristalino (cristales de hidroxapatita), que tienen forma de varas finas, de unos 3nm de espesor y hasta 60nm de largo. Además, se compone de otros iones y minerales, siendo los más frecuentes los de magnesio, potasio, sodio, carbonato, pero también pueden encontrarse citrato, difosfato, zinc, hierro y algunos metales tóxicos, como estroncio, plomo, aluminio, oro y cadmio (Frandsen, 1995; Junqueira, 2001; Climent, 1998; Merida; 2002; Schuwartz, 1998).

Histológicamente el cuerpo de un hueso largo se forma por hueso compacto, compuesto de matriz ósea depositada en capas o laminillas curvadas, las laminillas están originadas según tres patrones distintos: concéntricas, intersticiales y circunferenciales.

Las laminillas concéntricas se encuentran alrededor de canales longitudinales (osteonas) denominados conductos de **Havers**, en promedio estos miden 50 μ m de diámetro y cada conducto tiene 1 o 2 capilares, además de vasos linfáticos, fibras nerviosas y tejido conectivo; las laminillas intersticiales son restos de osteonas y las laminillas circunferenciales (lámina basal externa e interna) están paralelas a la superficie interna y externa de la diáfisis.

Otro sistema de canales conductores de vasos, llamados conductos de **Volkman**, (canales perforantes) atraviesan el tejido óseo en sentido transversal y no están rodeados de láminas ordenadas en forma concéntrica, comunican a los conductos de Havers entre sí con las superficies externa e interna del hueso, así como con los vasos que se encuentran a nivel del periostio (Karsenty, 1999; Pagliai, 2001; Cormack, 1988).

El hueso trabecular también se compone por láminas, pero no forman sistemas de Havers, el principal elemento estructural es la osteona trabecular, las cuales forman fibras delgadas y gruesas; las delgadas están compuestas por una sola osteona, con ambas superficies ubicadas hacia el canal medular recubiertas por endostio, mientras las gruesas se componen de varias osteonas con líneas de cemento intermedias (Dieter, 1993; Ross, 1997; Junqueira, 2001).

En el hueso existen cinco tipos de células:

1. Las células **osteoprogenitoras** se diferencian de las células mesenquimáticas primitivas, y tienen la capacidad de inducir la formación de hueso por transferencia de tejido conectivo; es decir, dan origen a los osteoblastos.
2. Los **osteoblastos** son células esféricas que cubren la superficie en crecimiento, son las encargadas de sintetizar y secretar la matriz ósea, así como fosfatasa alcalina, **citocinas** y factores de crecimiento de efecto local, implicados en la formación y resorción de hueso, entre ellos encontramos a las interleuquinas, IGF-I (factor de crecimiento similar a la insulina), PGE₂ y **TGF β** (factor de crecimiento y transformación beta).
3. El **osteocito** es la célula principal del hueso maduro, los cuales se encuentran alojados en una laguna rodeada por sustancia intersticial, poseen numerosas prolongaciones finas que pasan por canales pequeños,

llamados canalículos, y existen además uniones "gap" donde contactan con las prolongaciones de otros osteocitos.

4. Los **osteocitos de superficie**, llamadas células de recubrimiento óseo que se originan a partir de osteoblastos que han finalizado la formación de hueso y recubren la superficie, como su nombre lo indica.
5. Los **osteoclastos** son células responsables de la degradación de los minerales, así como de la matriz ósea y otras estructuras como fibras extracelulares de colágeno y elastina que son las que proporcionan la resistencia e integridad y los proteoglicanos, los cuales proporcionan elasticidad y flexibilidad a la matriz de tejido conectivo. También secretan fosfatasa ácida y enzimas lisosomales (Ross, 1997; Birchard, 1996).

2.1.1 Osteogénesis.

Independientemente del lugar en donde se forma el tejido óseo, lo hace por un proceso de transformación del tejido conectivo existente. Los tipos de desarrollo de tejido óseo dependen de células específicas que se diferencian en ambientes celulares distintos. La zona reducida específica de formación ósea, se llama centro de osificación (Dieter, 1993; Frandson, 1995).

Cuando el tejido óseo se forma directamente del mesénquima, el proceso se designa como osificación **intramembranosa**, la cual explica como la mayor parte de los huesos planos están preformados como membrana fibrosa o matriz, la cual se infiltra en tejido osteoide que, al calcificarse, forma hueso verdadero y definitivo. Se forma hueso adicional al osificarse las capas del periostio a cada lado del hueso.

El proceso de formación ósea en modelos de tejido cartilaginoso preexistente se denomina osificación endocondral o **intracartilaginosa**, en este caso el hueso es preformado en los cartílagos del feto. Muchos huesos largos evolucionan según este procedimiento, el cual consiste en que el cartílago se mineraliza y luego es sustituido poco a poco por tejido óseo. Los huesos largos aumentan de diámetro al formarse nuevas capas de hueso a partir del periostio que rodea la corteza ósea (Guerado, 2002).

Al tiempo que se forma el hueso nuevo por fuera, las porciones más internas se eliminan con aumento de tamaño de la cavidad medular (Dieter, 1993; Frandson, 1995).

2.2 PATOLOGÍAS ÓSEAS

Entre las funciones de los huesos deben considerarse las de dar protección y rigidez a los órganos de las cavidades torácica y abdominal así como proporcionar protección al cerebro y médula espinal, conformar el cuerpo, actuar como palancas y proporcionar un sitio para la formación de elementos de la sangre; además de representar un papel muy importante en el sistema de locomoción.

En conjunto el esqueleto sirve como área dinámica de depósito para las sustancias minerales, especialmente calcio y fósforo, las cuales son depositadas y retiradas conforme se les necesita en el proceso homeostático en marcha (Frandsen, 1995; Olmsted, 1998).

El **sistema esquelético** se define como aquél comprendido por huesos cartilago y articulaciones; una gran variedad de patologías puede afectar al aparato esquelético como son tumores, enfermedades y fracturas (Morris, 2002; Popesko, 1981).

2.2.1 Tumores óseos.

Los tumores óseos por lo general son malignos, tienden a afectar a perros de edad avanzada, su frecuencia afecta a medida que aumenta el tamaño y el peso corporal y se sugiere una predisposición en machos.

Los tumores óseos primarios, se originan desde los elementos constitutivos del hueso y el cartilago, tumores de tejidos blandos que invaden el hueso o tumores malignos que metastatizan en el hueso; tienen predilección por las regiones metafisiarias de los huesos largos, en especial en distal del radio, proximal del húmero, distal del fémur y proximal de tibia, y son más frecuentes en el miembro torácico (anterior) que en el pelviano (posterior) (Morris, 2002).

Benignos: se presentan con baja frecuencia y tienen poca importancia clínica, entre los que están, osteocondroma, encondroma y osteoma.

Malignos: son de crecimiento rápido, destructivo e invasivo, su presencia dentro del hueso causa dolor y la destrucción de estructuras óseas normales, conduce al debilitamiento del hueso predisponiéndolo a fracturas patológicas; tiende a diseminarse a lo largo de la cavidad medular y puede invadir los tejidos blandos adyacentes, aunque rara vez el tumor cruza o invade las articulaciones, el más común es el osteosarcoma que es el de mayor malignidad asociado con un temprano desarrollo de metástasis; también están el condrosarcoma, fibrosarcoma, liposarcoma, hemangiosarcoma, carcinomas mamarios, entre otros.

En la mayoría de los casos hay una metástasis microscópica presente en el momento del diagnóstico de la lesión primaria. La metástasis es hematógena y los pulmones son el sitio más frecuente para el desarrollo de tumores secundarios. Otros sitios de metástasis a distancia incluyen riñones, hígado, bazo y el mismo esqueleto.

Por lo general los animales afectados presentan claudicación de comienzo gradual o súbito, con o sin tumefacción dolorosa del área afectada en el miembro.

Los análisis rutinarios hematológicos y bioquímicos no suelen ser de mucha ayuda en el diagnóstico de tumores óseos primarios. La fosfatasa alcalina sérica y específica se eleva en los perros con osteosarcomas primarios (Morris, 2002; Slausson, 2002).

La radiografía si es de valor diagnóstico y en el área afectada se presenta osteólisis, formación de hueso irregular y al azar e inflamación de tejidos blandos con o sin calcificación. La radiografía de tórax es importante en la estadificación clínica. Una biopsia de la lesión es necesaria para alcanzar un diagnóstico histológico.

La cirugía es el medio más efectivo para el tratamiento, pero la naturaleza localmente invasiva de los tumores de hueso hace que la remoción requiera de márgenes amplios de seguridad, incluyendo el hueso; la quimioterapia está indicada como tratamiento adyuvante del manejo quirúrgico como intento para demorar el inicio de la metástasis, el más utilizado es el cisplatino a dosis de 60mg IV cada 21 días hasta 6 aplicaciones, el carboplatino a dosis de 300mg IV cada 21 días hasta 4 aplicaciones y la doxorubicina a dosis de 30mg IV cada 14 días hasta 5 aplicaciones.

El pronóstico para el osteosarcoma en los perros es universalmente malo, eventualmente el 90% de todos los pacientes son sacrificados debido a la enfermedad metastásica (Morris, 2002).

2.2.2 Enfermedades óseas.

Dentro de las enfermedades más comunes está la osteolítis u osteomielitis que es la inflamación de la cortical y de la médula óseas, afectando a los espacios haversianos, canales de Volkman y, en general, a la cavidad medular y al periostio. La infección ósea esta generalmente asociada con fracturas abiertas, cirugía ósea (especialmente las intervenciones que comprenden implantes metálicos) hueso cortical avascular o enfermedades sistémicas; la

mayoría están causadas por bacterias y otros agentes infecciosos como virus y hongos (Brinker, 1999; Coughlan, 1999).

La infección aguda se caracteriza por una historia clínica coherente, dolor localizado, hinchazón, eritema, pirexia, anorexia, letargia y una fiebre persistente (39.5°), los signos radiográficos no son claros, se suele manifestar entre las 48 y 72 horas después de la intervención quirúrgica, en la radiografía el único cambio visible puede ser la inflamación de los tejidos blandos y pueden pasar varios días para que se manifieste la alteración. En una infección crónica la característica principal se observa en la historia clínica coherente del paciente, esto es; que hay concordancia de lo anotado con lo observado y el diagnóstico se verá soportado con los análisis de laboratorio.

Los signos de una infección crónica se detectarán cuando se observe en la lesión exudados de trayectos fistulosos (+/-); cojera visible a causa de una atrofia muscular con contractura de los músculos circundantes a la lesión y cambios radiográficos positivos al diagnóstico de osteomielitis, en los cuales podemos detectar osteoporosis, resorción y adelgazamiento de hueso cortical, formación de periostio de hueso nuevo, esclerosis, hinchazón de tejidos blandos y formación de sequestros e involucros (Coughlan, 1999).

Las vías de infección por orden de frecuencia son las siguientes:

- a) Contaminación directa de las fracturas abiertas, intervención quirúrgica en el tratamiento de una fractura y heridas por punción.
- b) Extensión directa de tejido blando adyacente infectado.
- c) Por sangre, en enfermedades como osteomielitis vertebral, discoespondilitis (*Brucella*, *Nocardia*, *Staphylococcus*) y endocarditis bacteriana (Brinker, 1999; Arrebola, 2000).

El tratamiento con éxito de las osteomielitis postraumáticas requiere una combinación de cirugía y un curso prolongado de antibióticos como la cefazolina, clindamicina, cloxacilina, metronidazol y amoxicilina de dos a tres veces al día aunado a un desbridamiento completo y cuidadoso

En la infección aguda el tratamiento debe ser agresivo y apropiado para anticiparse a una enfermedad crónica tomando en cuenta que también hay que evaluar y modificar, si es necesario, la fijación interna para asegurar la estabilidad de la fractura o ayudarnos también de una fijación esquelética externa (Coughlan, 1999; Brinker, 1999).

2.2.3 Fracturas óseas.

Una fractura es toda interrupción patológica de la continuidad del tejido óseo. Su clasificación se basa según su mecanismo de producción; en fracturas por mecanismo directo y por mecanismo indirecto y según su patrón de interrupción en fracturas incompletas y completas (Frandsen, 1995; Coughlan, 1999).

El hueso puede comprimirse, doblarse, elongarse o torcerse, sin embargo, existen límites de resistencia a la aplicación de estas fuerzas, es decir, cuando se aplica suficiente fuerza a un hueso, este se deforma de su estado original, por lo tanto podemos decir que existen cuatro comportamientos básicos del material a la aplicación de la fuerza:

- 1) **Deformación elástica:** -Es el valor del esfuerzo en la curva de esfuerzo-deformación, en el que existe un incremento significativo de la deformación, con poco o ningún incremento en el esfuerzo.
- 2) **Deformación plástica:** -Es el valor del esfuerzo en la curva de esfuerzo-deformación, en el que el material se ve sometido a un esfuerzo mayor que su resistencia a la cedencia, llamada también resistencia última.
- 3) **Límite elástico aparente:** -Es el valor del esfuerzo en la curva de esfuerzo- deformación, en que el material se deforma plásticamente; es decir, ya no volverá a su forma y tamaño originales luego de eliminar la carga.
- 4) **Punto de ruptura:** -Es el valor del esfuerzo en la curva de esfuerzo-deformación, que ocurre cuando la fuerza sobrepasa el límite elástico aparente, llamado también esfuerzo en el punto de ruptura (Pytel, 1994, Ortiz, 2002).

Al aplicar las cargas aparece una deformación interna del material generando fuerzas internas resultantes, lo que se denomina estrés; ante el cual el hueso mantiene una resistencia plástica de forma permanente, pero cuando estas son alteradas, principalmente por fuerzas externas y la resistencia plástica es rebasada, se puede provocar una fractura (Bojrab, 1990, Brinker, 1999).

Reparación de las fracturas.- La mecánica de la reparación de las fracturas, se refiere directamente a la cantidad de movimiento que se esperarían en el lugar de la fractura y para que exista una correcta inmovilización se requiere de una buena reducción. Se le llama reducción a la reunión de los extremos fracturados de un hueso en la posición original y si en esta disposición se inmovilizan ocurre el proceso correcto de curación.

Para una buena reparación existen factores a controlar:

- Las enfermedades crónicas debilitantes o mala alimentación.
- El tejido necrótico en la zona (secuestros).

- Movimiento excesivo en los extremos de la fractura.
- Elección del método adecuado de fijación.
- La presencia de bacterias (infección) (Russell, 1987).

En el momento de la fractura se rompen algunos vasos sanguíneos, con la consiguiente hemorragia difundida por los extremos del hueso, la sangre derramada forma un coágulo, pronto invadido por células conectivas que forman tejido de granulación y nuevos capilares.

Los osteoblastos de la superficie del hueso, del periostio y el endostio que tapizan las cavidades de la médula y los conductos de Havers se multiplican con rapidez y producen una cantidad masiva de tejido osteoide que se llama callo. Este tejido llena el espacio y la cavidad medular entre los extremos rotos del hueso, los rodean y forma una unión sujetadora que en general asegura la inmovilidad de los segmentos. Una vez que el callo queda por completo mineralizado puede decirse que se ha convertido en hueso verdadero (Frandsen, 1995; Stevenson, 1985; Hannouche, 2001).

Existen dos tipos de cicatrización ósea:

Cicatrización ósea primaria: Sucede con la fijación interna rígida y resulta en la unión ósea por el crecimiento directo de los sistemas haversianos a través de la fractura, hay un callo externo mínimo o nulo, la reparación ocurre cuando se desarrollan nuevas osteonas que cruzan en el área de fractura para sustituir las antiguas que fueron privadas del suministro sanguíneo local, por lo que la lesión en el aporte sanguíneo de las osteonas cerca del área de fractura, estimula una intensa actividad en los sistemas haversianos. Los osteoblastos forman puntas de lanza en los extremos de los canales haversianos cerca de la fractura, además de aumentar su tamaño para la formación de un nuevo sistema (Ross, 1992; Climent, 1998).

Cicatrización ósea secundaria: Se presenta cuando no existe una fijación interna rígida y una posición anatómica adecuada de los huesos, consta de seis estadios:

1. **Estadio de impacto fracturante:** La cantidad de energía que absorbe el hueso, es liberada al momento de ocurrir la fractura y se dañan los tejidos adyacentes, provocando un estímulo local y sistémico que moderan usualmente ciertos mensajes, entre ellos, las enzimas, pH y tensión de oxígeno; también se ha descrito una sustancia estimulante de la Osteogénesis o proteína morfogénica (BMP), la cual manda mensajes a varios tipos de células en donde algunas no son estimuladas, generalmente los mensajes recibidos son de proliferación, diferenciación y organización. Este proceso inicial de respuesta generalmente lleva siete días.

2. **Estadio de inflamación:** La finalidad de esta respuesta inflamatoria, es la limpieza del foco de fractura para preparar terreno a la consolidación. Se inicia inmediatamente después de producirse la fractura. Se produce un acúmulo de líquido en espacio intersticial por vasodilatación, aumentando la permeabilidad capilar en respuesta a factores como la histamina, serotonina, etc. y localmente se concentran, leucocitos, PMN y especialmente neutrófilos, a los que se unen progresivamente células de la serie mononuclear – fagocítica. La lisis de los osteocitos y células de los tejidos blandos muertas, conllevan a una liberación en el foco de la fractura de sustancias almacenadas en los lisosomas, como el factor beta transformador de crecimiento (**TGF β**), el cual es una citocina sintetizada por osteoblastos que atraen células inflamatorias y macrófagos encargados de la limpieza de todo el material necrótico de la fractura (Fuentes, 1998).
3. **Estadio de inducción o de granulación:** En esta etapa generalmente se reproducen nuevas células, en respuesta a los estímulos anteriormente recibidos, por lo que se genera la formación de nuevos vasos, fibroblastos, material intercelular y diferentes células de soporte, que en conjunto formaran tejido suave de granulación en los extremos de fractura del hueso. Durando este proceso aproximadamente dos semanas (Santoscoy, 1994; Stevenson, 1985; Climent, 1998).
4. **Estadio del callo blando:** En este, existe proliferación de células formadoras de hueso y/o cartílago, las cuales comienzan a formar la matriz orgánica, así como la vascularización de la zona. La proliferación se pone en marcha donde se encuentra el periostio, endostio y tejidos circundantes vasculares, aquí participan algunos grupos celulares como son los osteoblastos y condroblastos, que se encargan de formar una amalgama celular responsable del callo blando, y los osteoclastos y condroclastos que son los encargados de remover detritus celulares. La captación del calcio aumenta lentamente elevándose durante meses o años.
5. **Estadio del callo duro:** Se produce la mineralización del callo blando al cabo de tres semanas, y varía dependiendo del tejido adyacente; el tejido osteoide neoformado se va a mineralizar directamente por él depósito de cristales de hidroxapatita y el tejido cartilaginoso seguirá un proceso de osificación endocondral similar al que siguen los moldes cartilaginosos del feto. El tejido óseo resultante es de tipo fibrilar.
6. **Estadio de modelación y remodelación:** Durante este estadio que es el más largo de todos, y que dura de seis a nueve años después de la fractura, toma lugar un reemplazo de cartílago mineralizado, se da una transformación de tejido óseo en nuevo hueso laminar, se da una transformación de hueso compacto, como los osteones y nuevo hueso laminar alineado, paralelo a la compresión longitudinal y a las fuerzas de tensión que están dadas por los músculos que rodean la fractura y se

remueve el callo que ocluye la cavidad medular restaurando el espacio medular (Russell, 1987; Stevenson, 1985; Climent, 1998).

Una perfecta alineación minimiza el callo fibroso y consecuentemente se acelera la formación del hueso maduro; siendo la curación más rápida si el foco tiene un buen aporte sanguíneo y la inmovilización es completa (Ross, 1992; Frandson, 1995; Arrebola, 2000).

Complicaciones que retardan la reparación de las fracturas.- La mayoría de estas se complican, por no observar y seguir adecuadamente los principios básicos de la ortopedia. Estas básicamente son:

Unión: Significa que el hueso fracturado se ha consolidado, el hueso ha soldado y el paciente puede cargar peso sobre él y deambular sin que se produzcan complicaciones; no hay movimiento ni dolor en el lugar de la fractura, aunque todavía la línea de fractura sea evidente en las radiografías.

Seudo-artrosis: Indica una no-unión en la que hay movimiento considerable en el lugar de la fractura, de tal manera que se forma una falsa articulación con una cavidad sinovial, uniéndose los extremos mediante tejido fibroso o cartilaginoso.

No-unión: Indica que la fractura no ha consolidado sin probabilidad que lo haga, al menos que las circunstancias se alteren por cirugía u otra intervención. Básicamente es provocada por_inmovilización inadecuada de la fractura, pérdida de la irrigación sanguínea y tratamiento posquirúrgico inadecuado (Coughlan, 1999; Arrebola, 2000; Dennis, 2001).

Unión retardada: Son básicamente las mismas causas de no-unión, pero actúan en grado menor, si la unión retardada va a precisar un tiempo considerable para consolidar, es mejor revisar el tratamiento y aplicar una fijación más estable con el fin de acelerar la reparación. Se aplica a una fractura que tarda una cantidad excesiva de tiempo en consolidar, más de lo que cabría esperar; varía dependiendo del hueso fracturado, edad, método de fijación y estado de salud general del paciente.

Mal-unión: Se ha consolidado la fractura pero con mala alineación, evitando la compatibilidad con la función normal de esa parte del esqueleto. Las mal uniones se consideran como funcionales o no funcionales. En las funcionales el animal tiene buena función de la extremidad con deformidad moderada, afectando solamente la estética. Las no funcionales implican la alteración en la función de la extremidad, sin que se produzcan problemas clínicos hasta varios meses después. También las mal uniones pueden afectar la movilidad articular o alterar el ángulo funcional de la articulación (Coughlan, 1999; Arrebola, 2000).

En ocasiones, los defectos esqueléticos, ya sean congénitos o adquiridos, por alguna o múltiples circunstancias; no pueden ser corregidos solamente con la **fijación esquelética externa**, sino que se pueden complementar ó tomar como alternativa, con el tratamiento de tejido vivo o no viable, llamado injerto; mediante un procedimiento quirúrgico que permite reemplazar el hueso perdido o deficiente en la parte del cuerpo afectada, pero ¿qué es un injerto?

2.3 INJERTOS ÓSEOS

Se le llama **injerto** a la transferencia de cualquier tejido vivo. Existen diferentes tipos de injertos, cada uno con características físicas, mecánicas e inmunológicas diferentes.

El injerto de **hueso esponjoso**, es el tipo de injerto que se emplea con más frecuencia, para estimular la consolidación de una unión retardada o de una no-unión o para remplazar un segmento conminutivo de hueso. Suelen obtenerse a partir de hueso metafisiario del donante y se usan como auto injertos frescos. En cualquier circunstancia se intenta promover el callo, el cual estará constituido por una combinación de callo periostico y por nuevo hueso inducido dentro del mismo injerto (Coughlan, 1999; Brinker, 1999; Burchardt, 1983).

El injerto de **hueso cortical**, usados con menor frecuencia, son fragmentos de hueso cortical que se suelen separar de la irrigación sanguínea y se aplican más a menudo como aloinjertos congelados. La formación del callo se observa con frecuencia en los extremos óseos del hueso huésped mientras se van incorporando. Este tipo de injertos no desarrollan vascularidad durante años, por lo tanto funcionan como puntal físico más que ser reincorporados realmente.

La combinación de ambos se denominan injertos **corticoesponjosos**, los cuales pueden usarse como auto injertos frescos o aloinjertos congelados y suelen obtenerse a partir de costillas o crestas iliacas dorsales (Brinker, 1999; Coughlan, 1999).

Los casos de infección asociada con el injerto óseo en animales son mínimos cuando se emplean las técnicas asépticas y el hueso no ha estado en contacto con un área contaminada, infectada o inestable. El hueso introducido experimenta grados variables de osteoconducción (sustitución progresiva) hasta ser sustituido completa o parcialmente por el hueso aceptor (Brinker, 1999).

2.3.1 Tipos de injertos.

- **Fragmentos de hueso esponjoso puro:** Se emplea inmediatamente después de su obtención, rellenando la zona receptora con los fragmentos y comprimiendo después con suavidad el material.
- **Fragmentos pequeños de hueso corticoesponjoso:** Se prepara normalmente a partir de hueso de costillas de un aloinjerto conservado en un banco, útiles para aumentar el volumen de un injerto más que el disponible.
- **Injerto de hueso de superposición:** Usados para tratar fracturas no unidas y fracturas frescas, se realiza partiendo una costilla para descubrir el interior esponjoso y este lado se coloca sobre el hueso receptor, se coloca hueso esponjoso autógeno o astillas de hueso alrededor de la parte de la fractura que quede sin cubrir.
- **Injerto de incrustación:** Su uso ha disminuido con la aparición del término de osteosíntesis de puente, consiste más a menudo en hueso cortical que sirve para sustituir una parte de hueso cortical perdida en el lado de compresión opuesto a la placa de hueso.
- **Injerto diafisario intercalado tubular:** Consiste en cortar en cuadrículas los extremos de los segmentos de hueso viable, adaptando el tamaño y la longitud adecuada de aloinjerto diafisario cilíndrico a la sección central de la placa e inmovilizándolo con compresión en ambos extremos; hay buenos resultados mediante este método, se indica en fracturas múltiples o conminutas, fracturas con fragmentos óseos perdidos, sustitución de segmentos extraídos en neoplasias, reconstrucción de fracturas no unidas, atróficas y corrección de una mala unión (Brinker, 1999; Soto, 2002).

2.3.2 Funciones de los injertos óseos.

Los injertos de hueso sirven como fuente de osteogénesis y pueden ser también un soporte mecánico.

Las principales funciones del injerto es su servicio pasivo como trama o estructura base en la que acontecen los fenómenos vasculares y celulares de la integración (osteoconducción, osteoinducción) La incorporación o integración de los injertos se presenta mediante la secuencia de distintos eventos con origen en el huésped o en el injerto. Ello representa una relación de tipo simbiosis entre los factores del injerto y los del receptor o huésped (Brinker, 1999; González 1989; Slatter, 1985).

Si el injerto tiene la función de osteogénesis, va a existir formación de hueso sin indicación del origen celular, es decir el hueso se va a poder formar a partir de las células del injerto o bien a partir de las células del hueso huésped. El hueso nuevo que se forma sobre o alrededor del injerto puede tener su origen a partir de osteoblastos o células osteoprogenitoras, a partir de células mesenquimatosas u osteoprogenitoras pluripotenciales a esta zona, que luego se diferencian en células formadoras de cartílago y hueso (osteoinducción) y por el proceso tridimensional de crecimiento interno en el que crecen los capilares, el tejido perivascular y las células osteoprogenitoras desde la base receptora a la estructura de un injerto (osteoconducción) (Brinker, 1999; Arrebola, 2000).

Otra función de los injertos óseos es el soporte mecánico que se le va a dar al hueso, ya que actúan como “rellenadores” de espacio para el soporte de peso.

Es importante que se forme rápidamente un callo de puente cuando la fragmentación de la fractura crea una situación en que el hueso no puede soportar ningún peso con el implante, así el callo puede estabilizar la fractura lo suficiente para liberar al implante de algunas de estas fuerzas y con ello, minimizar las posibilidades de que se produzca un fallo o aflojamiento del implante (Brinker, 1999; Stevenson, 1999).

La aplicación de injertos óseos está indicada en las siguientes circunstancias:

- a) Aumentar la cicatrización en uniones retrasadas, no uniones, osteotomías y artrodesis de articulaciones, al estimular la formación rápida de callo de puente.
- b) Sustituir los defectos principales en fracturas multifragmentadas, al establecer continuidad de los segmentos óseos y rellenar los defectos de hueso cortical, estimulando, por ello, la rápida formación de callo de puente.
- c) Reemplazar segmentos completos del hueso cortical que se hayan perdido debido a fragmentación de fractura o a extirpación por neoplasia.
- d) Rellenar cavidades o defectos de espesor parcial que resulten de la extirpación de quistes ó neoplasias (Brinker, 1999).

2.3.3 Características de los injertos óseos.

Suelen ser muy variadas y diferentes entre ellas y dependiendo de su método de obtención, preservación y tratamiento los podemos encontrar como:

- **Autoinjerto:** También llamados autólogos, autógenos ó autóctonos, se obtiene del propio animal, tienen un potencial osteogénico máximo con rápida respuesta, pero su obtención aumenta el tiempo y riesgo de la

intervención ya que del hueso que se dispone puede ser insuficiente en cuanto a cantidad forma y tamaño.

- **Aloinjerto:** Denominado también homoinjerto, es obtenido de la misma especie, de un animal donante y se emplea en fresco o se conserva en un banco de huesos (congelados); tiene aproximadamente el mismo efecto de aumento de cicatrización que un hueso autógeno, sin embargo, no hay osteogénesis directa y hay un retraso inicial de respuesta, son la única fuente para injertos corticales extensos; en pocas palabras es la transferencia de tejido de un individuo a otro de la misma especie, siendo estos genéticamente diferentes.
- **Isoinjerto:** También llamado isólogo, el tejido de un gemelo se trasfiere a otro gemelo idéntico (univitelinos).
- **Xenoinjerto:** Tiene el potencial osteogénico menor pudiendo haber reacción por presencia de un cuerpo extraño, este es de especies diferentes y tiene poca aplicación clínica.
- **Injertos frescos:** Son trasplantados de inmediato, generalmente están vascularizados y se unen o no por anastomosis al receptor, usados solamente en medicina humana por dificultades técnicas y costo.
- **Injertos conservados:** Son los que están tratados por congelación y desecación, irradiaciones y esterilización en autoclave o por productos químicos, los cuales son muy útiles como instrumento de soporte.
- **Implantes:** Se refiere a la colocación de materiales no biológicos como prótesis de cerámica ó metal, coral, marfil, etc. o de material no vivo como hueso muerto, desmineralizado, fibras de carbono, etc., preservados por cualquier método como la liofilización, desproteínización, congelación y esterilización.

Para la preparación de implantes se requiere de una adición química o exposición radiológica, estos pueden clasificarse en desmineralizados e irradiados, siendo el primero uno de los más usados en diversas patologías óseas por su gran capacidad osteogénica; además de contar con diversas técnicas que permiten el uso de hormonas como la proteína morfogénica ósea, la hormona del crecimiento, la PGE1 y PGE2 y otros tipos de proteínas como las **citoquinas** con el fin de promover una pronta reparación ósea (Stevenson, 1999, Brinker, 1999; Aguilar, 1994; Ferguson, 1987; Mulliken 1984; Slatter, 1985; Wimbhurst, 1999).

Los implantes de materiales biológicos o biocompatibles favorecen la formación de hueso y aportan un armazón que se involucra en un proceso

prolongado de revascularización; esencial para la resorción y su reemplazo por hueso (Hupel, 2001; Keating, 2001; Kessler, 2001).

La integración de los aloinjertos (implantes) en el receptor conduce a una serie de procesos en los cuales intervienen un gran número de células y señales biológicas, las cuales participan en todas las fases de esta integración (Álvarez, 2002; Woolf, 2001).

La primera fase es la **inflamación** la cual ocurre en minutos u horas posteriores al acto quirúrgico y en la cual, muchas de las células mueren especialmente los osteocitos de las lagunas trabeculares, conforme los vasos del receptor invaden el implante, aparecen por toda el área linfocitos, células plasmáticas y células polimorfonucleares. El proceso inflamatorio se mantiene hasta la segunda semana y en el área predomina el tejido de granulación y se incrementa la actividad osteoclástica (Santoscoy, 1994; Stevenson, 1985).

La segunda y tercera fase son la **vascularización y osteoconducción**, el tiempo en que ocurre la primera es muy variado, ocurriendo a partir del segundo día en injertos esponjosos, mientras que puede tardar hasta dos meses en injertos corticales, esto debido a las características porosas que presenta el injerto esponjoso, lo cual lo hace más fácilmente infiltrable por parte de los vasos, los osteoblastos y sus precursores, procediendo de la periferia hacia el centro y como los osteoclastos proceden de la sangre, el desarrollo de los vasos huéspedes indican el comienzo de la resorción del injerto (Santoscoy, 1994; Stevenson, 1985). Durante esta fase de incorporación del implante o injerto, el sistema inmunológico del huésped se vuelve más sensible a los antígenos del donante provocando mala vascularización y rechazo del implante, evitando esto mediante el método de conservación del hueso (descalcificación: que elimina la inmunogenicidad del implante al desnaturalizar las proteínas óseas). Aunque no es antigénico, el implante se revasculariza y remodela muy lentamente y exige una estabilidad absoluta durante un periodo mucho más largo que el requerido por una fractura normal (Stevenson, 1985; Roitt, 2001; Bonutti, 2000; Flugsrud, 2000).

La fase cuatro de **osteoinducción**, se lleva a cabo una vez que el implante ha sido vascularizado, se indica la conversión de las células mesenquimatosas indiferenciadas en células precursoras de hueso, moduladas por una glicoproteína hidrofóbica, denominada proteína morfogénica de hueso (PMH). Se ve a los osteoblastos cubriendo los extremos de las trabéculas muertas y depositando una capa osteoide que rodea el núcleo central del hueso muerto, apreciando radiológicamente un incremento en la densidad del área, debido al remodelado del implante, lo que significa que el nuevo hueso y los núcleos del hueso necrótico son reabsorbidos gradualmente por los osteoclastos, al mismo tiempo elementos hematopoyéticos de la médula ósea se acumulan en el interior del hueso. A medida que progresa el remodelado, la fuerza mecánica del área implantada recupera su normalidad.

En el auto injerto esponjoso, el periodo de osteoinducción y remodelado puede prolongarse hasta algunos meses, pero en los aloimplantes extensos, persiste durante años (Santoscoy, 1994; Stevenson, 1985; Roitt, 2001; Sierra, 2002).

En la quinta fase o **mecánica** se lleva a cabo la incorporación; el material transplantado no reabsorbido e inviable sigue funcionando como un soporte mecánico o elemento para transmitir tensiones y debe tenerse en cuenta que los implantes o injertos se remodelan en respuesta a los mismos estímulos mecánicos que el hueso normal (ley de Wolf), ya que cuando estos se colocan para que sirva de soporte de un defecto óseo de gran longitud, se remodela de manera similar al segmento normal remplazado tanto especial como temporalmente (Stevenson, 1985; Ortiz, 2002).

Ya se hizo mención, de que las citocinas o citoquinas son proteínas que nos permiten promover una pronta recuperación ósea; estos compuestos también son importantes en la transmisión de señales entre las células en el curso de las respuestas inflamatorias; pero, ¿qué son y cuáles podrían ser los beneficios de estas proteínas?

2.4 C I T O Q U I N A S

Se les llama **citoquinas** a las proteínas secretadas por las células de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa que median muchas de sus funciones. Son mediadores solubles y se producen en respuesta a microorganismos y otros antígenos, y diferentes citoquinas estimulan respuestas diferentes de las células implicadas en la inmunidad y en la inflamación.

En la fase de activación de las respuestas inmunitarias, las citoquinas estimulan el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos, y en las fases efectoras de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa activan diferentes células efectoras para que eliminen microorganismos y otros antígenos. Las citoquinas también estimulan el desarrollo de las células hematopoyéticas (Tristam, 2002).

De manera colectiva, las citoquinas regulan no sólo las respuestas inmunes e inflamatorias, sino también la curación de heridas, angiogénesis y muchos otros procesos biológicos. Son compuestos muy potentes que actúan a concentraciones muy pequeñas, mediante su unión a receptores de superficie específicos localizados en las células blanco. A diferencia de las hormonas endocrinas, las citoquinas no se producen en glándulas especializadas ni se secretan a la circulación, sino que en cambio se producen localmente en una

gran variedad de tejidos y células. Sólo unas cuantas citoquinas, como el **factor de crecimiento transformante** (TGF β 1) está presente normalmente en cantidades detectables en sangre y es capaz de influir sobre sus células blanco distantes (Tristam, 2002; Abul, 2002; Roitt, 2001).

Una citoquina determinada se puede secretar individualmente o como parte de una respuesta coordinada junto con otras citoquinas con las cuales no siempre se relaciona. Muchas actividades de las citocinas se traslapan entre sí, y otras pueden ser antagónicas, más aún, una citocina puede inducir la expresión de otras citocinas o mediadores y de esta forma producir una cascada de efectos biológicos (Tristam, 2002).

La nomenclatura de las citoquinas a menudo se basa en sus fuentes celulares. Las producidas por los fagocitos mononucleares reciben el nombre de monoquinas y las producidas por linfocitos se denominan linfoquinas. Debido a que muchas citoquinas son producidas por los leucocitos (Ej. macrófagos o células T) y actúan sobre otros leucocitos, también reciben el nombre de interleucinas (IL).

Así, el uso de las citoquinas es cada vez mayor en situaciones clínicas y en estudios con animales para estimular o inhibir la inflamación, la inmunidad y la hematopoyesis (Abul, 2002).

2.4.1 Propiedades generales de las citoquinas.

La secreción de citoquinas es un acontecimiento breve y autolimitado. Una vez sintetizadas se secretan rápidamente, dando lugar a un pico de liberación en el momento en que son necesarias.

Las acciones de las citoquinas a menudo son pleiotrópicas y redundantes. Actúan sobre diferentes tipos celulares, lo que les permite mediar diversos efectos biológicos y la redundancia es la propiedad de varias citoquinas de tener los mismos efectos funcionales.

Las citoquinas a menudo influyen en la síntesis y las acciones de otras citoquinas. Esto da lugar a cascadas en las que una segunda o tercera citoquina puede mediar los efectos biológicos de la primera. Dos citoquinas pueden interactuar para antagonizar, producir efectos sumativos o sinergizar sus acciones.

Las acciones de las citoquinas pueden ser locales y sistémicas. La mayoría de las citoquinas actúan bien en la misma célula que las secreta (acción autocrina), bien en una célula próxima (acción paracrina) y a distancia del sitio de producción (acción endocrina) (Abul, 2002).

Las citoquinas, al igual que otras hormonas polipeptídicas, inician sus acciones uniéndose a receptores de membrana específicos presentes en las células diana. A menudo se unen a sus ligandos con gran afinidad y sólo se necesitan cantidades muy pequeñas de una citoquina para ocupar los receptores y producir un efecto biológico.

Diversas señales externas regulan la expresión de los receptores de citoquinas y, de esta manera, la capacidad de respuesta de las células a las citoquinas. La estimulación de linfocitos T o B por antígenos da lugar a un aumento de la expresión de receptores de citoquinas, por lo cual durante una respuesta inmunitaria los elementos que responden preferentemente a las citoquinas secretadas son los linfocitos específicos de antígeno, a pesar del hecho de que las citoquinas no son específicas del antígeno.

Las respuestas celulares a la mayoría de las citoquinas consisten en cambios en la expresión genética en células diana, lo cual da lugar a la expresión de nuevas funciones y, en ocasiones, a la proliferación de las células diana. Siendo la excepción las quimioquinas que inducen una migración celular rápida sin expresión de nuevos genes y el factor de necrosis tumoral (TNF) que induce la muerte celular sin necesidad de síntesis de nuevas proteínas (Abul, 2002; Sheeler, 1993).

2.4.2 Categorías funcionales de las citoquinas.

Se ha clasificado a las citoquinas en tres categorías funcionales principales basándose en sus acciones biológicas más destacadas:

Mediadores y reguladores de la inmunidad innata.

Son producidos por los macrófagos mononucleares en respuesta a agentes infecciosos. Los productos bacterianos, como el lipopolisacárido (LPS), y los productos virales, como el ARN bicatenario, estimulan directamente a los macrófagos para secretar estas citoquinas como parte de la inmunidad innata.

La mayoría de este grupo estimula las reacciones inflamatorias tempranas frente a los microorganismos y algunos controlan estas respuestas. En esta categoría se encuentran el TNF, IL 1, quimioquinas, IL 12, Interferón tipo I, IL 10, IL 6, IL 15 e IL18.

Mediadores y reguladores de la inmunidad adaptativa.

Son producidos por los linfocitos T en respuesta al reconocimiento específico de antígenos extraños. Algunas actúan regulando el crecimiento y la diferenciación de diversas poblaciones de linfocitos; otras, reclutan, activan y regulan células efectoras especializadas, como fagocitos mononucleares, neutrófilos y eosinófilos, para eliminar antígenos en la fase efectora de las

respuestas inmunitarias adaptativas. Esta categoría se compone por la IL 2, IL 4, IL 5, Interferón δ , **TGF β** , linfotóxina (LT), IL 13, IL14, IL 16 e IL 17.

Estimuladores de la hematopoyesis.

Son producidos por células del estroma de la médula ósea, leucocitos y otras células, y estimulan el crecimiento y la diferenciación de los leucocitos inmaduros. Las citoquinas que componen esta categoría son IL 7, IL 3, factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), IL 9 e IL 11 (Abul, 2002).

2.4.3 Receptores de las citoquinas y señalización.

Todos los receptores de citoquinas constan de una o más proteínas transmembrana cuyas porciones extracelulares son responsables de la unión a la citoquina y cuyas porciones citoplasmáticas son responsables del inicio de las vías de señalización intracelular. Estas vías suelen activarse por el agrupamiento de receptores inducido por el ligando, por el cual se agrupan las porciones citoplasmáticas de dos o más moléculas receptoras en un proceso similar a la señalización por los receptores de las células T y B para los antígenos (Abul, 2002).

La clasificación de los receptores de las citoquinas más utilizada se basa en las semejanzas estructurales entre los dominios extracelulares de unión a la citoquina. Los receptores de las citoquinas se dividen en cinco familias:

1. *Los receptores de citoquinas tipo I*, también denominados receptores de hematopoyetinas, contienen una o más copias de un dominio con dos pares conservados de residuos de cisteína y una secuencia proximal de membrana de triptófano-serina-X-triptófano-serina (WSXWS) donde X es cualquier aminoácido. La especificidad para cada citoquina específica está determinada por los residuos aminoácidos que varían de un receptor a otro.
2. *Los receptores de citoquinas tipo II*, son similares a los de tipo I, en virtud de dos dominios extracelulares con cisteínas conservadas, pero estos no contienen el motivo WSXWS (Abul, 2002).
3. *Los receptores de la superfamilia de las Ig*, contienen dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (Ig), este grupo de receptores se une a diversas citoquinas que realizan su función de señalización por mecanismos diferentes (Abul, 2002; López-Casillas, 2003).
4. *Los receptores del TNF*, pertenecen a una familia de receptores con dominios extracelulares conservados ricos en cisteína. Al unirse al ligando, estos receptores activan proteínas intracelulares asociadas que inducen la apoptosis, estimulan la expresión génica o tienen ambas acciones.

5. *Los receptores de siete hélices α transmembrana*, denominados también receptores serpentinales debido a que sus dominios transmembrana parecen serpentear atrás y adelante a través de la membrana. Esta clase de receptores median respuestas rápidas y transitorias a la familia de citoquinas denominadas quimioquinas. La unión de la citoquina a estos receptores activa tirosina quinasas asociadas al receptor denominadas quinasas de la familia Janus (JAK) y en último término, da lugar a la activación de factores de transcripción denominados transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) (Abul, 2002).

En este trabajo, se puso mayor énfasis en la citoquina TGF β , debido a que fué la que se utilizó para la realización de nuestro experimento.

2.4.4 Factor de crecimiento transformante β 1.

Se le llama **TGF β 1** a una proteína homodimérica de aproximadamente unos 28kDa que se sintetiza en forma de precursor y que se activa por escisión proteolítica. Su forma latente es un complejo formado por la unión del péptido maduro y el precursor del TGF β 1 (péptido asociado a latencia LAP), por lo que es sintetizado como una molécula pre-pro-TGF β 1 de aproximadamente 390aa con una secuencia de señal de 29aa, la cual es liberada para producir pro-TGF β . La forma madura comprende una secuencia de 112 a 114aa de la región C-terminal. Entre los mamíferos la secuencia de aminoácidos (aa) del TGF β 1 es altamente conservada (100%) ya que es idéntica en humanos, cerdos, vacas y monos y difiere sólo en 1 aminoácido (aa) en los ratones.

Es un regulador general de las actividades celulares con múltiples efectos biológicos, cuya identificación ha permitido entender los mecanismos por los cuales las funciones celulares están reguladas en la salud y alteradas en la enfermedad.

Es secretado en forma inactiva, pero sus efectos biológicos y su unión a receptores los realiza en forma activa. Se secreta por células T estimuladas por el antígeno, fagocitos mononucleares activados, por el LPS y muchos otros tipos celulares incluyendo fibroblastos, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, células de riñón, células de placenta y plaquetas así como por algunas células tumorales. El TGF β producido por estas células participa en la atracción quimiotáctica de células inflamatorias y en la activación o supresión de las mismas, dependiendo de la concentración local de esta citocina y del grado de diferenciación de las células blanco (Hernández-Pando, 2003; Tristam, 2002).

El TGF β (del inglés transforming growth factor- β) se descubrió e identificó primero como un factor de crecimiento para fibroblastos que promovía la curación de heridas; sin embargo, también actúa como un regulador negativo de la inmunidad y hematopoyesis (Tristam, 2002, Peralta, 2001; Filmon, 2002).

Isoformas y receptores del TGF β . Los miembros de la súper familia del TGF β son reguladores multifuncionales de la proliferación y diferenciación de una amplia variedad de tipos celulares. Es una familia de moléculas estrechamente relacionadas, codificadas por genes distintos y que habitualmente se designan como isoformas TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, TGF β 4 y TGF β 5. El TGF β 1 es el inmunoregulador más importante de este grupo, es el miembro de la familia más ampliamente estudiado y puede actuar como un mitógeno indirecto sobre células mesenquimales o como estimulador de síntesis de proteínas de matriz extracelular. Resulta interesante que su efecto inhibitor *in Vitro* este ausente en muchas líneas celulares neoplásicas transformadas incluyendo células de carcinoma epidermoide, de cáncer de mama y de carcinoma de pulmón, donde están alterados los mecanismos de regulación celular inducidos por el TGF β 1 (Luo, 2002).

Todas las células normales y la mayoría de las células neoplásicas tienen receptores en su superficie para el TGF β 1. Las cinco isoformas son sintetizadas como proteínas precursoras inactivas y contienen nueve residuos de cisteínas en el extremo C- terminal.

Se han identificado cinco diferentes tipos de receptores (r) para el TGF β que incluyen:

1. Los receptores funcionales, como son el tipo I (T β RI de 53 a 65 kDa), y el tipo II (T β RII de 83 a 110 kDa).
2. Los receptores no funcionales que incluyen el tipo III (T β RIII de 250 a 310 kDa), el tipo IV (T β RIV de 60 kDa) y el tipo V (T β RV de 400 kDa).

Los receptores de TGF β incluyen dos receptores polipeptídicos de alta afinidad (tipo I y tipo II) que transducen la señal a través de un dominio de serina-treonina quinasa, también se expresan ampliamente y en número variable en muchos tipos celulares (Abul, 2002; Tristam, 2002; Peralta, 2001; Darnell, 2002). Los receptores I y II son los responsables de los efectos biológicos de TGF β en las células de mamíferos, por otro lado se ha sugerido que el receptor III controla la disponibilidad del TGF β en el microambiente extracelular local y regula su presentación activa a los receptores funcionales I y II. El receptor IV se ha identificado en células pituitarias. El receptor V es co-expresado en la mayoría de las células analizadas, con excepción de pocas líneas tumorales (Peralta, 2001; Darnell, 2002; Annes, 2003).

Funciones del TGF β . El TGF- β puede ser considerado como el prototipo de una citocina multifuncional, debido a los efectos que tiene sobre los diferentes blancos celulares.

La acción principal del TGF β en el sistema inmunitario es inhibir la proliferación y activación de los linfocitos T y B y de otros leucocitos. Las células del sistema inmunitario sintetizan principalmente TGF β -1. Recientemente, se identificó un nuevo subgrupo de células T cooperadoras (denominadas células TH 3) cuya producción principal es el TGF β ; estas células parecen desempeñar una función importante en el mantenimiento de la tolerancia en el intestino a antígenos administrados vía oral, demostrando así la función de TGF β como la principal citocina inmunosupresora y también porque suprime la producción de la mayor parte de las linfocinas y monocinas y reduce la expresión celular de proteínas clase II del MHC y de receptores para la IL 1 (Tristram, 2002, Peralta, 2001).

En el contexto de la respuesta inmune, dependiendo de la concentración del TGF β 1, induce e inhibe la producción de citocinas por monocitos, pero inhibe la respuesta protectora de estas mismas células; promueve la quimiotaxis de fibroblastos, monocitos y neutrófilos; in vivo, aumenta las funciones efectora y de memoria de los linfocitos T CD4+ antígeno específicos.

Además, se ha demostrado en estudios clínicos que puede inducir inmunosupresión en el trasplante de órganos e injertos de piel, en el contexto de la activación de subpoblaciones de linfocitos T (Peralta, 2001).

Inhibe la producción de anticuerpos dependiente de células T en las células B, las reacciones leucocitarias mixtas y la generación de CTL. También inhibe la inducción de la actividad en células NK y células LAK mediada por IL 2, de hecho se considera que este es el principal mecanismo por el cual el TGF β inhibe la producción linfocitaria. Así el TGF β es el único en su clase, puesto que puede actuar como un regulador de retroalimentación negativa, atenuando reacciones mediadas inmunológicamente. Además de inhibir la proliferación y la activación de los macrófagos, es también el inhibidor más potente de la proliferación de células de origen mieloide, mesenquimal, epitelial, linfoide, endotelial y de varios tipos de células malignas. El efecto del TGF β es altamente dependiente del grado de diferenciación celular de los linfocitos (Abul, 2002, Peralta, 2001; Hernández-Pando, 2003).

El TGF β es un factor esencial en la regulación de la respuesta inflamatoria desde su inicio hasta su total resolución. En la fase inicial de la inflamación existen bajas concentraciones de TGF β (fentogramos) que participan eficientemente en la quimiotaxis de monocitos y linfocitos sanguíneos. Al progresar la respuesta inflamatoria hay una mayor cantidad de células participantes que constituyen otra fuente de TGF β por lo cual aumenta su

concentración (picomoles), cuando la inflamación es extensa existen muchas células que producen TGF β induciendo altas concentraciones de esta citocina (nanomoles). Por lo tanto, el efecto regulador del TGF β en la inflamación es dependiente de sus concentraciones y del grado de maduración de sus células blanco (Hernández-Pando, 2003).

Actúa sobre otras células como los leucocitos, polimorfonucleares y las células endoteliales para contrarrestar los efectos de las citoquinas proinflamatorias, es un factor quimioatrayente de neutrófilos y monocitos, e incrementa la expresión de proteínas de adhesión en monocitos. Así el TGF β actúa inhibiendo respuestas inmunitarias e inflamatorias, sugiriendo que esta citocina es necesaria para el mantenimiento de la homeostasia.

Es un fuerte estimulador de la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular (MEC) por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales, además de aumentar a la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas del MEC.

Se ha demostrado que la expresión del gen de TGF β 1 es afectada por la presencia o ausencia de proteínas de MEC, lo que sugiere una posible regulación negativa *in vivo*. La disminución de las interacciones celulares con proteínas del MEC, induce la expresión del TGF β 1, lo cual conlleva a la síntesis de varias proteínas de MEC y sugiere un mecanismo de autorregulación (Peralta, 2001).

En un gran número de células, el TGF β -1, induce la producción de especies reactivas de oxígeno y, con ello, provoca una situación de estrés oxidativo. No se sabe bien como se desarrolla este proceso, aunque se asocia con la actuación del factor de transcripción TIEG (TGF β - inducible early-response gene). Actualmente se sabe que estas especies reactivas de oxígeno podrían mediar procesos como la apoptosis o la regulación de la expresión de algunos genes (por Ej. los de las proteínas de matriz extracelular) (Peralta, 2001; Fabregat, 2002).

El TGF β -1, tiene un espectro muy amplio de funciones, las cuales dependen del estado de activación celular, de su concentración, del balance de expresión de otras citocinas y de las condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúa; por este motivo, la distribución celular de su expresión *in situ* e *in vivo* está directamente asociada con el estado de diferenciación celular (Peralta, 2001).

Ciclo celular y TGF β 1.- Uno de los efectos más evidentes de la acción del TGF β corresponde a la inhibición del ciclo celular. Su control selectivo de la expresión de genes puede ser indicativo de un mecanismo de inhibición de la proliferación por TGF β . Los puntos de control del ciclo celular entre las fases

G1 a S y G2 a M, son los que activan los principales mecanismos de regulación del ciclo. Hay evidencias que sugieren que el TGF β -1 puede bloquear el ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S, mediante la inducción de un conjunto de genes conocidos como inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (kip). Los genes que codifican para los kip están directamente involucrados en la regulación del ciclo celular, ya que inhiben la formación de los complejos activos de las cinasas dependientes de ciclinas (cdk), las cuales son las principales protagonistas en los puntos de control del ciclo celular (Peralta, 2001).

Transducción de señal inducida por TGF β 1.- El TGF β 1 transduce señales por la unión a los receptores serina-treonina cinasa T β RI y T β RII; sin embargo los efectos biológicos son mediados principalmente por RI. Ambos receptores, T β RI y T β RII, tienen una región extracelular rica en cisteínas, una región transmembranal y una región citoplasmática, la cual contiene el dominio de serina-treonina cinasa. En presencia del TGF β 1, T β RI y T β RII tienen la habilidad para interactuar uno con otro y formar un complejo tetramérico a través del cual se transducen las señales. Este complejo molecular es la unidad receptora de señales que media las respuestas biológicas del TGF β 1. Las regiones intracelulares de ambos receptores tienen funciones distintas y ambas son necesarias para la transducción de señales. Las regiones transmembranal y extracelular son requeridas por T β RI y T β RII para la activación dependiente del ligando; sin embargo, se ha demostrado que la sobre-expresión de ambos receptores resulta en una combinación heteromérica de sus regiones citoplasmáticas, produciendo una respuesta independiente del ligando. Por lo tanto, la unión del TGF β 1 estabiliza el complejo y genera respuestas fisiológicas adecuadas en una forma dependiente del ligando.

Se ha notificado la participación de las proteínas transductoras de señales de la familia Smad en las vías de transducción inducidas por el TGF β . Estas Proteínas tienen funciones inhibitoras y activadoras que median los efectos biológicos del TGF β 1. En general, la Smad 7 puede ser considerada como inhibidor de la señalización de la superfamilia del TGF β (Peralta, 2001; Darnell, 2002; Jiménez, 2003).

El promotor de TGF- β 1.- Para tener una mejor apreciación de los mecanismos de regulación de la expresión del TGF β 1, es imprescindible conocer este gen. El promotor de este gen y a diferencia de otros promotores, posee características que lo hacen peculiar. Dos regiones del promotor del TGF β 1 han sido identificadas como regiones de respuesta: una, a la autoinducción, y otra, a la inducción por ésteres de forbol. Se ha propuesto que la autoinducción del gen de TGF β 1 representa un mecanismo por el cual los efectos biológicos del TGF β 1 pueden ser amplificados, lo cual representa un mecanismo de regulación de la expresión de este gen. En conjunto estas

características del promotor del TGF β 1 sugieren la participación de complejos procesos moleculares de regulación de la expresión de este gen (Peralta, 2001).

Regulación de la expresión génica del TGF β 1.- Uno de los primeros niveles de regulación del TGF β 1 es el transcripcional, donde su expresión génica puede ser mediada por las interacciones de los factores transcripcionales con los diferentes elementos reguladores descritos en el promotor. En las cinco isoformas del TGF β 1, la regulación de la transcripción es diferente e independiente, ya que cada una de ellas tiene sus propios promotores con diferentes elementos reguladores, que son selectivamente activados por señales específicas durante la activación o diferenciación celular. Existen evidencias que al parecer apoyan que el gen del TGF β 1 puede funcionar como blanco para una variedad de mecanismos reguladores, incluyendo los oncogenes (Peralta, 2001).

Entre las acciones generales más importantes a destacar del TGF- β están:

- Es un potente inhibidor de la proliferación de células epiteliales, endoteliales, linfoides y mieloides (Mehrra, 1999).
- Estimula la producción de anticuerpos IgA. El IgA es el isotipo de anticuerpos necesario para la inmunidad mucosa. Por otro lado inhibe la secreción de IgG e IgM (Ventura, 2004).
- Tiene numerosas acciones diversas fuera del sistema inmunitario. Puede inhibir o estimular el crecimiento del mismo tipo celular in vitro dependiendo de las condiciones de cultivo (Fujimoto, 2005; Okragly, 1994).
- Induce la síntesis de enzimas modificadoras de la matriz, tales como las metalo proteinasas de la matriz, y de receptores celulares para proteínas de la matriz tales como las integrinas. Estas acciones podrían inducir la reparación tisular una vez controladas las reacciones inflamatorias e inmunitarias locales (Erlebacher, 1998; Ferguson, 1987; Maeda, 2001).
- Induce también, otros eventos intracelulares como la regulación de factores de crecimiento que intervienen en la diferenciación celular (Attisiano, 2002; Chung-Fang, 2002).
- La administración sistémica de TGF β 1 ejerce efectos antiinflamatorios. (Abul, 2002; Tristam, 2002; Peralta, 2001).
- En estados iniciales de tumorigénesis, un gran número de células pierde su respuesta al TGF β 1 en términos de inhibición del crecimiento y/o activación de apoptosis, ciertos cánceres presentan mutaciones que afectan al menos

un componente del sistema de transducción de señal del TGF β 1, por consiguiente el TGF β 1, sus receptores y las moléculas transductoras son supresoras de tumores (Fabregat, 2002; Rodríguez-Fragoso, 2000; Schlitz-Mosgau, 2005).

- Se ha demostrado que la expresión del gen de TGF β -1 es afectada por la presencia o ausencia de proteínas de MEC, lo que sugiere una posible regulación negativa in vivo (Hefferan, 2000; López-Casillas, 2003; Pedrozo, 1999).
- La producción y activación excesiva del TGF β se ha relacionado con inmunosupresión en diversas enfermedades autoinmunes, neoplásicas e infecciosas (Hernández-Pando, 2003; Bartman, 2004; Raschke, 2002).

3.0 HIPÓTESIS

Si la utilización de aloinjertos desmineralizados laminares, tratados con TGF β -1, en la reparación ósea permite mejorar la integración y la osteogénesis en osteotomías, entonces es posible optimizar y reducir el tiempo de reparación en fracturas de huesos largos, con defectos óseos en perros.

4.0 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar clínica y radiológicamente la osteogénesis en osteotomías de tibias en perros (*canis familiaris*) utilizando aloinjertos laminares desmineralizados, tratados con TGF β -1.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la evolución clínica de la reparación de osteotomías en tibias con el uso de aloinjertos laminares desmineralizados tratados con TGF β 1.
- Evaluar radiológicamente la integración de aloinjertos en la reparación de osteotomías de tibias utilizando hueso desmineralizado tratado con TGF β 1.

5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo experimental se desarrolló en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, campo cuatro, que se localiza en el Km. 2.5 de la carretera Cuautitlán Teoloyucan municipio de Cuautitlán Izcalli México.

Se utilizaron 12 perros machos de talla mediana, mestizos, con un peso entre 22 y 25kg., de 2 a 3 años de edad clínicamente sanos, donados por el Centro de Control Canino de Cuautitlán Izcalli; mismos que se manejaron de acuerdo a las especificaciones técnicas para el cuidado y el uso de animales de laboratorio de la norma: NOM-062-ZOO-1999, los cuales se dividieron aleatoriamente en tres grupos experimentales.

El trabajo quirúrgico, radiológico y hematológico se realizó en la clínica de pequeñas especies (Policlínica); y en el Centro Clínico y Diagnostico Medico Veterinario que se localiza en Hacienda de las Camelias num. 9B Fraccionamiento Real de Tultepec, Estado de Méx., los animales de experimentación se alojaron en la unidad de cirugía de la FES-Cuautitlán.

5.1 MANEJO DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN.

Los animales estuvieron durante 15 días antes del experimento en jaulas individuales; se les bañó con jabón medicado a base de piretrinas y con shampoo neutro, también se les desparasitó con ivermectina vía SC a dosis de 200 mcg/Kg. y con ampollitas cutáneas de imidacloprid; paralelamente se efectuaron evaluaciones físicas y de laboratorio para mantenerlos sanos. Todos los perros fueron alimentados con croqueta marca Hills® de mantenimiento donada por Pets Foods a razón de 300gms. por día, hasta concluir el experimento; se les proporcionó agua *ad libitum*, manteniéndolos en un ambiente confortable.

5.2 TRATAMIENTOS.

Se formaron tres grupos de cuatro animales cada uno (n=4), seleccionados al azar; al grupo 1 se le denominó Control (sólo osteosíntesis), al grupo 2 Injerto (osteosíntesis con injerto desmineralizado) y al grupo 3 TGF (osteosíntesis con injerto desmineralizado tratado con TGF β 1). A todos se les realizó una osteotomía en el tercio medio de la tibia y se estabilizaron por la técnica de fijación esquelética externa tipo II (Brinker, 1999; Flores, 2003).

5.3 OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS INJERTOS.

Los injertos utilizados fueron obtenidos de huesos escápulas de perros sanos previamente sacrificados, se limpiaron perfectamente de tejido blando, se lavaron muy bien con agua corriente y jabón, luego se enjuagaron con agua destilada y se desecaron a la sombra durante 48hrs. Posteriormente se introdujeron en un frasco de plástico opaco y se colocaron en un lugar libre de la luz; la desmineralización se llevó a cabo utilizando una solución ácida siendo el principio en que se basa el proceso en la solubilidad de sales metálicas en ácidos.

El calcio se encuentra en los huesos especialmente como fosfatos y carbonatos, siendo ligeramente solubles en agua; un ácido actuará para liberar el calcio de su combinación con los aniones y generará un intercambio de iones para producir una sal de calcio soluble.

La fórmula usada para este fin es:

Mezcla de Ácido Clorhídrico-Sodio de Van Ebner:

Ácido Clorhídrico concentrado	15	ml
Cloruro de Sodio puro	175	grms.
Agua destilada	1000	ml.

Para la descalcificación se agregó a la mezcla diariamente durante quince días, 5ml de ácido clorhídrico a la fórmula, preferiblemente a la misma hora, así hasta lograr la completa descalcificación; la cual se valoró de la siguiente manera:

- a) Consistencia y Color: Blanda y Semitransparente.
- b) Flexibilidad: De goma.
- c) Inserción de la aguja: Así verificamos si ya no había resistencia a su paso, lo que indicaba depósitos de calcio dentro del tejido (Stevenson, 1985; Rojas, 2002).

Cuando los injertos estuvieron listos, se cortaron las tablas de las escápulas en forma rectangular, retirando la espina; de tal manera que se obtuvieran dos injertos por escápula, los cuales fueron sumergidos con agua destilada estéril durante 24hrs., realizado esto se sumergieron en 5ml de agua desionizada y se mantuvieron en pequeños frascos en refrigeración a 4° hasta su utilización. Este proceso se les realizó a todos los injertos. El TGF β 1, fue donado por la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, es una proteína recombinante humana, creada por ingeniería genética. Los injertos que fueron tratados con TGF β 1; se deshidrataron en el horno de microondas a mínima potencia, durante 25 min. (Dependiendo del fabricante), posteriormente se mantuvieron en cajas de petri con 5ml de agua desionizada, dos injertos por caja, adicionando una dosis única de 5ngms/ml de TGF β 1, 48hrs antes de ser usados, en refrigeración a 4°C.

5.4 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.

Los animales fueron sometidos a cirugía, sin tener ningún criterio de selección ni de preparación preoperatorio especial; se prepararon siguiendo los principios básicos de la cirugía y posteriormente se canalizaron utilizando solución salina fisiológica con previo cálculo de terapia de fluidos.

En la medicación prequirúrgica se utilizó como preanestésico, Xilacina vía IM a dosis de 1.1mg/kg. y como anestésico, Pentobarbital sódico vía IV a dosis de 20mg/kg.; luego se colocó la entubación endotraqueal, terminado el preoperatorio con el embrocado de la zona quirúrgica con cloruro de benzalconio (Plumb, 2002).

Se colocó al paciente en decúbito dorsal, sujetando el miembro a ser operado en alto, durante toda la cirugía, para dar el soporte y la estabilidad adecuados, se utilizó la fijación esquelética externa tipo II estándar denominada de clavos transfixiantes, que consiste en pasar cuatro clavos percutáneos de Steinmann de acero inoxidable, utilizando un taladro eléctrico inalámbrico (150 RPM) a través de ambas superficies cutáneas y ambas corticales óseas, la distribución de estos fueron dos clavos distales en forma perpendicular al eje axial con un ángulo de 45° a los extremos del hueso y dos con un ángulo de 90°, los clavos tienen una numeración de distal a craneal; primero se introduce el clavo I, le sigue el IV, luego el II y finalmente el III, siguiendo estrictamente este orden. Una vez colocados los clavos, se puso una barra conectora elaborada con acrílico dental polimetilmetacrilato, marca Arias® por la cara lateral del miembro (Borjab, 2001; Knecht, 1990; Duran, 2001).

La incisión en la piel, tejido subcutáneo y fascia crural se realizó a la altura del cóndilo tibial medial a nivel tercio medio y se curvó cranealmente a la línea media de la tibia para descender a la mitad del cuerpo, después se curvó caudalmente en dirección al maleolo medial, siendo de aproximadamente 4cm de longitud. Aunque no es esencial, puede hacerse un esfuerzo por preservar los vasos safenos y el nervio que atraviesa la tibia.

La elevación de la fascia expone los músculos tibial craneal y flexor digital medial que se retraen por incisión de la fascia a lo largo de sus bordes para liberarlos del hueso. La arteria tibial craneal cursa entre la tibia y la fíbula, y puede dañarse con los extremos de los retractores de "Hohmann" si se colocan sobre la arteria.

Una vez ubicado el cuerpo de la tibia se realizó la osteotomía utilizando una broca ortopédica de 2.5mm de diámetro para realizar cuatro perforaciones sobre dos líneas uniéndolas con la perforación de otra broca de 3/4 de pulgada afinando el corte mediante una pinza de Ronyer hasta obtener un defecto óseo de 1cm de longitud, eliminando también la parte correspondiente de la fíbula, para evitar que interfiera en la reparación (sirviendo de puente osteogénico); se

enjuagó la zona con solución salina estéril. Dependiendo del grupo de animales, el defecto óseo en el grupo control no se cubrió con la placa de hueso desmineralizado (injertos), mientras que el grupo injerto y el grupo TGF si se cubrieron con la placa de hueso laminar, abarcando todo el diámetro de la tibia, tomando en cuenta el tratamiento previo del grupo TGF, fijándolo mediante suturas absorbibles (Vicril 2/0) para evitar su desplazamiento. La fascia crural se cerró de manera segura, se utilizaron puntos continuos de material absorbible (Knecht, 1990; Popesko, 1981; Summer, 1992).

La piel y el tejido subcutáneo se cerraron de manera rutinaria con puntos separados. Una vez reparados los planos incididos, se concluyó la fijación esquelética externa, colocando la segunda barra conectora del acrílico dental, por la cara medial del miembro, moldeando manualmente (Brinker, 1999; Charles, 1997; Popesko, 1981; Knecht, 1990).

Se tomaron placas radiográficas a dos proyecciones (cráneo-caudal y latero-medial) del miembro afectado a los animales de los tres grupos en experimentación, antes de comenzar la cirugía y al término de la misma; utilizándose estas, como las placas "control" (Douglas, 1975).

La medicación posquirúrgica se basó en Penicilina-Estreptomicina vía IM a dosis de 22,000UI/Kg de peso, cada 24hrs, durante siete días, diariamente se realizó limpieza de los clavos interfases con gasas estériles y solución de Clorhexidina. Las primeras 48hrs, se aplicó vendaje sobre las barras conectoras y los extremos de los clavos de fijación para proteger el aparato de soporte y el miembro afectado (Plumb, 2002; Borjab, 2001).

Durante los cuidados posquirúrgicos se efectuaron tres evaluaciones, la clínica, la sanguínea y la radiográfica.

5.5 EVALUACIÓN CLÍNICA.

La evaluación clínica se hizo en todos los animales diariamente, mediante observación directa; involucró, la toma de la temperatura rectal; el grado de inflamación de la zona quirúrgica medida con un vernier, tomando como puntos de referencia las caras cráneo-caudal (CC) y latero-medial (LM) expresadas en milímetros, además se constató el grado de claudicación, midiendo el apoyo en estática y en dinámica, usando para ello una escala modificada, descrita por Flores (2003) con los siguientes criterios:

APOYO CLÍNICO	
CRITERIOS	VALORACIÓN
NO APOYA EN ESTÁTICA Y DINÁMICA	1
PUNTEA EN ESTÁTICA	2
PUNTEA EN DINÁMICA	3
APOYA EN DINÁMICA Y ESTÁTICA	4

5.6 EVALUACIÓN SANGUÍNEA.

Esta evaluación se realizó semanalmente, en el Centro Clínico y Diagnóstico Médico Veterinario de acuerdo a las técnicas descritas en Coffin (1959), para lo cual se obtuvieron muestras de sangre por punción venosa de 6ml, colocando 3ml en tubos vacutainer con EDTA y los 3ml restantes en tubos sin anticoagulante, para proceder al conteo celular y al análisis, cuidando siempre el correcto manejo de las muestras (Schalm, 1970; Filmon, 2002).

5.7 EVALUACIÓN RADIOLÓGICA.

Semanalmente en cada paciente se tomó una placa radiográfica de los huesos tibia y fíbula, a 60 kv, 100 mili amperes y .03 seg.; estuviere injertado o fuese el control, para lo cual se utilizó un equipo de RX de 150kv. 300 mili amperes, chasis con pantallas intensificadoras y placas radiográficas sensibles al azul, donadas por la Policlínica (Douglas, 1975).

Se utilizó la técnica de dos proyecciones: cráneo-caudal y latero-medial (Douglas, 1975). Cada placa radiográfica fue valorada por cuatro médicos, obteniéndose el promedio de la respuesta ósea en la capa perióstica, endóstica o en el espacio interfragmentario, determinándose en cada una la aparición de material radio opaco en el área del espacio del defecto (canal medular) y/o sobre el hueso, (San Julián, 2000) pero modificando los criterios de evaluación de acuerdo a la siguiente escala:

RESPUESTA ÓSEA	
CRITERIOS	VALORACIÓN
SIN RESPUESTA	1
RESPUESTA DEL 0 AL 25%	2
RESPUESTA DEL 26% AL 50%	3
RESPUESTA DEL 51% AL 75%	4
RESPUESTA DEL 76% AL 100%	5

Después de cinco semanas de haber sido operados, los animales se sacrificaron con una sobredosis de anestesia, usando Pentobarbital sódico vía IV lenta (Plumb, 2002).

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

5.8.1 Determinación y justificación del método estadístico.

El modelo estadístico elegido permite observar la relación que existe entre las variables respuesta por efecto de los tratamientos, la asociación de las mismas y además permite predecir el comportamiento de los tres grupos a través del tiempo (Montgomery, 1996).

5.8.2 Análisis estadístico.

Se utilizó el modelo de Regresión lineal para evaluar el comportamiento de cada variable en el curso de los días.

Modelo:

$$\hat{Y}_i = \alpha + \beta(X_i)$$

En donde:

\hat{Y}_i = Variable estimada

α = Intersección (valor de Y cuando X vale 0)

β = Pendiente (cambios de Y por unidad de cambio en X)

X_i = Cualquiera de las variables

La estimación de los parámetros de regresión α y β se efectuó con el paquete Excel[®] de Office versión 1998 de Microsoft; posteriormente se utilizó el paquete Statistica[®] versión 1997 (Wayne, 2002; Berenson, 1992; Murray, 1995).

Para estimar el grado de asociación de las variables mediante la correlación (r) de Pearson y explicar la confianza en el modelo por medio del coeficiente de determinación (r^2) se utilizó la siguiente fórmula:

Modelo:

$$r_{xy} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}}$$

En donde:

r_{xy} = Coeficiente de correlación entre dos variables

$\sum xy$ = Suma de productos cruzados de dos variables

$(\sum x \sum y)/n$ = Suma de la variable x por la suma de la variable y; dividido entre el número de pares de valores

$\sqrt{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}$ = Varianza de la variable x

$\sqrt{\sum y^2 - (\sum y)^2/n}$ = Varianza de la variable y

En el caso de las correlaciones finales semanales se probó la significancia en cuanto a la asociación de las variables, utilizando exclusivamente los valores registrados en la observación semanal, considerando que estos son una muestra aleatoria del comportamiento durante los 35 días de medición (MendenHall, 1997; Wayne, 2002; Montgomery, 1996; Mark, 1992).

Para evaluar el efecto de tratamiento se utilizó un modelo de regresión lineal múltiple considerando como variables independientes los días y el tratamiento, registrando como variables dependientes: temperatura, claudicación (apoyo clínico), inflamación cráneo-caudal y latero-medial, respuesta ósea en espacio inter-fragmentario, respuesta ósea perióstica, respuesta ósea endóstica, fosfatasa alcalina sérica, glóbulos blancos, glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina.

Modelo:

$$\hat{Y}_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 (X_i) + \beta_2 (X_j) + \varepsilon_k$$

En donde:

- \hat{Y}_{ijk} = Variable respuesta
- β_0 = Intercepto (α)
- β_1 = Pendiente determinada en la variable X_i ;
donde $i = 1,2,3,\dots,35$ días
- β_2 = Pendiente determinada en la variable X_j ;
donde $j = 1,2$ y 3 tratamientos
- ε_k = Error aleatorio

5.8.3 Descripción de datos.

Las unidades en que se evaluó cada variable fueron las siguientes: la temperatura corporal medida en °C, la inflamación cráneo-caudal y latero-medial, en milímetros; la claudicación se valoró según la tabla elaborada para determinar los grados acorde con la observación clínica, siguiendo el mismo procedimiento para evaluar la respuesta ósea; en los hemogramas, la fosfatasa alcalina sérica corresponde a unidades internacionales, los glóbulos blancos a miles por milímetro cúbico, los glóbulos rojos a millones por milímetro cúbico, el hematocrito a porcentaje y la hemoglobina a gramos por decilitro.

Los promedios de las variables temperatura, claudicación e inflamación cráneo-caudal y latero-medial se estimaron por día y los promedios de la respuesta ósea y de los hemogramas por semana en cada tratamiento (Johnson, 1999).

5.8.4 Supuestos.

Se supone que los datos son muestras independientes (casos) extraídas de una población con características similares; excepto por la condición estudiada (tratamientos), se supone que los datos cuantitativos siguen una distribución normal con varianzas iguales; y es así como se utilizó un método inductivo con 3 tratamientos y 105 casos.

5.8.5 Hipótesis estadística.

H_0 = la pendiente de regresión es igual en los tres tratamientos.

H_A = al menos un tratamiento es diferente en su pendiente, del tratamiento control.

5.8.6 Decisión estadística.

Para comprobar la diferencia entre las pendientes de los tratamientos se utilizó la prueba de T ($P < 0.05$) mediante el programa de cómputo Statistica[®] V.6 (Wayne, 2002).

6.0 RESULTADOS

Se presentan las gráficas comparativas de los tres grupos de experimentación, con los datos de las cinco semanas asentando los resultados clínicos y sanguíneos, las placas radiográficas y los resultados estadísticos.

6.1 RESULTADOS DE EVALUACIÓN CLÍNICA.

6.1.1 Temperatura corporal.

Como se puede observar los tres grupos durante la primera semana mostraron un comportamiento similar, sin embargo el grupo control a la segunda semana tuvo un ligero incremento, contrariamente al comportamiento del grupo injerto y el grupo TGF, los cuales declinaron en esta semana; en la tercera semana el grupo injerto es el que muestra un incremento que después, baja en la cuarta, en esta misma semana el grupo control mostró nuevamente un incremento de la temperatura mientras que los otros grupos se mantuvieron constantes (gráfico 1).

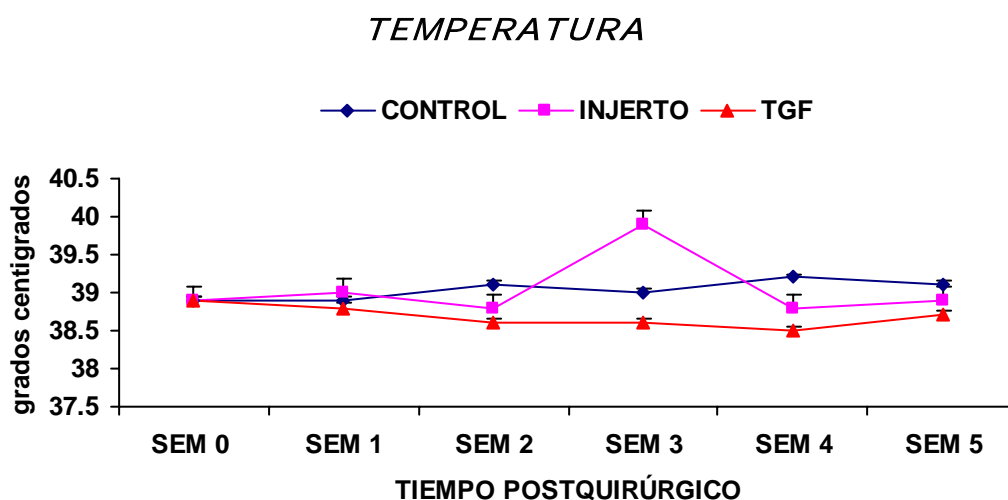


Gráfico 1.- Registro de la temperatura corporal comparativa de los tres grupos experimentales. Cada valor representa el promedio \pm una desviación estándar.

6.1.2 Apoyo clínico.

En el gráfico se muestran los valores obtenidos de las mediciones tal y como se propuso en la metodología. Como se puede observar los grupos control e injerto, mostraron una tendencia de apoyar tempranamente, siendo mejor el grupo control a la segunda semana, que el del grupo injerto y que a partir de la tercera semana el comportamiento de los dos fue similar.

El grupo TGF mostró un mejor apoyo hasta la segunda semana, disminuyendo ligeramente a la tercera y cuarta semana, pero mejorando al final del experimento. Sin mostrarse a la comparación diferencia estadística entre los tres grupos (gráfico 2).

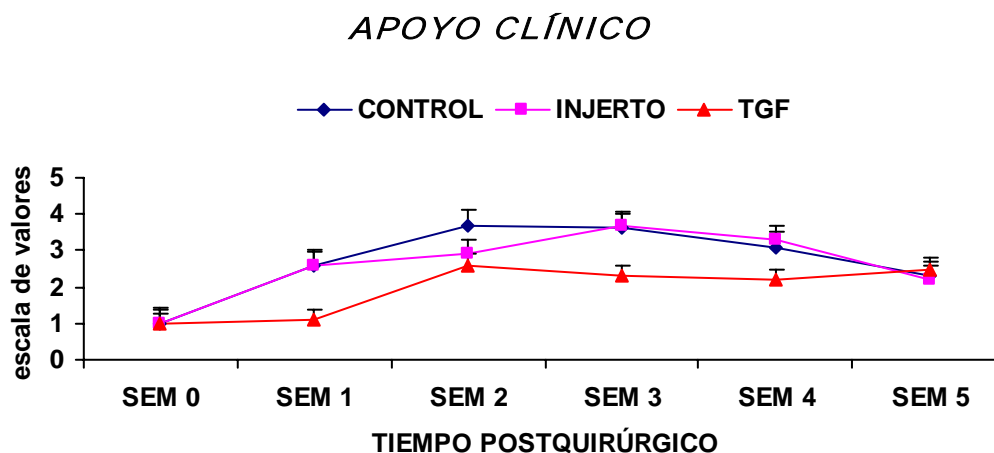


Gráfico 2.- Evaluación clínica del apoyo en dinámica y estática comparativa de los tres grupos experimentales. Se evaluó el grado de apoyo de la extremidad durante la marcha, de al menos cinco metros recorridos de distancia. Cada valor representa el promedio por semana, \pm una desviación estándar.

6.1.3 Inflamación cráneo- caudal.

Obsérvese que los tres grupos mostraron un comportamiento similar de incremento en su diámetro a la primera semana, inmediatamente el grupo control mostró una disminución a la segunda semana la que mantuvo mas o menos estable hasta el final, dándose esta disminución en el grupo injerto y el grupo TGF hasta la tercera semana, la cual en el grupo injerto decreció en forma paulatina, mientras que en el grupo TGF se mantuvo con mínimos cambios (gráfico 3).

INFLAMACION CRÁNEO-CAUDAL

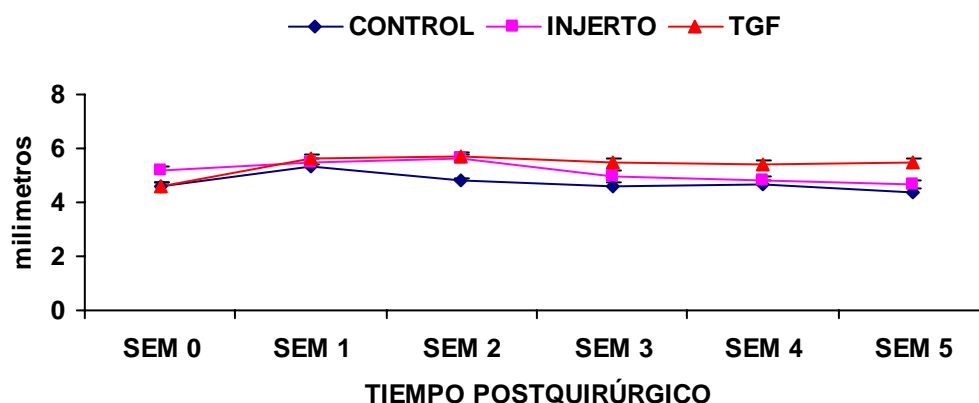


Gráfico 3.- Evaluación del proceso inflamatorio de la cara craneo-caudal expresada en milímetros. Los valores representan la diferencia con respecto al diámetro inicial del promedio por semana, \pm una desviación estándar.

6.1.4 Inflamación latero-medial.

El grupo control y el grupo injerto presentan un incremento a la primera semana que después fue declinando en forma muy similar, sin embargo el grupo control presentó una mayor disminución e inclusive terminó por debajo del dato inicial, por otro lado el grupo TGF después de mostrar de igual forma, un incremento del diámetro en la primer semana, no mostró gran variación y se mantuvo constante hasta la finalización del experimento (gráfico 4).

INFLAMACION LATERO-MEDIAL

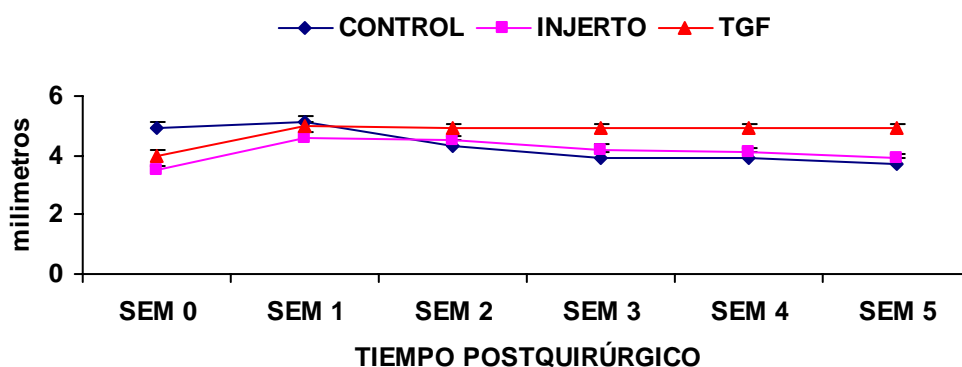


Gráfico 4.-Evaluación del proceso inflamatorio de la cara latero-medial expresada en milímetros. Los valores representan la diferencia con respecto al diámetro inicial del promedio por semana, \pm una desviación estándar.

6.2 RESULTADOS DE EVALUACIÓN SANGUÍNEA.

6.2.1 Glóbulos rojos.

La evaluación de la fórmula roja; incluye los glóbulos rojos, cuyos parámetros normales son 5.5 – 8.5 millones por mm^3 , por lo tanto se puede observar que no mostraron alteraciones ninguno de los tres grupos durante las primeras cuatro semanas, excepto en la segunda, donde el grupo TGF tuvo una disminución, la cual se corrigió al final del experimento; así mismo durante la quinta, el grupo control e injerto disminuyeron ligeramente, por debajo de los límites normales, sin que esto representara diferencia estadística (gráfico 5).

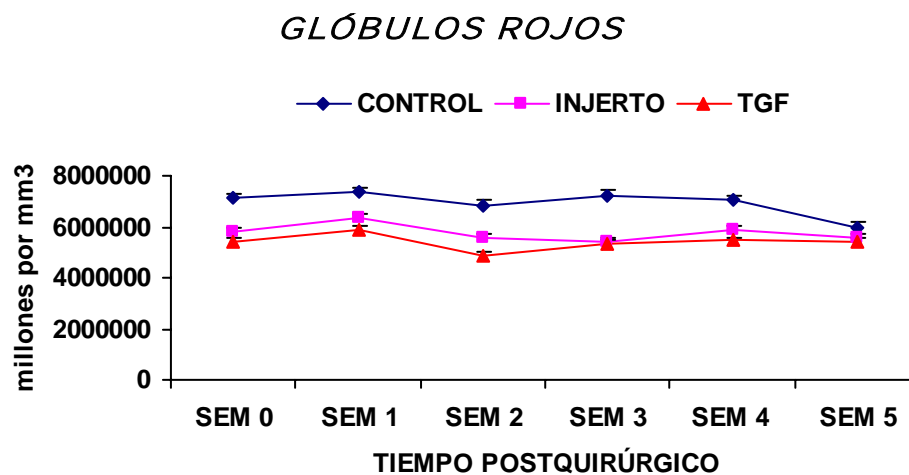


Gráfico 5.- Conteo de células rojas comparadas en los tres grupos experimentales. Cada valor representa el promedio por semana, \pm una desviación estándar.

6.2.2 Hematocrito.

En lo referente al hematocrito, el grupo TGF mostró una disminución en la segunda semana, normalizándose a la tercera semana, por su parte, el grupo injerto y el grupo control, mostraron una ligera disminución a la quinta semana (gráfico 6).

HEMATOCRITO

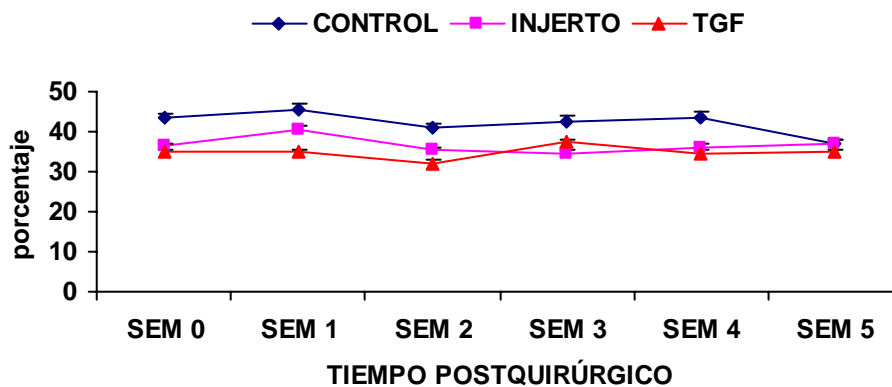


Gráfico 6.- Registro del hematocrito comparado en los tres grupos experimentales. Cada valor representa el promedio por semana, \pm una desviación estándar.

6.2.3 Hemoglobina.

En la concentración de la hemoglobina (gráfico 7), no se mostraron cambios sobresalientes, manteniéndose dentro de los límites normales (12 – 18 gr/dl), en los tres grupos durante el experimento.

HEMOGLOBINA

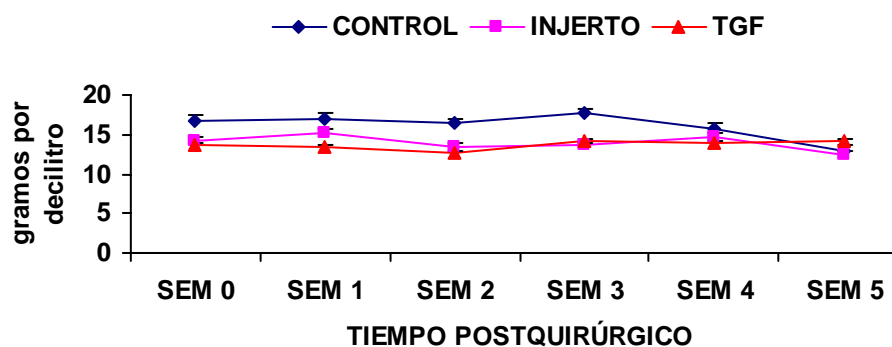


Gráfico 7.- Registro de la hemoglobina comparada en los tres grupos experimentales. Cada valor representa el promedio por semana, \pm una desviación estándar.

6.2.4 Glóbulos blancos.

En cuanto a la fórmula blanca, los tres grupos se mantuvieron dentro de los rangos superiores normales, sin embargo el grupo TGF a la quinta semana mostró un ligero incremento, como se muestra en el gráfico 8.

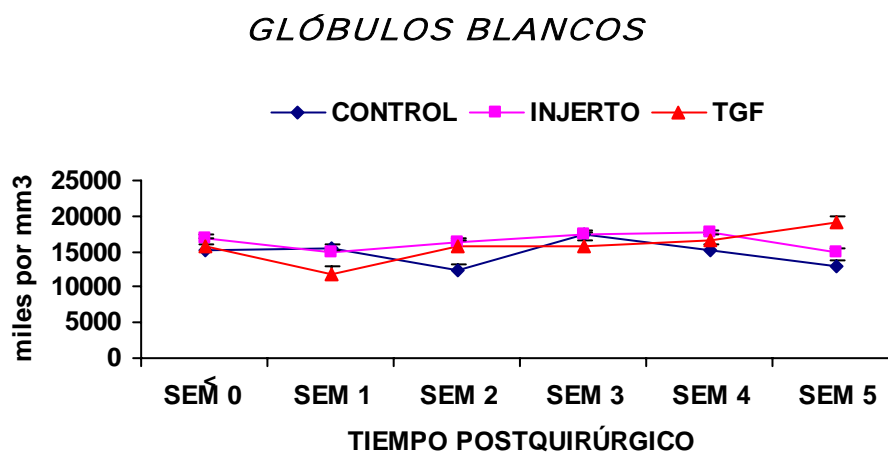


Gráfico 8.- Conteo de células blancas comparadas en los tres grupos experimentales. Cada valor representa el promedio por semana, \pm una desviación estándar.

6.2.5 Fosfatasa alcalina sérica.

En la evaluación de la fosfatasa alcalina sérica (gráfico 9), los tres grupos, se mantuvieron dentro de los parámetros normales (15 – 69 U/L).

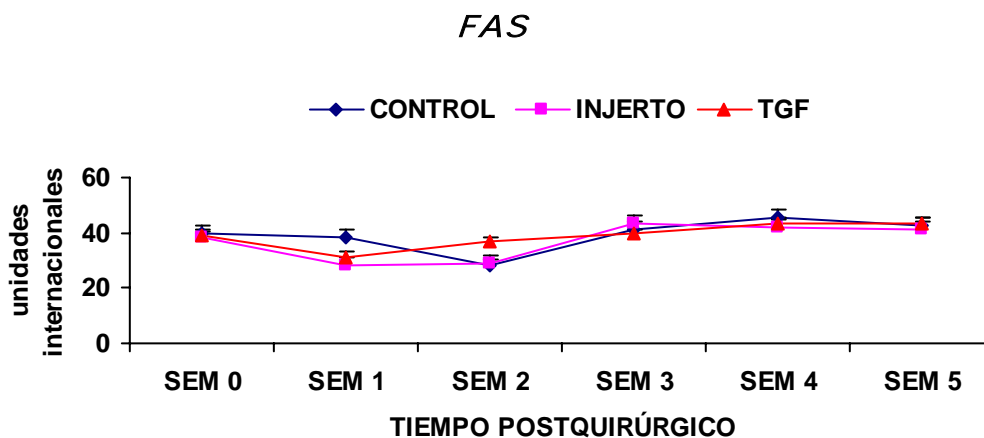


Gráfico 9.- Registro de la FAS comparada en los tres grupos experimentales. Cada valor representa el promedio por semana, \pm una desviación estándar.

6.3 RESULTADOS DE EVALUACIÓN RADIOLÓGICA.

6.3.1 Respuesta ósea perióstica.

El engrosamiento óseo como respuesta del periostio en los tres grupos, mostraron pequeñas diferencias durante todo el experimento, sin embargo el grupo TGF, inicia un notable incremento hasta la segunda semana, superando a los otros grupos en la tercera y quinta semana (gráfico 10).

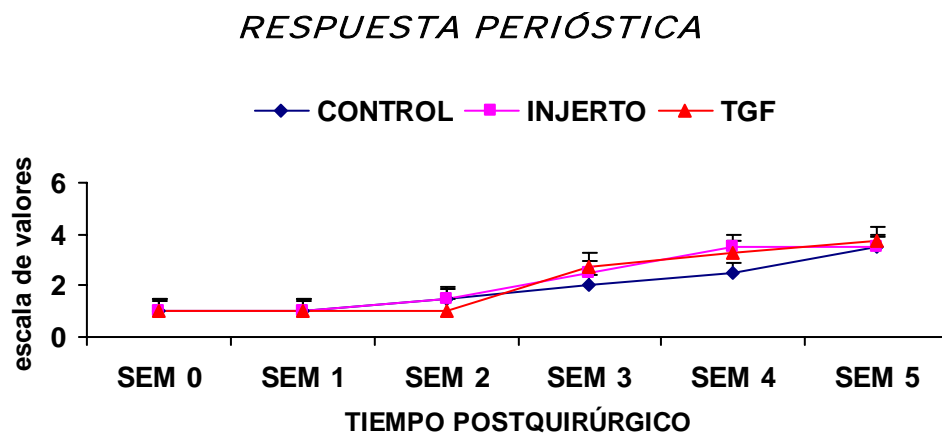


Gráfico 10.- Evaluación de la respuesta ósea perióstica. Se valoró la aparición de material radio-opaco en el sitio del defecto. Cada valor representa el promedio por semana, \pm una desviación estándar.

6.3.2 Respuesta ósea endóstica.

Durante las primeras dos semanas no se observó reacción endóstica en ninguno de los tres grupos, siendo que a la tercera semana el grupo injerto mostró un ligero incremento, el cual fue aumentando hasta la quinta semana, mientras que el grupo control y TGF incrementaron a la cuarta semana, siendo mayor en el grupo TGF (gráfico 11).

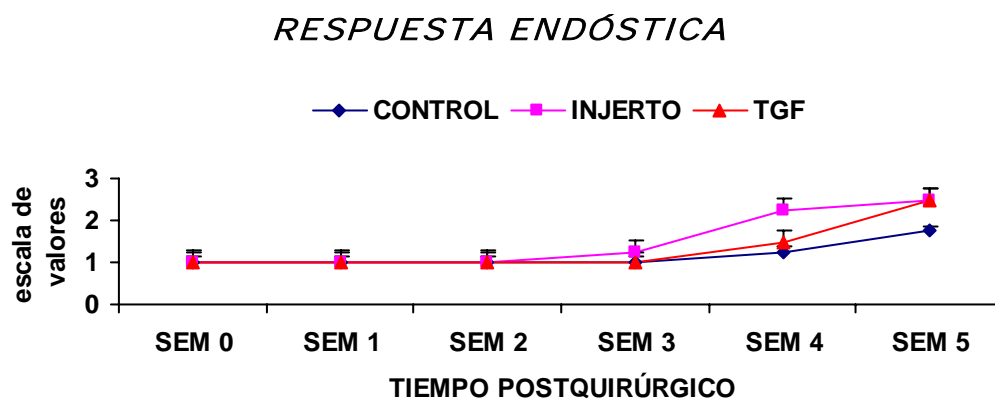


Gráfico 11.- Evaluación de la respuesta ósea endóstica. Se valoró la aparición de material radio-opaco en el sitio del defecto. Cada valor representa el promedio por semana, \pm una desviación estándar.

6.3.3 Respuesta ósea en espacio interfragmentario.

En relación a la presencia de material radio opaco en la zona del defecto óseo, los grupos control e injerto no mostraron ningún cambio durante todo el experimento, lo que no sucedió con el grupo TGF, ya que a partir de la segunda semana mostró un incremento paulatino hasta la quinta semana, siendo muy evidente la respuesta (gráfico 12).

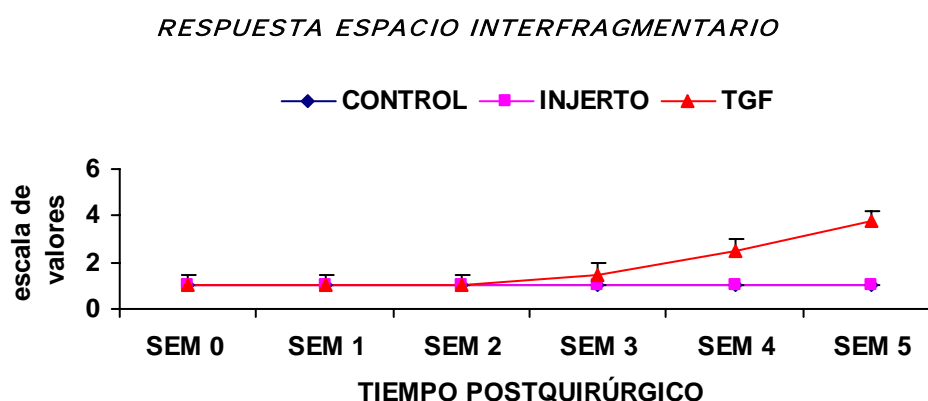


Gráfico 12.- Evaluación de la respuesta en espacio interfragmentario. Se valoró la aparición de material radio-opaco en el sitio del defecto. Cada valor representa el promedio por semana, \pm una desviación estándar.

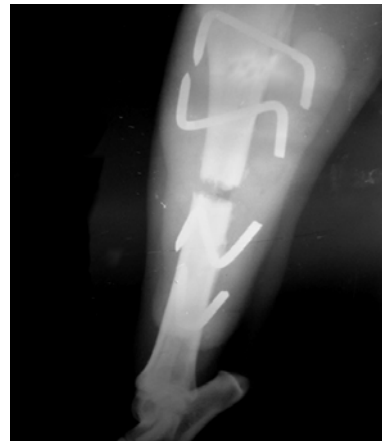
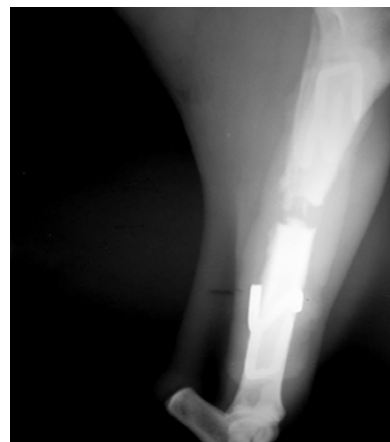
6.4 PLACAS RADIOGRÁFICAS.

Se presenta la evaluación conforme a los parámetros mencionados en la metodología, por semana y por grupo experimental, tomando en cuenta respuesta endóstica, respuesta perióstica y respuesta en el área de la fractura inducida (espacio interfragmentario).

Para una mejor observación de la respuesta ósea, se colocaron las placas de ambas tomas (LM y CC), colocadas por grupo experimental, tomando en consideración solamente la semana uno que se utilizó como semana control, la semana tres que se tomó como la media del trabajo y la semana cinco que fue la que arrojó la evidencia final de la respuesta ósea.

**(A)****(B)****(C)****(D)****(E)****(F)**

Evaluación Radiológica Postquirúrgica semana uno; tomas craneo-caudal y latero-medial. Placas A y B perro control, placas C y D perro injertado y placas E y F perro injertado tratado con TGF.

**(A)****(B)****(C)****(D)****(E)****(F)**

Evaluación Radiológica Postquirúrgica semana tres; tomas craneo-caudal y latero-medial. Placas A y B perro control, placas C y D perro injertado y placas E y F perro injertado tratado con TGF.

**(A)****(B)****(C)****(D)****(E)****(F)**

Evaluación Radiológica Postquirúrgica semana cinco; tomas craneo-caudal y latero-medial. Placas A y B perro control, placas C y D perro injertado y placas E y F perro injertado tratado con TGF.

6.5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El comportamiento de cada variable en el curso de los días, analizada mediante el procedimiento de regresión lineal se presenta en los siguientes cuadros:

Los parámetros de regresión α y β que caracterizan el comportamiento de las variables: temperatura, apoyo clínico, inflamación latero-medial e inflamación cráneo-caudal, durante 35 días de observación diaria en cada tratamiento, se presentan en el cuadro 1.

VARIABLE	CTX		INJERTO		TGF	
	ALFA	BETA	ALFA	BETA	ALFA	BETA
TEMP	39.02	0.00	38.96	0.00	38.81	-0.01
APOYO	3.34	-0.01	3.08	0.00	1.59	0.03
LAT-MED	4.96	-0.04	4.74	-0.03	4.93	0.00
CRA-CAU	5.20	-0.02	5.68	-0.03	5.72	-0.01

Cuadro 1.- Parámetros de regresión α y β obtenidos por tratamiento, durante 35 días de observación diaria en cada variable. n.= 35

Los parámetros de regresión α y β que caracterizan el comportamiento de las variables: fosfatasa alcalina sérica, glóbulos blancos, glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, respuesta perióstica, respuesta endóstica y respuesta en espacio inter fragmentario, durante intervalos de 7 días, registrados en cada tratamiento, se presentan en el cuadro 2.

VARIABLE	CONTROL		INJERTO		TGF	
	ALFA	BETA	ALFA	BETA	ALFA	BETA
FAS	30.15	0.47	20.98	0.84	29.24	0.46
GB	14080.00	56.07	14300.00	126.43	11208.75	217.61
GR	7180550.00	-3521.43	6093750.00	-14642.86	5502500.00	-4285.71
HG	17.16	-0.02	14.65	-0.02	12.77	0.04
HTO	43.66	-0.02	39.38	-0.14	34.03	0.04
PERIOSTIO	0.30	0.09	0.30	0.10	0.03	0.11
ENDOSTIO	0.68	0.03	0.33	0.06	0.35	0.05
ESPACIO	1.00	0.00	1.00	0.00	-0.15	0.10

Cuadro 2.- Parámetros de regresión α y β obtenidos por tratamiento, durante intervalos de 7 días en cada variable. n.= 6

La correlación entre las variables estudiadas con datos obtenidos mediante un muestreo semanal se presenta a continuación, en los cuadros 3, 4, y 5:

VARIABLE	APOYO	CRA-CAU	LAT-MED	TEMP	FAS	GB	GR	HTO	HG	ESPACIO	PERIOSTIO	ENDOSTIO
APOYO	1.00	0.25	-0.51	-0.17	-0.07	-0.03	-0.52	-0.71	-0.12	0.00	0.02	-0.18
CRA-CAU	0.25	1.00	0.56	0.08	-0.85*	-0.54	-0.23	-0.48	0.38	0.00	-0.77	-0.71
LAT-MED	-0.51	0.56	1.00	-0.29	-0.81*	-0.62	0.07	0.06	0.28	0.00	-0.75	-0.45
TEMP	-0.17	0.08	-0.29	1.00	0.39	0.50	0.43	0.33	0.33	0.00	0.18	-0.04
FAS	-0.07	-0.85*	-0.81*	0.39	1.00	0.79	0.33	0.44	-0.19	0.00	0.84*	0.63
GB	-0.03	-0.54	-0.62	0.50	0.79	1.00	0.68	0.46	0.43	0.00	0.49	0.36
GR	-0.52	-0.23	0.07	0.43	0.33	0.68	1.00	0.84*	0.65	0.00	-0.13	-0.15
HTO	-0.71	-0.48	0.06	0.33	0.44	0.46	0.84*	1.00	0.16	0.00	0.01	-0.05
HG	-0.12	0.38	0.28	0.33	-0.19	0.43	0.65	0.16	1.00	0.00	-0.41	-0.29
ESPACIO	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00
PERIOSTIO	0.02	-0.77	-0.75	0.18	0.84*	0.49	-0.13	0.01	-0.41	0.00	1.00	0.91*
ENDOSTIO	-0.18	-0.71	-0.45	-0.04	0.63	0.36	-0.15	-0.05	-0.29	0.00	0.91*	1.00

Cuadro 3.- Correlación entre las variables estudiadas con datos obtenidos mediante un muestreo semanal en el grupo control; con asteriscos (*) se presentan los valores significativos ($P<0.05$); n.= 6

VARIABLE	APOYO	CRA-CAU	LAT-MED	TEMP	FAS	GB	GR	HTO	HG	ESPACIO	PERIOSTIO	ENDOSTIO
APOYO	1.00	-0.08	0.66	-0.16	0.23	0.36	-0.55	-0.55	-0.44	0.00	0.19	-0.09
CRA-CAU	-0.08	1.00	0.49	-0.36	-0.82*	-0.70	-0.02	0.27	-0.19	0.00	-0.90*	-0.76
LAT-MED	0.66	0.49	1.00	-0.57	-0.09	0.17	-0.72	-0.60	-0.79	0.00	-0.16	-0.17
TEMP	-0.16	-0.36	-0.57	1.00	-0.15	-0.22	0.70	0.52	0.85*	0.00	0.02	-0.14
FAS	0.23	-0.82*	-0.09	-0.15	1.00	0.95*	-0.53	-0.73	-0.38	0.00	0.92*	0.86*
GB	0.36	-0.70	0.17	-0.22	0.95*	1.00	-0.67	-0.87*	-0.55	0.00	0.90*	0.85*
GR	-0.55	-0.02	-0.72	0.70	-0.53	-0.67	1.00	0.94*	0.96*	0.00	-0.31	-0.32
HTO	-0.55	0.27	-0.60	0.52	-0.73	-0.87*	0.94*	1.00	0.86*	0.00	-0.58	-0.56
HG	-0.44	-0.19	-0.79	0.85*	-0.38	-0.55	0.96*	0.86*	1.00	0.00	-0.20	-0.29
ESPACIO	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00
PERIOSTIO	0.19	-0.90*	-0.16	0.02	0.92*	0.90*	-0.31	-0.58	-0.20	0.00	1.00	0.93*
ENDOSTIO	-0.09	-0.76	-0.17	-0.14	0.86*	0.85*	-0.32	-0.56	-0.29	0.00	0.93*	1.00

Cuadro 4.- Correlación entre las variables estudiadas con datos obtenidos mediante un muestreo semanal en el grupo con injerto; con asteriscos (*) se presentan los valores significativos ($P<0.05$); n.= 6

VARIABLE	APOYO	CRA-CAU	LAT-MED	TEM	FAS	GB	GR	HTO	HG	ESPACIO	PERIOSTIO	ENDOSTIO
APOYO	1.00	0.48	0.58	-0.48	0.93*	0.80	-0.25	0.43	0.76	0.63	0.71	0.57
CRA-CAU	0.48	1.00	0.83*	-0.64	0.36	0.34	-0.78	-0.16	-0.08	-0.17	-0.02	-0.22
LAT-MED	0.58	0.83*	1.00	-0.52	0.65	0.69	-0.79	-0.37	0.06	0.28	0.44	0.17
TEM	-0.48	-0.64	-0.52	1.00	-0.35	-0.20	0.06	-0.15	-0.24	0.16	-0.22	0.35
FAS	0.93*	0.36	0.65	-0.35	1.00	0.95*	-0.28	0.26	0.76	0.82*	0.88*	0.74
GB	0.80	0.34	0.69	-0.20	0.95*	1.00	-0.41	0.12	0.66	0.86*	0.86*	0.78
GR	-0.25	-0.78	-0.79	0.06	-0.28	-0.41	1.00	0.47	0.29	-0.03	0.04	-0.07
HTO	0.43	-0.16	-0.37	-0.15	0.26	0.12	0.47	1.00	0.78	0.21	0.15	0.22
HG	0.76	-0.08	0.06	-0.24	0.76	0.66	0.29	0.78	1.00	0.72	0.73	0.66
ESPACIO	0.63	-0.17	0.28	0.16	0.82*	0.86*	-0.03	0.21	0.72	1.00	0.91*	0.97*
PERIOSTIO	0.71	-0.02	0.44	-0.22	0.88*	0.86*	0.04	0.15	0.73	0.91*	1.00	0.78
ENDOSTIO	0.57	-0.22	0.17	0.35	0.74	0.78	-0.07	0.22	0.66	0.97*	0.78	1.00

Cuadro 5.- Correlación entre las variables estudiadas con datos obtenidos mediante un muestreo semanal en el grupo de injerto tratado con TGF; con asteriscos (*) se presentan los valores significativos ($P < 0.05$); $n = 6$

De acuerdo al modelo de regresión lineal múltiple utilizado para evaluar el efecto del tiempo transcurrido en los días posteriores a la intervención quirúrgica así como el efecto del tratamiento, en el cuadro 6 y 7 se presentan los parámetros del mismo, (β_0 , β_1 , β_2 y r^2) registrando como variables dependientes: temperatura, apoyo clínico, inflamación latero-medial y cráneo-caudal, fosfatasa alcalina sérica, glóbulos blancos, glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, respuesta ósea perióstica, respuesta ósea endóstica y respuesta ósea en espacio inter-fragmentario.

VARIABLE	β_0 (α)	B_1 (DIAS)	B_2 (TRATAMIENTO)	r^2
TEMP	39.34	-0.06	-0.64*	0.41
APOYO	3.58	0.06	-0.50*	0.24
LAT-MED	4.12	-0.45*	0.60*	0.55
CRA-CAU	4.75	-0.49*	0.69*	0.72

Cuadro 6.- Parámetros de regresión (β_0 , β_1 , β_2 y r^2) registrando como variables dependientes: temperatura, apoyo clínico, inflamación latero-medial e inflamación cráneo-caudal. Los valores significativos ($P < 0.05$) se presentan con asterisco (*) $n = 35$

VARIABLE	β_0 (α)	B_1 (DIAS)	B_2 (TRATAMIENTO)	r^2
FAS	31.67	0.88*	-0.06	0.76
GB	12.26	0.74*	0.20	0.54
GR	7896127.66	-0.10	-0.89*	0.77
HG	17.64	0.003	-0.81*	0.62
HTO	46.95	-0.11	-0.82*	0.64
PERIOSTIO	0.36	0.94*	0.08	0.89
ENDOSTIO	0.55	0.77*	0.12	0.57
ESPACIO	0.009	0.44*	0.46*	0.33

Cuadro 7.- Parámetros de regresión, (β_0 , β_1 , β_2 y r^2) registrando como variables dependientes: fosfatasa alcalina sérica, glóbulos blancos, glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, respuesta ósea perióstica, respuesta ósea endóstica, y respuesta ósea en espacio inter-fragmentario. Los valores significativos ($P < 0.05$) se presentan con asterisco (*) n.= 6

7.0 DISCUSIÓN

Dentro del tratamiento de algunas patologías óseas a través de la cirugía ortopédica, y sobre todo en las fracturas, ha surgido la necesidad de utilizar materiales que permitan la optimización de los procedimientos de reparación. El primer reporte sobre la utilización de estos materiales fue realizado por Senn en 1889, el cual utilizó hueso desmineralizado para reparar defectos óseos (Rivera 2003).

La utilización de injertos y de matrices óseas alogénicas utilizadas por Urist desde 1965, han permitido realizar diferentes estudios, con el fin de buscar mejores procedimientos en la utilización de estos y que apoyan las bases de nuestro trabajo.

En los estudios realizados por varios autores Urist 1970, Zhang 1997, Flores 2003 sobre el uso de aloinjertos desmineralizados, se contribuye para apoyar la capacidad que tienen estos de osteoconducción y osteoinducción. Fleming 2000, bajo los conceptos de ingeniería tisular ósea ortopédica, enmarca la osteogénesis celular, vascularización y estabilización en los sitios de lesión ósea a través de la aplicación de aloinjertos.

En la búsqueda de la adición de ciertas sustancias o elementos que favorezcan la integración de los injertos o sustitutos óseos y por ende la reparación ósea, se han realizado numerosos estudios, entre los cuales tenemos a Rivera 2003, utilizando proteínas morfogénicas (PMO) en la injertación; Arnaud 2001, que utilizó el factor de crecimiento transformante (**TGF β 1**) adicionado a esqueletos de coral. Los resultados de estos trabajos, comprueban que los injertos que se aplican a defectos óseos proveen de ciertas características, como son la estabilidad del sitio de la fractura, y que sirven de molde o armazón para la integración de nuevo hueso, como lo afirma Burwell 2001.

En nuestro trabajo, en los dos grupos injertados, uno tratado con TGF- β 1 y el otro sin tratamiento, el injerto sirvió de puente, al establecer continuidad de los segmentos óseos y rellenar en forma parcial los defectos del hueso cortical estimulando la reparación con la formación de callo de puente y con esto el pronto proceso tridimensional de crecimiento interno en el que crecen capilares, tejido perivascular y las células osteoprogenitoras desde la base receptora a la estructura de un injerto (osteoconducción), establecido por Brinker 1999, lo cual se pudo observar clínicamente.

Si bien es sabido que el factor determinante para el apoyo de una extremidad fracturada depende del grado de estabilidad de la misma y el cual es proporcionado por el método de osteosíntesis (Brinker 1999, Sánchez-Valverde 1998 y Fossum 2000), en nuestro trabajo el uso del método de

Fijación Esquelética Externa como estabilización del defecto en los tres grupos resulto ser favorable para el apoyo, sobre todo en las dos primeras semanas, sin embargo en el grupo con TGF- β 1 se observó este efecto retardado; lo cual parece obedecer al efecto de proinflamación que promueve este factor citado por Stevenson 1995 y Hernández-Pando 2003, este último menciona que el TGF- β 1, es una citoquina sintetizada por osteoblastos que atraen células inflamatorias y macrófagos encargados de la limpieza, de todo el material necrótico de la fractura.

Por otro lado, la ligera disminución de apoyo mostrada por los tres grupos, a partir de la tercera semana, puede deberse a que durante la aplicación de los clavos transfixiantes a través del hueso, se provoca una termonecrosis por fricción en la interfase clavo-hueso, promoviendo el aflojamiento paulatino de estos y por ende una disminución progresiva de la estabilidad, reflejándose en el apoyo clínico (Fossum, 2000; Piza, 2001).

Las fracturas óseas son generalmente el resultado de un traumatismo que se acompañan con la producción de un hematoma y varios grados de lesión en tejidos blandos citado por Brinker 1999. La claudicación va acompañada de dolor e inflamación; misma que inicia después de una fractura y que persiste hasta la formación de nuevo hueso, como lo afirma Santoscoy 1994.

Sin embargo para que exista una adecuada reparación es importante mantener estable la línea de fractura, lo cual se logra controlando el movimiento en los extremos de esta, así como evitar la presencia de bacterias (Russell 1987). Por otro lado la deambulacion precoz del paciente permite la presentación de micromovimientos y la estimulación del flujo sanguíneo, los cuales permiten la optimización de la osteogénesis tal como lo menciona Tristam 2002.

El TGF- β 1 es un factor esencial en la regulación de la respuesta inflamatoria en la cual, hay una importante liberación de esta citocina en bajas concentraciones, promoviendo así la quimiotaxis de elementos celulares inflamatorios. Al progresar la inflamación existe una mayor cantidad de células que constituyen otra fuente de esta citocina y por ende el incremento de ella en la zona de lesión, por lo cual su participación proinflamatoria es indirecta. Por otra parte durante las etapas de la inflamación, el TGF- β 1 participa en el inicio de la regeneración y cicatrización del tejido lesionado (Hernández-Pando 2003), ya que en un principio se descubrió e identificó como un factor de crecimiento para fibroblastos que promovía la curación de heridas (Tristam 2002; Peralta 2001).

Durante la evaluación del proceso inflamatorio en la zona de lesión, tal y como se indica en la metodología, tanto en la cara latero-medial como craneo-caudal, en los tres grupos fue similar; el grupo TGF- β 1, mostró un comportamiento más estable lo cual parece obedecer al efecto proinflamatorio

que tiene esta citocina (Erlebacher 1998; Tristam 2002) que se caracteriza por el reclutamiento ordenado y progresivo de células inflamatorias; mas sin embargo, cuando la inflamación es extensa existen muchas células que producen TGF- β 1 induciendo a altas concentraciones de esta citocina, cuando el TGF- β 1 alcanza estas concentraciones tiene efecto antiinflamatorio, tal vez porque en este momento existen células macrofágicas diferenciadas que se desactivan ante la exposición a altas concentraciones de TGF- β 1. Por lo tanto, el efecto regulador del TGF- β 1 en la inflamación es dependiente de sus concentraciones y del grado de maduración de sus células blanco (Hernández-Pando 2003; Arnaud 2001; Hefferan 2000).

Los ligeros cambios de la temperatura en los tres grupos tratados durante el experimento, no se consideran estar relacionados con el tipo de tratamiento que recibieron cada uno de ellos, sin embargo algunos procedimientos de manejo, estrés y el hacinamiento, producen con facilidad un aumento en la temperatura de .5 a 1°C., aunado a esto la producción de calor se puede incrementar con actividad muscular (también con el temblor o actividad respiratoria elevada) y con el incremento de la actividad metabólica por la excitación, en intranquilidad relacionada con la exploración, como lo asegura Rijnberk 1991. Así mismo el propio proceso quirúrgico puede modificar la temperatura como lo menciona Santoscoy 1994 y Birchard 1996.

En la evaluación radiológica de la respuesta ósea se consideraron los cambios radiológicos del endostio, periostio y la presencia de material en el espacio Inter-fragmentario (defecto). En condiciones normales, durante el proceso de reparación se desarrollan mecanismos que permiten la diferenciación celular y la secreción de matriz extracelular por los osteoblastos, concluyendo con la mineralización de este tejido en la neoformación de hueso, lo cual se lleva a cabo en un tiempo que va desde la segunda semana hasta la octava y décima semana, observándose hasta entonces cambios radiológicos a partir de la tercera y quinta semana como lo menciona Brinker 1999. Por otro lado, la respuesta inflamatoria relacionada en la infiltración del injerto por yemas vasculares y la presencia de tejido de granulación fibrótica, actividad osteoclástica y autólisis de osteocitos, promueve una sustitución lenta del injerto óseo, manifestada por la diferenciación de células mesenquimatosas, provenientes del periostio principalmente, hacia osteoblastos que depositan tejido osteoide en las trabéculas desvitalizadas. Las trabéculas muertas se remodelan más tarde internamente, con lo que se fortalece el injerto, mediante la aposición de hueso nuevo, mencionado por Tristam 2002.

Cabe mencionar que en nuestro trabajo, **no se presentó ningún tipo de rechazo por parte de los injertos**; todos fueron aceptados favorablemente, sin embargo, se recomienda una asepsia extrema en la zona de lesión, constantemente, para evitar infecciones de tejidos blandos circundantes.

Trabajos como el de Karsdal 2003 citan que el TGF- β 1 es la citoquina, producida por los osteoblastos, más abundante en el hueso, y que por ello, es considerado como un factor central en la producción de hueso, capaz de acoplar resorción con formación y que promueve la reparación de las fracturas, esto sin contar con los propios méritos del periostio como tal, que se encarga del aumento del diámetro de los huesos y que participa también en la reparación, como lo menciona Frandson 1995.

En base a los resultados estadísticos y clínicos obtenidos y en los cuales se pueden observar un comportamiento diferente en los tratados con TGF- β 1, con tendencias a mejorar la respuesta ósea, sin que ello mostrara diferencia estadística; se considera que el efecto del TGF- β 1 mediante su adición a través del injerto, mantuvo la respuesta inflamatoria por un periodo de tiempo más largo, en relación al grupo control e injertado, así mismo consideramos la probabilidad de su efecto promotor en la respuesta ósea perióstica, endóstica y del espacio interfragmentario.

A pesar de que se pudo observar una respuesta perióstica y endóstica en los tres grupos a partir de la tercera semana y la cual se mantuvo hasta la quinta semana, estadísticamente no hubo diferencias significativas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Flores 2003. La presencia de material radio-opaco en el espacio del defecto, corresponde a la mineralización normal de la matriz extracelular formada por los osteoblastos, Flores 2003, en su trabajo, no observó presencia de este material, durante las primeras seis semanas posteriores a la implantación de injertos; lo que también concuerda con nuestros resultados; sin embargo en el grupo tratado con TGF- β 1, hubo una clara superior presencia de material radiopaco a partir de la tercera semana, y que probablemente esto obedezca, al efecto osteogénico del TGF- β 1 (Compston 2001).

Si bien trabajos como los de Hernández-Pando 2003 y Vilchis-Landeros 2003 muestran el efecto inhibitorio del TGF- β 1 sobre la división en muchos tipos celulares incluyendo las células hematopoyéticas y que por el contrario, trabajos como el de Abul 2002 que afirma que el TGF- β 1 estimula el desarrollo de las células hematopoyéticas; en nuestro trabajo no encontramos cambios relevantes sobre las cuentas leucocitaria y eritrocítica, hematocrito, hemoglobina y FAS, siendo evidente que los tres grupos se mantuvieron dentro de los parámetros normales en esta especie (Coffin 1959; Slatter 1985; Schalm 1970). No hay que dejar de pasar por alto, que el TGF- β 1 se encuentra presente normalmente en cantidades detectables en sangre (Tristam 2002).

8.0 CONCLUSIONES

1. El método de fijación esquelética externa resultó ser favorable mecánicamente (fácil manejo) y óptimo para la estabilización en la reducción de las osteotomías.
2. La regresión lineal nos permitió ver la evolución de los tres tratamientos, a través del tiempo y comparar los tres grupos experimentales, tomando en cuenta la dependencia y la asociación entre estas, sin considerar; que no se observaron diferencias estadísticas, tanto en la evaluación clínica como en la radiográfica.
3. No se presentó ningún tipo de rechazo por parte de los animales receptores, hacia los injertos desmineralizados laminares.

9.0 RECOMENDACION

En próximos trabajos, se tiene que extender el tiempo posquirúrgico, para evaluar mejor la respuesta ósea a nivel radiográfico y hacer la comparación más certera entre los grupos de experimentación, ya que para que ocurra la mineralización ósea, se requiere de aproximadamente dieciséis semanas.

10.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Abul, A.K. Litchman, A.H. Pober, J.S. 2002, 2004. *Inmunología Celular y Molecular*. Madrid, España. Ed. Mc Graw Hill. ed. Cuarta y Quinta.
2. Aguilar, B. Cortes, A. Arzate, B. 1994. *Xenoinplantantes en la reparación de defectos óseos*. Memorias 9ª Jornada Médica UNAM.
3. Álvarez, L.E. Ripalda, P. Forriol, F. 2002. *Reparación e integración de los injertos en cirugía ortopédica*. Universidad de Navarra España. *Revista Mexicana de Ortopedia y Traumatología*. vol. 16 no. 3.
4. Annes, J.P. Munger, J.S. Rifkin, D.B. 2003. *Making sense of latent TGFβ activation*. *Journal of cell Science*. no. 116.
5. Arnaud, E. Molina, F. Mendoza, M. 2001. *Sustituto óseo con factor de crecimiento*. RCCP vol. 7 no. 2.
6. Arrebola, L.C. 2000. *Pseudoartrosis y retardo de consolidación*. Portal en español de Ortopedia. OrtoInfo.
7. Attisiano, L. Wrana, J. 2002. *Signal Transduction by the TGFβ Superfamily*. *Revista Science*. vol. 296.
8. Barret. 1985. *Inmunología*. Ed. Interamericana. ed. Cuarta.
9. Bartman, U. Christian, P. 2004. *The role of transforming growth factor-β in lung development and disease*. Revisión. *Impact of basic research on tomorrows medicine*. vol. 125.
10. Berenson, M.L. Levine, D.M. 1992. *Estadística básica en administración -Conceptos y aplicaciones-*. México. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana. ed. Cuarta.
11. Birchard, S.J. 1996. *Manual Clínico de Pequeñas Especies*. México. Ed. Interamericana Mc Graw Hill. vol. 2 cap. 9.
12. Bolander, M.E. Balian, G. 1986. *The use of desmineralized bone matriz in the repair of segmental defects*. *Journal Bone and Joint Surg*. vol. 68.
13. Bonutti, P.M. Cremens, M.J. Lee, F.S. 2000. *Use of an Allograft Bone Button for Rotator cuff Repair*. Orlando Florida. *Journal Annual Meeting of the American Academy*.
14. Borjab, J.M. 1990. *Medicina y Cirugía en pequeñas especies*. México. Ed. Continental.
15. Borjab, J.M. Ellison, W.G. 2001. *Técnicas actuales en cirugía de pequeños animales*. México. Ed. Intermédica. ed. Cuarta.
16. Burchardt, H. 1983. *The biology of bonegraft repair*. *Clinical Orthopaedic and Related Research*. no. 174.
17. Burwell, R.G. 2001. *The fate of bonegrafts*. Ed. Intermédica. ed. Cuarta.
18. Brinker, W. 1999. *Ortopedia y Reparación de Fracturas*. Philadelphia. Ed. Mc Graw Hill. ed. Tercera.
19. Coffin, D.L. 1959. *Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria*. México. Ed. La prensa médica mexicana. ed. Tercera.
20. Cormack, H. D. 1988. *Histología de Ham*. México. Ed. Harla. ed. Novena.
21. Compston, J.E. 2001. *Sex Steroids and Bone*. Cambridge Reino Unido. *Las revisiones Fisiológicas*. vol. 81 no. 1.
22. Coughlan, A. Millar, A. 1999. *Manual de reparación y tratamiento de Fracturas en pequeños animales*. Barcelona España. Ed. Harcourt.
23. Climent, S. Sarasa, M. Domínguez, L. Muniesa, P. Terrado, J. 1998. *Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos -Conceptos básicos y datos aplicativos-*. Zaragoza España. Ed. Acribia.
24. Charles, D.K. 1997. *Técnicas Fundamentales en Cirugía Veterinaria*. Madrid España. Ed. Mc Graw Hill Interamericana.
25. Chung-Fang, L. Su-Li, Ch. 2002. *Signal Transductions Induced by Bone Morphogenetic Protein-2 and Transforming Growth Factor-β in Normal Human Osteoblastic Cells*. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 277. no. 18.
26. Darnell. 2002. *Biología Celular y Molecular*. Ed. Panamericana. ed. Cuarta.

27. Dennis, G.M. Simon, J.A. Kummer, F.J. Koval, K.J. Di Cesare, P.E. 2001. Fixation of Perioperative Femoral Shaft Fractures: A Biomechanical Comparison of Two Techniques. Philadelphia. Journal of Orthopaedic Trauma. vol. 15. no. 3.
28. Dieter, Dellman. 1993. Histología Veterinaria. México. Ed. Acribia. ed. Segunda.
29. Douglas, S.W. Williamson, H.D. 1975. Diagnóstico Radiológico Veterinario. Zaragoza España. Ed. Acribia.
30. Duran, N.Y. McClellan, R.T. Reindel, E.S. 2001. Biomechanical Comparison of Convencional Open Reduction and Internal Fixation Versus Calcium Phosphate Cement Fixation of a Central Depressed Tibial Plateau Fracture. Philadelphia. Journal of Orthopaedic Trauma. vol. 15. no. 3.
31. Erlebacher, A. Filvaroff, E.H. Ye, J.Q. Derynck, R. 1998. Osteoblastic Responses to TGF β during Bone Remodeling. Universidad de San Francisco California. Molecular Biology of the cell. vol 9. no. 7.
32. Fabregat, I. 2002. Acción dual del TGF-beta: supresor de tumores y activador de la progresión tumoral. Universidad complutense de Madrid. Departamento de bioquímica y biología molecular II.
33. Ferguson, D. Davis, W. 1987. Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction induced repair of craneotomy defects in the resus monkey (*Macaca speciosa*). Clin. Orthop. Relat. Res. no. 219.
34. Filmon, M.R. Basle, F. Atmaln, H. Chappard, D. 2002. Adherence of Osteoblast-like Cells on Calcospherites Developed on a Biomaterial Combining Poly (2-hydroxyethyl) Methacrylate and Alkaline Phosphatase. Faculté de médecine Angers France. Elsevier Science. vol 30. no. 1.
35. Fossum, T.W. Hedlund, C.S. Hulse, D.A. Johnson, A.L. Seim, H.B. Willard, M.D. Carroll, G.L. 2000. Manual of Small Animal Surgery. USA Texas University. Ed. Mosby.
36. Fuentes, X. Castañeiras, Queraltá. 1998. Bioquímica y patología molecular. Ed. Reverté. ed. Segunda. vol. II.
37. Fujimoto, R. Tanizawa, T. Nishida, S. Yamamoto, N. Soshi, S. Endo, N. Takahashi, H.E. 2005. Local effects of transforming growth factor- β 1 on rat calvaria: Changes depending on the dose and the injection site. Niigata Japón. Journal of Bone and Mineral Metabolism. Revista. vol. 17. no. 1.
38. Fleming, J.E. Cornell, Ch. N. Muschler, G.F. 2000. Bone Cells and Matrices in Orthopedic Tissue Engineering. Orthopedic Clinics of North America. vol. 31. no. 3.
39. Flores, G.E. 2003. Cicatrización e integración de hueso desmineralizado en tibias de perros (*Canis familiaris*) con osteotomías. Cuautitlán México. Tesis. FESC-UNAM. Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.
40. Flugsrud, G.B. Ovre, S. Groggaard, B. Nordsletten, L. 2000. Cemented femoral impaction bone grafting for severe osteolysis in revision hip arthroplasty. Revisión. Arch. Orthop. Trauma. Surg. no. 120.
41. Frandson, R.D. Spurgeon, T.L. 1995. Anatomía y Fisiología de los animales domésticos. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. ed. Quinta.
42. González, V.C. 1989. Recuperación de la longitud ósea de las fracturas expuestas con pérdida ósea. Tesis UNAM. México. Hospital Dr. Antonio de la Fuente IMSS.
43. Guerado, P.E. Becerra, R.J. 2002. Los fundamentos de la osteogénesis y la biología regenerativa. Revista Mexicana de Ortopedia y Traumatología. vol. 16 no. 3.
44. Hannouche, D. Petite, H. Sedel, L. 2001. Current trends in the enhancement of fracture healing. The journal of bone and Joint Surgery. vol. 83-b. no 2.
45. Hefferan, T.E. Reinholz, G.G. Rickard, D.J. Johnsen, S.A. Waters, K.M. Subramaniam, M. Spelsberg T.C. 2000. Overexpression of a Nuclear Protein, TIEG, Mimics Transforming Growth Factor- β Action in Human Osteoblast Cells. The Journal of Biological Chemistry. vol. 275. no. 27.
46. Hernández- Pando, R. 2003. Participación del factor de transformación tumoral- β en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunológica. Gaceta Médica Mexicana. Simposio. vol. 139. no. 2.

47. Hupel, T.M. Weinberg, J.A. Aksenov, S.A. Schemitsch, E.H. 2001. Effect of Unreamed, Limited Reamed, and Standard Reamed Intramedullary Nailing on Cortical Bone Porosity and New Bone Formation. Philadelphia. Journal of Orthopaedic Trauma. vol 15. no. 1.
48. Jiménez, L.F. Merchant, H. 2003. Biología celular y molecular. México. Ed. Pearson Educación.
49. Jonhson, R. Kuby, P. 1999. Estadística elemental, lo esencial. México. Ed. Internacional Thomson. ed. Segunda.
50. Junqueira, Carneiro. 2001. Histología Básica. Ed. Masson. ed. Quinta.
51. Karsenty, G. 1999. The genetic transformation of bone biology. Revisión. Houston Texas. Departamento de Genética Molecular y Humana. no. 13.
52. Karsdal, M.A. Hjorth, P. Henriksen, K. Kirkegaard, T. Nielsen, K.L. Lou, H. Delaissé, J.M. Foged, N.T. 2003. Transforming Growth Factor-Controls Human Osteoclastogenesis through the p38 MAPK and Regulation of RANK Expression". Dinamarca. Biocience. The journal of biological chemistry. vol. 278. no. 45.
53. Karsdal, M.A. Larsen, L. Engsig, M.T. Lou, H. Ferreras, M. Lochter, A. Delaissé, J.M. Foged, N.T. 2002. Matriz Metalloproteinase-dependent Activation of Latent Transforming Growth Factor- β Controls the Conversion of Osteoblasts into Osteocytes by Blocking Osteoblast Apoptosis. Dinamarca. The Journal of Biological Chemistry. vol. 277. no. 46.
54. Keating, J.F. McQueen, M.M. 2001. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. Edimburgo. The Journal of Bone and Joint Surgery. vol. 83. no. 1.
55. Kessler, J.L. Stevens, P.M. Smith, J.T. Carroll, K.L. 2001. Use of Allografts in Pemberton Osteotomies. Philadelphia. Journal of Pediatric Orthopaedics. no. 21.
56. Knecht, Ch. D. Allen, A.R. Williams, D.J. 1990. Técnicas fundamentales en cirugía veterinaria. Madrid España. Ed. Mc Graw Hill. ed. Tercera.
57. López-Casillas, F. Massagué, J. 2003. TGF- β : receptores, señales y acciones. Gaceta Médica Mexicana. Simposio. vol. 139. no. 2.
58. Luo, X.H. Liao, E.Y. Su, X. 2002. Progesterona upregulates TGF-b isoforms (b1,b2 and b3) expression in normal human osteoblast-like cells. National Library of Medicine. vol. 71. no. 4.
59. Maeda, S. Dean, DD. Gómez, R. Schwartz, Z. Boyan, BD. 2001. The first stage of transforming growth factor beta1 activation is release of the large latent complex from the extracellular matrix growth plate chondrocytes by matrix vesicle stromelysin-1 (MM3). San Antonio Texas. National library of Medicine. vol 70. no. 1.
60. Mark, L. David, M. 1992. Estadística básica en administración. Conceptos y aplicaciones. México. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana. ed. Cuarta.
61. Mehrara, B.J. Most, D. Chang, J. Bresnick, S. Turk, A. Schendel, S.A. Gittes, G.K. Longaker, M.T. 1999. Basic Fbroblast Growth Factor and Transforming Growth Factor β -1 Expression in the Developing Dura Mater Correlates with Calvarian Bone Formation. New York y Palo Alto California. Plastic and Reconstuctive Surgery. Revista. Hospital de Ortopedia IMSS.
62. MendenHall, W. Sincich, T. 1997. Probabilidad y Estadística para ingeniería y ciencias. Duxbury Belmont. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana. ed. Cuarta.
63. Merida, L. Shigetomi, M. Ihara, K. Tsubone, T. Ikeda, K. Yamaguchi, A. Sugiyama, T. Kawai, S. 2002. Effects of Vitamin D Analog, 22-oxa-1,25-Dihydroxyvitamin D3, on Bone Reconstruction by Vascularized Bone Allograft. Nagasaki Japón. Elsevier Science. vol. 30 no. 2.
64. Montgomery, C.D. Runger, C.G. 1996. Probabilidad y Estadística aplicadas a la ingeniería. México. Ed. Mc Graw Hill. ed. Segunda.
65. Morris, J. Dobson, J. 2002. Oncología en Pequeños animales. Buenos Aires Argentina. Ed. Intermédica XXI.
66. Mulliken, J.B. Kalgan, L.B. Glowacky, J. 1984. Induced Osteogénesis, the biological principles and clinical applications. Journal Bone. Jt. Surg.
67. Murray, R.S. 1995. Estadística. México. Ed. Mc Graw Hill. ed. Segunda.
68. Okragly, A. Balwit, J.M. Haak-Frendscho, M. 1994. Transforming Growth Factor beta-1 (TGF β 1) a Biological Paradox. Promega Notes Magazine. no. 47.

69. Olmsted, M. Arvin, L. 1998. Small Animal Orthopedics. Ed. Mosby. Year Book Inc.
70. Ortiz, B.L. 2002. Resistencia de Materiales. Madrid España. Ed. Mc Graw Hill. ed. Segunda.
71. Pagliai, A. 2001. Regeneración ósea guiada. Diplôme D`Université D`Implantologie Orale et Maxillo-Faciale.
72. Pedrozo, H.A. Schwartz, Z. Robinson, M. Gómez, R. Deán, D.D. Bonewald, L.F. Boyan, B.D. 1999. Potential Mechanisms for the Plasmin-Mediated Release and Activation of Latent Transforming Growth Factor-b1 from the Extracellular Matrix of Growth Plate Chondrocytes. San Antonio Texas. Revista. Universidad de Texas Salud y Ciencias Endocrinology by The Endocrine Society. vol. 140. no.12.
73. Peralta-Zaragoza, O. Lagunas-Martínez, A. Madrid-Marina, V. 2001. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. Cuernavaca Morelos. Revista. Salud Pública de México. vol. 43 no. 4.
74. Popesko, P. 1981. Atlas de Anatomía Topográfica de los animales domésticos. Barcelona España. Ed. Salvat. Tomo II.
75. Plumb, C.D. 2002. Veterinary Drug Hand book. Minnesota. Ed. Iowa State Press. ed. Fourth.
76. Pytel, A. Singer, L. 1994. Resistencia de Materiales. México. Ed. Harla. ed. Cuarta.
77. Raschke, M. Wildemann, B. Inden, P. Bail, H. Flyvbjerg, A. Hoffmann, J. Haas, N.P. Schmidmaier, G. 2002. Insulin-like Growth Factor-1 and Transforming Growth Factor- β 1 Accelerates Osteotomy Healing Using Polylactide-coated Implants as a Delivery System : A Biomechanical and Histological Study in Minipigs. Dinamarca. Departament of Trauma and Reconstructive Surgery. Elsevier Science. vol. 30. no. 1.
78. Rijnberk, A. Vries, H.W. 1991. Anamnesis y Exploración corporal de pequeños animales. Zaragoza España. Ed. Acribia. ed. Segunda.
79. Ritchey, J.F. 2002. Estadística para las Ciencias Sociales. México. Ed. Mc Graw Hill Interamericana.
80. Rivera, J.A. Riaño, C. Monsalve, P.A. Osorio, A. 2003. Injertos óseos - Nueva alternativa. Fase I. Extracción de proteínas morfogenéticas parcialmente purificadas de hueso bovino. Medellín Colombia. Universidad de Antioquia. Rev. Col. Cienc. Pec. vol. 16. no. 2.
81. Rodríguez-Fragoso, L. Jurado-León, F.R. Reyes-Esparza, J.A. 2000. La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral. Revista del Instituto Nacional de Cancerología. vol. 46. no. 1.
82. Rodríguez-Fragoso, L. García-Jiménez, S. Flores-Hernández, J. Reyes-Esparza, J.A. Pérez-Liz, G. Transforming Growth Factor β -1 Modifies the Activity and Gene Expresión of Urokinase Type Plasminogen Activator in Hepatics Stellate Cell Activated. Artículo. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
83. Roitt, I. Brostoff, J. Male, D. 2001. Inmunología. Madrid España. Ed. Harcourt. ed. Quinta.
84. Rojas, D.S. Domínguez, H.V. 2002. Alternativas para obtener un injerto óseo. México. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Acta Ortopédica Mexicana. vol. 16. no. 4.
85. Ross, M.H. 1997. Histología. Ed. Panamericana. ed. Tercera.
86. Russell, A.R. William, S.M. Andrew, W.M. 1987. Principios de Patología Veterinaria.
87. Russell, J.L. Block, J.E. 1999. Clinical Utility of Desmineralized Bone Matrix for Osseous Defects, Arthrodesis, and Reconstruction: Impact of Processing Techniques and Study Methodology. New Jersey. Magazine Clinical Utility of Demineralized Bone Matrix. vol. 22. no. 5.
88. San Julián, A.M. Moreno, S.J. Forriol, F. Cañadel, C. 2000. Integración biológica y radiográfica de los aloinjertos óseos masivos. Rev. Ortopedia y Traumatología. vol. 5. no. 44.
89. Sánchez-Valverde. 1998. Traumatología y Ortopedia en pequeños animales. México. Ed. Mc Graw Hill.
90. Santoscoy, M.C. 1994. Injerto Óseo. México. Rev. AMMVEPE. no. 30.
91. Sierra, O.R. 2002. Comunicación Osteoblasto-Osteoclasto. Bogotá Colombia. Revisión. Instituto Nacional De Salud.

92. Soto, M.C. Restrepo, U.A. Trujillo, B.L. López, U.R. París, M.C. 2002. Injerto de cortical en polvo para el tratamiento de los defectos óseos estructurales (estudio experimental en conejos). Revisión. Facultad de Medicina Pontificia Javeriana.
93. Summer, S. 1992. Toma de decisiones en cirugía ortopédica de pequeños animales. Ed. Mc Graw Hill.
94. Schalm, O.W. 1970. Hematología Veterinaria. México. Ed. UTHEA.
95. Schlitz-Mosgau, S. Lehner, B.R. Wehrhan, F. Amman, K. Kopp, J. Thorwarth, M. Nkenke, E. Grabenbauer, G. 2005. Expression of bone morphogenic protein 2/4, transforming growth factor-beta(1), and bone matrix protein expression in healing area between vascular tibia grafts and irradiated bone-experimental model of osteonecrosis. National Library of Medicine. vol. 61. no. 4.
96. Schwartz, Z. Sylvia, V. Dean, D. 1998. The Synergistic Effects of Vitamin D Metabolites and Transforming Growth Factor-b on Costochondral Chondrocytes Are Mediated by Increases in Protein Kinase C Activity Involving Two Separate Pathways. Magazine Endocrinology by The Endocrine Society. vol. 139. no. 2.
97. Sheeler. 1993. Biología celular, Estructura, Bioquímica y Función. Ed. Limusa.
98. Slatter, D.F. 1985. Textbook of Small animal Surgery. California. Ed. Saunders Co. vol II.
99. Slausson, Cooper. 2002. Mechanisms of Disease. Ed. Mosby. ed. Tercera.
100. Stevenson, S. 1985. Bone grafting in textbook of small animal surgery. Philadelphia. Ed. Saunders Co.
101. Tristram, G. Daniel, P. 2002. Inmunología Básica y Clínica. Ed. Manual Moderno. ed. Décima.
102. Urist, M.R. Hay, P.T. 1970. Osteogenetic competence. Magazine Clin. Orthop. no. 64.
103. Ventura, J.J. Kennedy, N.J. Flavell, R.A. Davis, R.J. 2004. JNK Regulates Autocrine Expression of TGF- β 1. Massachusetts. Molecular Cell. vol. 15.
104. Vilchis-Landeros, M. Juárez, P. López-Casillas, F. 2003. El papel fisiopatológico del TGF- β en las nefropatías de diversas etiologías: los inhibidores del TGF- β como agentes terapéuticos potenciales. Simposio. Gaceta Médica Mexicana. vol. 139. no. 2.
105. Wayne, W.D. 2002. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. México. Ed. Limusa Wiley. ed. Cuarta.
106. Wimbhurst, J.A. Brooks, R.A. Rushton, N. 1999. The effects of particulate bone cements at the bone-implant interface. The Journal of Bone and Joint Surgery. Cambridge England. vol. 83. no. 4
107. Woolf, S.K. Gross, R.H. 2001. Perceptions of Allograft Safety and Efficacy Among Spinal Deformity Surgeons. Journal of Pediatric Orthopedics. Philadelphia USA. vol. 21 no. 6.
108. Zhang, M. Powers, R.M. Wolfenbarger, L. 1997. Effects of the desmineralization process on the osteoinductivity of desmineralized bone matrix. Journal Periodontol.