



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA OSTEOCALCINA DURANTE LA
REPARACIÓN ÓSEA, EN PACIENTES CANINOS (*CANIS FAMILIARIS*) TRATADOS
Y NO TRATADOS CON ALOINJERTOS TUBULARES.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:
TORRES RAMÍREZ LILIANA

ASESORES:
M. C. ENRIQUE FLORES GASCA
M.V.Z. MA. REYES PICHARDO MOLINERO
M.F. GERMAN ISAURO GARRIDO FARIÑA
Dr. JORGE TORTORA PÉREZ



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia:

Emilia Ramírez Pérez: gracias mami por darme la vida, por apoyarme siempre en cada uno de mis pasos, por vivir conmigo mis triunfos y fracasos; enseñarme el significado de mujer, que con esfuerzo, constancia, dedicación, y sacrificios, has logrado sostener una familia. Me has fomentado los valores del trabajo, la disciplina (que no le he practicado mucho), y la honradez; no terminaría de describir lo que eres para mí, sólo me resta decirte que te amo mucho.

Leonardo Torres Zúñiga: negrito hermoso, gracias por protegerme en este tan largo trayecto, que me has dado más de la cuenta; me has enseñado que no debo callar ante las injusticias y de defender mi trabajo. Aunque no estés de acuerdo con mis decisiones, me has apoyado siempre y cuando me veas feliz; gracias papito te amo.

A mis hermanos Josué, Luis M. y Fabiola: porque cada vez que cualquiera de nosotros tropecemos, nos tendemos la mano; gracias por punzar mi orgullo, por ponerme en mi lugar, por hacerme reír, llorar y enojar, por estar conmigo en silencio. Los amo.

Sebastián Téllez Torres: eres el ser más hermoso en este planeta, gracias por pretender que soy todo un ejemplo a seguir, pero créeme que cuando crezcas no será igual. Bebe precioso me has enseñado que aún existe la ternura, la nobleza y el amor incondicional.

Engracia Zúñiga Valdés: mujer de una sola palabra, me has enseñado que mis convicciones y la fe, es lo más importante en uno mismo y no importa lo que la gente diga, me debo mantener firme. Te quiero abue, sé que al lado de Dios estas cuidando a mi papá.

Jaime Ramírez y Petra Pérez: abuelitos, gracias por confiar en mí y dejar que descomponga a sus animales. Yo se que para ustedes es un orgullo el ver que me he convertido en una profesionista. Los quiero mucho, que Dios los siga cuidando.

A mis amigos:

Saben muy bien que no soy una persona de muchas palabras...

Arcelia: a pesar de los años y de la distancia, es una amistad sana y pura, gracias amiga por creer en mí. Que Dios los bendiga, a ti, a tu nena y esposo.

Claudia (coneja): amiga, que puedo decir, me has enseñado a practicar la paciencia... contigo, que debo aprender las cosas buenas de la gente, agradezco tu tiempo, tus risas, tu amistad, tu inteligencia; no te imaginas las cosas que he aprendido de ti.

Fabiola (loquita): agradezco tus pláticas, tus bromas y sobre todo tus consejos.

Horacio Flores: hemos aprendido uno del otro, años de tolerancia y cultivado una amistad, gracias por ser parte de mi vida.

Jesús (pollo): tu gentileza y sencillez es lo que hace que nuestra amistad haya florecido, que cada encuentro sea gracioso y agradable.

Lupita, Gaby y Marianita: recibirme en sus vidas y mostrarme su cariño

Maricel (mary): amiga agradezco todas esas tardes que dedicaste para escucharme y consolarme, gracias por ser una persona sincera y no temer a decirme cuando estoy fallando.

Mario (beto): eres una persona maravillosa que me ha mostrado su cariño y respeto, que el sentimiento es mutuo.

Nayelli Hernández: nunca te ha importado lo que haga o deje de hacer, para ti soy tu amiga y punto.

Paty Castro, Argelia y Paty Gp.: me han mostrado su confianza hacia a mi, su naturaleza de mujer fuerte, entregadas cada una a su familia, amiguitas las quiero mucho.

Verónica (veritos): amigui, nos hemos visto crecer, he aprendido que a pesar de las dificultades de la vida, siempre hay alguien dispuesto a ayudarte y salir adelante, y tú eres un claro ejemplo de que se puede destacar y avanzar.

Victor H. Huerta: nuestra amistad es franca y sin secretos, gracias por ser quien eres conmigo.

Yess: tú reconocida sinceridad es lo que hace que sigamos juntas en este camino.

A ti que me ves como una mujer entera, me has enseñado a tener confianza en mí, a no dudar de mis conocimientos; el esfuerzo constante es el resultado de un buen médico, gracias por apoyarme en la recta final de mi camino en la universidad y ver el principio de mi carrera como profesionista. No haces énfasis de mi ignorancia, pero adviertes mis errores y al mismo tiempo reconoces mis aciertos. Por lo que hemos compartido y crecido juntos, por ser una pieza importante en mi vida y sobre todo, por revelarme tu pasión, respeto y amor por esta noble profesión. **Gracias Enrique Guerrero Martínez.**

M.C. Enrique Flores Gasca: por darme la oportunidad de cumplir con el sueño de cada universitario, por ser más que un profesor, un amigo dispuesto a escucharme.

M.V.Z. Blanca Moreno Cardenti: por ser una excelente profesora que con sus consejos, regaños y enseñanzas, me ha formado en la profesión y no ser un alumno más en la universidad.

Dr. Jorge Tortóra Pérez, M.F. Germán Garrido Fariña: por tomarse el tiempo y dedicación para asesorarme en mi tesis.

Dr. Arturo Cortés Iracheta: agradezco su tiempo y espacio en esta clínica tan maravillosa, me ha enseñado que a pesar del tiempo y la experiencia siempre hay que retroalimentarse; por mostrarme mis fallas y tomarse el tiempo para resolver mis dudas.

A mí alma máter **UNAM**, que me dio la oportunidad de seguir adelante, cumpliendo un sueño; por ser de piel dorada y sangre azul.

GOYA UNIVERSIDAD!!

INDICE

1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCIÓN	2
2.1 Células óseas	3
2.2 Matriz ósea	4
2.3 Proteínas morfogénicas	5
2.4 Proteínas de la matriz	6
3.- REPARACIÓN ÓSEA	7
3.1 Reparación intramembranosa	7
3.2 Reparación endocondral	8
3.3 Proceso de reparación	9
4.- ENFERMEDADES ÓSEAS	10
5.- INJERTOS ÓSEOS	12
6.- MARCADORES BIOQUÍMICOS	14
6.1 Marcadores de resorción ósea	14
6.2 Marcadores de la formación ósea	15
7.- OSTEOCALCINA	16
8.- INMUNOFLUORESCENCIA	17
8.1 Fundamento	17
8.2 Fluorocromos	17
8.3 Técnica de inmunofluorescencia	18
8.4 Microscopio de inmunofluorescencia	18

9.- OBJETIVOS	20
9.1 Objetivo general	20
9.2 Objetivos específicos	20
10.- HIPOTÉISIS	21
11.- MATERIAL	22
12.- METODOLOGÍA	24
12.1 Técnica de inmunofluorescencia indirecta	26
13.- RESULTADOS	27
14.- DISCUSIÓN	33
15.- RECOMENDACIONES	36
16.- CONCLUSIONES	37
17.- BIBLIOGRAFÍA	38

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Estructura anatómica del hueso	2
Ilustración 2. Tinción H.E. regeneración ósea a las 5 semanas	28
Ilustración 3 Tinción H.E. regeneración ósea a las 6 semanas	29
Ilustración 4. Tinción H.E. regeneración ósea a las 7 semanas	30
Ilustración 5. Tinción H.E. regeneración ósea a las 8 semanas	31
Ilustración 6. Cuadro información general	32
Ilustración 7. Tinción Azul de Alciano regeneración ósea a las 7 semanas	33

1. RESUMEN

Los injertos óseos se usan prácticamente en todos los aspectos de la cirugía ortopédica reconstructiva y abarcan desde el tratamiento de fracturas hasta complejas técnicas de salvamento de extremidades en cirugía tumoral.

A partir del descubrimiento de las proteínas morfogénicas, sus propiedades inductivas en la formación de hueso, se han efectuado numerosas investigaciones que han permitido conocer toda una serie de funciones y propiedades de éstas sustancias. Las posibilidades de aplicación de este conocimiento son innumerables en las diversas áreas de la medicina. En este trabajo se hace una evaluación de la Osteocalcina, por medio de la técnica de inmunofluorescencia; tiene como objetivo detectar la Osteocalcina dando la propiedad de luminiscencia en la célula, uniéndolo a antígenos dirigidos a los anticuerpos tisulares, que al ser observada en microscopio de fluorescencia la muestra emite una luz verde amarillento, permitiendo analizar el fenómeno de inducción de ésta proteína en el hueso.

En la realización de este proyecto de investigación se utilizaron aloinjertos desmineralizados tubulares, obtenidos de perros sanos (tibia) que fueron colocados en pacientes a los cuales se les realizó una osteotomía (3 cm.) en el tercio medio de la tibia estabilizándola con la técnica de fijación esquelética externa tipo II. Durante el experimento se utilizaron 12 perros sanos agrupados en 2 grupos, el primero o control y el experimental; en ambos grupos se les realizó el mismo procedimiento quirúrgico y solo al experimental se trato con el injerto de hueso desmineralizado, consecutivamente fueron sacrificados para la obtención de muestras a las 5, 6, 7 y 8 semanas después de la cirugía. Posteriormente las muestras fueron procesadas con la técnica de inclusión de parafina fina, se realizaron cortes histológicos para ser preparadas y analizadas por medio de la inmunohistoquímica en el microscopio de fluorescencia; en el cual no se obtuvo ninguna emisión de luz por parte del tejido, confiriéndole un resultado negativo.

A continuación estas muestras fueron teñidas y evaluadas con H.E. y Azul de Alciano, las cuales en ambas tinciones aparece la formación de cartílago hipertrófico tanto en el grupo control como en el grupo experimental. Se concluye que el injerto, tiene la propiedad de osteoinductor en el proceso de reparación ósea.

2.- INTRODUCCIÓN

El hueso es considerado como tejido conectivo especializado que brinda soporte mecánico, protección física y capacidad de movimiento; provee apoyo a los músculos esqueléticos y constituye un sistema de palancas que incrementa las fuerzas generadas con la contracción muscular; por otro lado aloja y protege a la médula ósea roja. Este compuesto posee una matriz extracelular, mineral inorgánico y un conjunto de células del estroma mesenquimal; el 80% del volumen óseo corresponde a hueso compacto y el 20% restante a esponjoso. La masa ósea depende del balance entre síntesis y destrucción del hueso mediada por osteoblastos y osteoclastos. (Sternberg 1997, Junqueira 2005).

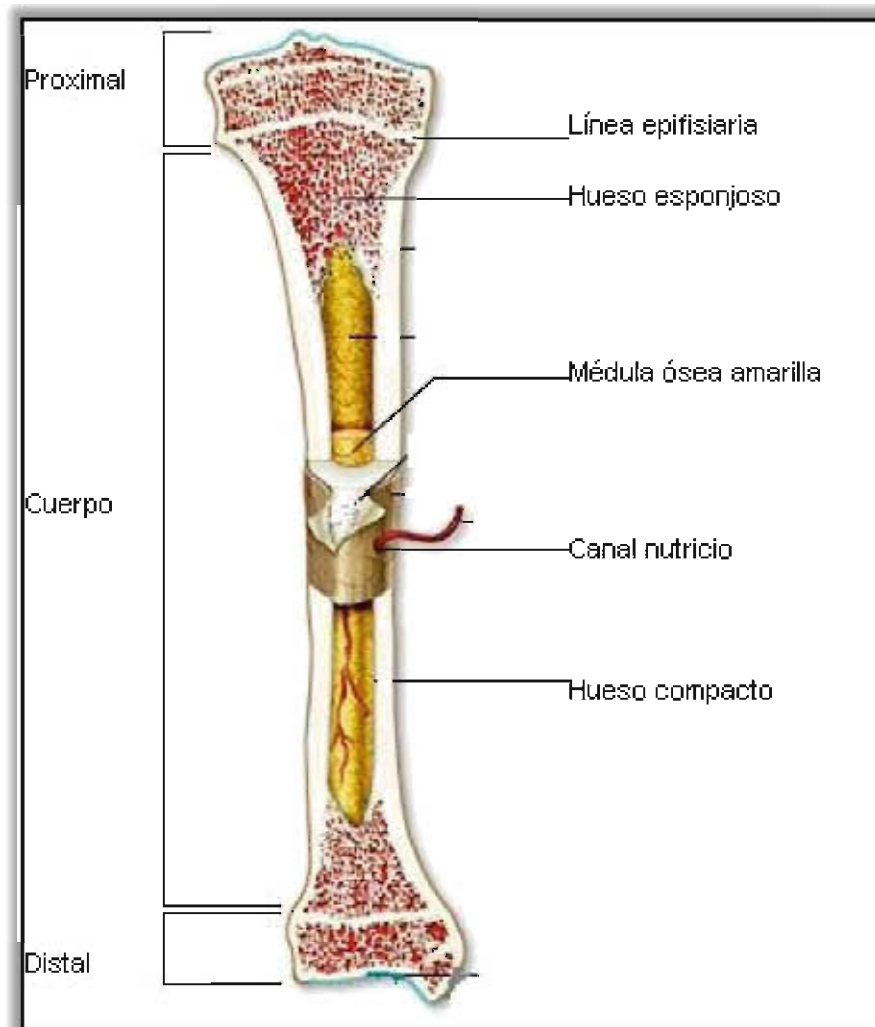


Figura 1.- Estructura anatómica del hueso.

2.1. Células óseas

Osteoblastos

Los *Osteoblastos* se derivan de células primitivas mesenquimales por acción del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y proteínas morfogénicas óseas (BMPs). Sintetizan colágeno de tipo I, glicoproteínas y proteoglicanos de la matriz ósea, así como algunos de sus componentes menores (osteocalcina, osteonectina y osteoponina). Tienen receptores de superficie celular para algunas hormonas, vitaminas y citoquinas que influyen en su actividad; a medida que el hueso se mineraliza el osteoblasto deja de tener actividad de síntesis de material osteoide, se aplanan contra la superficie ósea y se reduce la basofilia, así como el retículo endoplásmico se rodea de matriz ósea y se convierte en osteocito que adquiere la capacidad para responder a fuerzas externas principalmente determinadas por la actividad muscular. (Sandoval 2005, Fawcett 1999)

Osteocitos

Una vez los osteoblastos son atrapados pierden habilidad para producir matriz ósea; sin embargo, pueden sintetizar ciertas moléculas como la osteocalcina, y depositar minerales en la matriz ósea, además forman una red con otros osteocitos adyacentes y los osteoblastos de la superficie ósea a través de prolongamientos celulares que viajan en el interior de los canículos fraguados en el espesor de la matriz; no están completamente aislados, si no que se mantienen en comunicación mutua mediante un sistema de uniones que permiten el flujo de iones y de pequeñas moléculas de una a otra célula. (Sandoval 2005, Fawcett 1999)

Osteoclastos

Los osteoclastos son las células más importantes en el proceso de remodelado y renovación que implica la eliminación de la matriz ósea y su sustitución por un nuevo depósito óseo. Se originan de precursores hematopoyéticos y en su diferenciación participan el GM-CSF (Factor estimulador de colonias granulocito-monocito) y el M-CSF (factor estimulado de colonias de monocito-macrófago); factores solubles como la PTH (Hormona paratiroidea), la vitamina D3 y la calcitonina también son críticos en el mantenimiento de este balance. (Sandoval 2005).

Estas células ocupan unas cavidades poco profundas de la superficie llamadas lagunas de Howship, que se producen por la degradación del hueso por enzimas segregadas por los osteoclastos en el hueso subyacente; sólo son eficaces si están en contacto directo con la matriz ósea mineralizada que normalmente está cubierta por una fina capa de matriz no mineralizada, denominada osteoide; por lo que segregan colagenasa, otras enzimas hidrolíticas e iones de H⁺ en la laguna subyacente, digieren los componentes orgánicos y acidifican su contenido para disolver el mineral óseo. (Fawcett 1999).

La superficie externa del hueso está rodeada por una capa de fibras de colágena y fibroblastos llamada periostio en la que se insertan los tendones de los músculos y ligamentos. Las superficie interna del hueso llamada endostio, incluidas las trabéculas del hueso esponjoso y canal medular, forman los canales neurovasculares, reciben el nombre de canales de Havers y junto a las laminillas concéntricas, forman el sistema de Havers; éstos conductos están en comunicación unos con otros y con la cavidad medular atraviesan las laminillas óseas que reciben el nombre de conductos de Volkman. Este endostio está formado por columnas óseas paralelas, cada una de ellas consta de capas óseas concéntricas dispuestas alrededor de un canal central que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. (Telser 2007, Fawcett 1999).

2.2. Matriz ósea

La parte inorgánica representa aproximadamente el 90% del peso de la matriz ósea. Los iones más abundantes son el fosfato y el calcio; se encuentran pequeñas cantidades de bicarbonato, magnesio, potasio, sodio y citrato. La concentración de iones de calcio y fósforo en el líquido extracelular del hueso supera la necesaria para el depósito espontáneo de las sales de calcio, por lo que existen diversos inhibidores, entre ellos el pirofosfato; el depósito de calcio está asociado a vesículas rodeadas de membrana procedentes de la membrana plasmática de los osteoblastos llamadas vesículas de matriz, que contienen fosfatasa alcalina. (Fawcett 1999, Cotran 1999, Junqueira 2000).

Aunque una parte del mineral óseo puede ser amorfo, la mayor parte está en forma de cristales cilíndricos de hidroxapatita; en el hueso consiste en un paso líquido a sólido análogo a la conversión del agua en hielo, el proceso implica la iniciación e inducción de la mineralización por acción de la matriz orgánica. (Fawcett 1999, Cotran 1999, Junqueira 2000).

La parte orgánica de la matriz está constituida por fibras de colágena tipo I y por cantidades muy pequeñas de proteoglicanos y de glicoproteínas; éstos son sintetizados en el retículo endoplásmico rugoso de los osteoblastos, se concentran en el aparato de Golgi y se secretan a partir de la superficie celular, dando a lugar a la producción del osteoide. (Telser 2007, Nolla 1997).

2.3. Proteínas morfogénicas

Las proteínas morfogénicas (BMP) del hueso, son un grupo de péptidos, que pertenecen a la familia de los factores de crecimiento transformante- β (TGF- β); ésta familia se caracteriza por tener una secuencia de aminoácidos terminal hidrofóbico y dominios de tamaño variable. Asimismo son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y hueso). Son muy abundantes en el tejido óseo y durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago. (Cotran 1999, Fernández 2006).

Estructura molecular

De las 9 BMP reportadas, ocho de éstas están relacionadas entre sí. Además debido a su secuencia aminoácida, las BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8 y BMP-9 se clasifican como parte de la superfamilia de TGF- β . La característica de ésta familia es la conservación del aminoácido en la región C-terminal, incluyendo una serie de siete residuos conservados completos de cisteína. (Henostroza 1999)

Mecanismos de acción

Se cree que el colágeno tipo IV junto con otros componentes alrededor de las células endoteliales de los capilares invasivos ligan las proteínas angiogénicas y morfogénicas óseas y las presentan localmente en una forma inmovilizada para inducir a las células mesenquimales y ósteoprogenitoras e iniciar así la angiogénesis. En vista de la afinidad de las moléculas de BMP y TGF- β al colágeno de tipo IV, se ha propuesto que las acciones biológicas de los miembros de la familia BMP son reguladas por una compleja interacción con los componentes de la matriz extracelular y que el colágeno tipo IV podría funcionar como sistema de transporte mediante el secuestro de ambos iniciadores y promotores comprometidos en la diferenciación ósea endocondral. El compuesto del sustrato de matriz extracelular en estado sólido asociado con las BMP, desencadena la cascada de diferenciación ósea. (Henostroza 1999)

2.4. Proteínas de la matriz

Recientemente se ha descubierto que las proteínas de la matriz actúan como moduladores de los factores de crecimiento. Hay que tener en cuenta que las proteínas de la matriz se hallan a una concentración mayor que los factores de crecimiento, por lo que podrían ser más importantes en la regulación de las diferentes funciones celulares. Participan en la regulación de la diferenciación de las células contenidas en la matriz. (Fernández 2006, Rojas 2002)

Citocinas

Son polipéptidos sintetizados en linfocitos, monocitos y son importantes en múltiples funciones celulares, como en la respuesta inmunológica, la inflamación y la hematopoyesis, con un efecto autocrino y paracrino. En el hueso son importantes las siguientes:

Interleucina 1 (IL-1): Estimula directamente la reabsorción osteoclástica, incrementando la proliferación y diferenciación de los pre-osteoclastos así como la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos. En realidad son 3 moléculas diferentes relacionadas: IL-1 α , IL-1 β y Antagonista del receptor de IL-1, siendo esta última inhibidora del efecto de las dos primeras. Su acción sobre la reabsorción es directa e indirecta, a través de la síntesis de prostaglandinas. (García 1997, Fernández 2006, Henostroza 1999)

Interleucina 6 (IL-6): Estimula la reabsorción ósea y parece implicada en la patogenia de la enfermedad de Paget. Se cree que juega un papel importante en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis. Se produce en respuesta a PTH, IL-1 y 1,25 (OH) $_2$ D3. (García 1997, Fernández 2006, Henostroza 1999)

Interleucina 11 (IL-11): De reciente descubrimiento, se produce en la médula ósea e induce la osteoclastogénesis. (García 1997, Fernández 2006, Henostroza 1999)

Prostaglandinas (PG): In vitro favorecen la reabsorción ósea, fundamentalmente la PGE $_2$, pero también la PGE $_1$, PGG $_2$, PGI $_2$ y PGH $_2$. (Fernández 2006, Rojas 2002)

Las células osteoprogenitoras son células madre mesenquimatosas pluripotenciales situadas cerca de todas las superficies óseas, son capaces de dividirse y formar una descendencia; el factor de transcripción CBFA1 es esencial y específico para la diferenciación osteoblástica. (Cotran 1999).

El proceso de remodelado, tanto en el hueso cortical como en el trabecular, viene regulado por un conjunto de factores genéticos, físicos, eléctricos y humorales. Algunos trastornos genéticos dan a lugar a alteraciones en el remodelado al impedir la finalización correcta de algunas de las fases, la mayor parte, al manifestarse en los primeros años de vida, afectan también a la fase de remodelado del esqueleto produciendo alteraciones en el tamaño y grosor de los huesos. (Nolla, 1997).

En la actualidad, esta demostrada la presencia de potenciales eléctricos locales en el tejido óseo. Algunas de estas señales se originan en el hueso como respuesta a un estrés mecánico, sin embargo, otras son inherentes al mismo constituyen los llamados potenciales bioeléctricos de reposo, los cuales podrían ser responsables de modificaciones en la actividad celular básica de las BRU (Unidad Remodelado óseo, por sus siglas en inglés). (Nolla, 1997).

La regulación humoral sugiere la existencia de una comunicación intercelular entre las células óseas. Dicha comunicación es de gran importancia en los procesos de regulación metabólica del hueso y en el mantenimiento de la masa ósea normal. (Nolla, 1997).

Cuando el hueso se forma por sustitución de un tejido conjuntivo primitivo (mesenquima), el proceso se denomina osificación intramembranosa. Cuando la formación del hueso se realiza de un cartílago preexistente, se la conoce como osificación endocondral. En ambos casos, el hueso se deposita inicialmente en forma de una red de trabéculas, denominada esponja primaria, que se convierte posteriormente en hueso compacto cuando se rellenan los intersticios situados entre las trabéculas. (Nolla, 1997).

3. REPARACIÓN ÓSEA

3.1. Osificación intramembranosa

La osteogénesis intramembranosa se da en el mesenquima embrionario en donde se condensa en una capa vascularizada de tejido conjuntivo primitivo. Sus células estrelladas están en contacto mutuo mediante largas prolongaciones celulares, y los espacios intercelulares están ocupados por sustancia fundamental que contiene fibras de colágena orientadas al azar. A continuación, algunas de las células mesenquimatosas provenientes de la cresta neural se agrupan y se diferencian a células osteogénicas, que depositan matriz ósea a su alrededor. Este proceso da a lugar a finas trabéculas de matriz ósea eosinófila, que tienden a formarse en puntos equidistantes de los vasos sanguíneos vecinos, y como los vasos forman una red, las trabéculas de la esponja primaria también tienen un patrón ramificado y anastomosado. (Fawcett 1999, Gartner 2003)

Otras células mesenquimales se diferencian a osteoblastos, que se reúnen sobre la superficie de las trabéculas primitivas. A medida que los osteoblastos van quedando encerrados en las lagunas de la matriz como osteocitos, son sustituidos en la superficie de las trabéculas por nuevos osteoblastos originados a partir de las células osteoprogenitoras del tejido conjuntivo perivascular. La zona de tejido conjuntivo primitivo recibe el nombre de centro primario de osificación. (Fawcett 1999, Gartner 2003)

En las regiones de la esponja primitiva destinadas a convertirse en hueso compacto, se produce un engrosamiento progresivo de las trabéculas a expensas de los espacios perivasculares que quedan muy reducidos. En aquellos lugares donde persistirá el hueso esponjoso en la vida postnatal, el engrosamiento de las trabéculas no llega tan lejos, y el tejido conjuntivo situado entre ellas se transforma gradualmente en médula ósea. En los huesos planos que se desarrollan por osificación intramembranosa, las fibras de colágeno, tienen inicialmente una orientación al azar. Ya en la vida postnatal, el hueso primitivo es sustituido por hueso laminar, en el que las fibras de colágeno de las sucesivas laminillas de

los sistemas de Havers tienen una orientación precisa. La parte de tejido conjuntivo primitivo que no sufre osificación se condensa para formar periostio y el endostio. Los huesos formados de esta manera se consideran constituidos por hueso membranoso, término utilizado para distinguirlos de los que desarrollan a partir de un cartílago preexistente. (Fawcett 1999, Gartner 2003)

3.2. Osificación endocondral

Los huesos largos, se desarrollan en el embrión a partir de cartílagos que tienen una forma similar, y que se conocen como modelos cartilagosos.

Las células osteoprogenitoras del pericondrio se activan y depositan un fino collar perióstico de hueso alrededor de la parte media de la diáfisis del modelo cartilaginoso. El mismo tiempo, capilares acompañados de células osteoprogenitoras invaden las cavidades creadas por la degeneración de los condrocitos hipertrofiados. Los vasos se ramifican y crecen hacia cada extremo del centro de osificación, formando asas capilares que se extienden hasta los extremos ciegos de las cavidades creadas en el cartílago calcificado. Las células osteoprogenitoras que acompañan a los vasos sanguíneos infiltrantes se diferencian en osteoblastos, que se agrupan sobre la superficie de las espículas de cartílago calcificado y comienzan a depositar matriz ósea sobre las mismas, creando los centros de osificación primaria. (Fawcett 1999, Maxie 2007)

La primera señal de la formación de un centro de osificación endocondral es un aumento de tamaño de los condrocitos en la **zona de proliferación** del modelo cartilaginoso; éstos presentan una baja concentración de calcio ionizado, pero la matriz presenta una concentración elevada de colágena tipo II. A medida que se ensanchan sus lagunas, se va reduciendo gradualmente la matriz cartilaginosa interpuesta hasta convertirse en espículas de forma irregular. En la **zona hipertrófica** los condrocitos en sus mitocondrias, retienen el glucógeno que han producido en la zona proliferativa; posteriormente pierden el glucógeno de forma abrupta y aparecen vacuolas, ésta pérdida está asociada al cambio de metabolismo anaeróbico que ocurre a medida que las células se alejan del aporte sanguíneo. (Fawcett 1999, Maxie 2007)

En la **zona de degeneración**, una vez que las células agotan el glucógeno, la mitocondria libera su calcio formando pequeños depósitos de cristales de fosfato de calcio en el interior de las trabéculas residuales de matriz cartilaginosa, formando los centros de osificación secundaria. (Fawcett 1999, Maxie 2007)

Este estadio de desarrollo se alcanza por lo general en el tercer mes de vida fetal. Los huesos largos en desarrollo tienen extremos ensanchados (epífisis) de cartílago hialino y un tallo (diáfisis) constituido por una región de osificación endocondral, en forma de reloj de arena, rodeada por un collar de hueso de origen perióstico. El término de centro primario de osificación abarca todos los fenómenos descritos y pretende distinguir el centro diafisiario

de osificación, que se desarrolla en primer lugar, de los centros secundarios de osificación, que se desarrollan mucho más tarde en la epífisis. (Fawcett 1999, Maxie 2007)

3.3. Proceso de reparación

Existen numerosas influencias adversas que interfieren con el desarrollo, la modelación y remodelación normales del hueso. Ejemplo al respecto de esto es la fractura, se da cuando es sometido a tensiones de corta duración. Si en principio el hueso es normal, la tensión debe ser de una magnitud mucho mayor que las que se ejercen en condiciones fisiológicas, o bien deberá ser aplicada en una dirección anormal. Por esta razón las fracturas de los huesos sanos reciben el nombre de traumáticas. (Cotran 1999)

El proceso de reparación presenta una serie de eventos alternos; (1) Fractura, (2) la producción de tejido de granulación, (3) formación del callo óseo y (4) remodelación ósea. (Frost 2002)

Se inicia por lesión del hueso, tejidos adyacentes, gran cantidad de vasos periostales y medulares de diversos tamaños producen un hematoma que ocupa la línea de fractura y rodea el área ósea lesionada. Éste proporciona una malla de fibrina, la que ayuda a cerrar el foco de fractura y al mismo tiempo permite la llegada de células inflamatorias y el crecimiento de fibroblastos y nuevos capilares. Simultáneamente, la degranulación de plaquetas y neutrófilos que migran al foco liberan PDGF, TGF- β , FGF e IL, que activan las células pluripotenciales u osteoprogenitoras del periostio, la cavidad medular y los tejidos blandos circundantes, y estimulan la actividad osteoclástica y osteoblástica. De esa manera, el hematoma se está organizando, los tejidos vecinos se han preparado para producir matriz y los extremos del hueso fracturado se están remodelando. Este tejido fusiforme todavía sin calcificar, llamado “precallo”, sirve en parte para que los extremos óseos queden fijos aunque el hueso no posea todavía la rigidez estructural suficiente para soportar pesos. (Frost 2002, Sacanell 2000)

A continuación las células osteoprogenitoras activadas forman trabéculas subperiósticas de hueso no laminar dispuestas perpendicularmente al eje cortical y dentro de la cavidad medular. Las células mesenquimatosas activadas de los tejidos blandos que rodean el foco de fractura también pueden diferenciarse en condroblastos capaces de formar cartílago fibroso y hialino que envuelve al foco de fractura, formando el callo óseo. La arquitectura del hueso nuevo, refleja la orientación de la neocapilarización formando trabéculas. Finalmente, la nueva matriz sintetizada comienza a mineralizarse. En el transcurso de esta fase, los osteoblastos rellenan con hueso nuevo la zona escavada por los osteoclastos. La mineralización se inicia en la interfase entre el osteoide y el hueso mineralizado preexistente y avanza hacia la superficie del plano de barrido. Este plano de barrido, integrado en parte por mineral amorfo, se denomina frente de mineralización. A medida que éste frente se desplaza va dejando tras de sí matriz ósea mineralizada en forma de

crisales de hidroxiapatita. Por consiguiente el espesor del osteoide, es directamente proporcional a la velocidad de formación de matriz orgánica e inversamente proporcional a la velocidad de avance del frente de mineralización. (Frost 2002, Sacanell 2000)

4. ENFERMEDADES ÓSEAS

Las reacciones generalizadas del hueso incluyen alteraciones (aumento o disminución) en la deposición o resorción óseas, o en ambas. Sin embargo, la deposición ósea afecta a los dos procesos más importantes de formación osteoblástica de matriz orgánica y de calcificación de ésta para formar hueso. La resorción ósea implica la eliminación osteoclástica del hueso formado y la liberación de minerales óseos. Es importante apreciar que una tercera parte de la cantidad total de mineral óseo puede perderse antes de que la disminución de la densidad radiográfica de los huesos se detecte fácilmente mediante técnicas radiográficas ordinarias. (Nolla 1997, Castiñeiras 1999)

Raquitismo

El raquitismo puede ser definido como una enfermedad generalizada del hueso en crecimiento caracterizada por la falta de deposición de sales de calcio en la matriz ósea orgánica (osteoide), así como en el cartílago preóseo de la lámina epifisaria de la zona de cartílago de calcificación. La deposición normal de calcio en el osteoide y en el cartílago preóseo depende en gran parte del mantenimiento de niveles fisiológicos de calcio y fósforo en el suero, lo que, a su vez, depende del balance entre los tres factores de absorción de cada elemento por el intestino, de su excreción por los riñones e intestino, y de sus índices de desplazamiento hacia y desde el hueso. (Nolla 1997, Castiñeiras 1999, Cotran 1999)

Las alteraciones patológicas del raquitismo incluyen una disminución generalizada de la matriz calcificada (hueso) y un aumento de la matriz no calcificada (osteoide), con la disminución generalizada resultante de la densidad radiográfico en todos los huesos. Además, en el lugar habitual del cartílago en calcificación de la lámina epifisaria se forma una amplia zona de cartílago preóseo no calcificado. (Nolla 1997, Castiñeiras 1999, Cotran 1999)

Osteomalacia

La osteomalacia, que quiere decir huesos blandos, es una enfermedad del hueso adulto que se caracteriza por la falta de deposición de sales de calcio en la matriz ósea orgánica (osteoide). Es en efecto, raquitismo de adultos, pero la ausencia de láminas epifisarias en los adultos excluye, por supuesto, las alteraciones de estas localizaciones que se observaron en el raquitismo. (Nolla 1997, Castiñeiras 1999, Cotran 1999)

Escorbuto (avitaminosis C)

Esta enfermedad, producida por una falta de vitamina C (ácido ascórbico), es caracterizada por un fallo de la formación osteoblástica de la matriz ósea, con la consiguiente disminución de la cantidad total de hueso (osteoporosis), y va acompañada de hemorragias subperiósticas y submucosas. Puesto que esa matriz no se forma en los núcleos calcificados de cartilago de la lámina epifisaria; la zona de cartilago en calcificación persiste y se engrosa. Sin embargo, la avitaminosis C también aumenta la fragilidad capilar y produce, por consiguiente, hemorragias espontáneas, no sólo debajo del periostio laxamente adherido, sino también debajo de la membrana mucosa de las encías y del intestino. (Nolla 1997, Castiñeiras 1999, Cotran 1999)

Cuando la hemorragia subperióstica es masiva, la adherencia normal a la metáfisis de la epífisis y de su lámina epifisaria está alterada, produciéndose una separación epifisaria. (Nolla 1997, Castiñeiras 1999, Cotran 1999)

La reabsorción de la matriz cartilaginosa es lenta o inexistente; en consecuencia, se produce un crecimiento cartilaginoso excesivo con presencia de largas espículas y placas que se proyectan en la región metafisaria de la cavidad medular y en ocasiones dan a lugar a un ensanchamiento de la epífisis. (Nolla 1997, Castiñeiras 1999, Cotran 1999)

El hueso con escorbuto responde a las fuerzas de la carga de peso y de la tensión muscular con arqueamiento de los huesos largos y con una depresión anómala del esternón y proyección hacia el exterior de los extremos de las costillas. (Cotran 1999)

Osteoporosis

La osteoporosis, que significa huesos porosos, es una enfermedad generalizada del hueso que se caracteriza por la disminución de la formación osteoblástica de la matriz combinada con el aumento de resorción osteoclástica del hueso y por la marcada disminución resultante de la cantidad total de hueso en el esqueleto (osteopenia, que significa muy poco hueso). Mientras que la disminución de la deposición ósea viene considerándose hace tiempo como el factor principal del desequilibrio que conduce a la osteoporosis, los datos recientes sugieren que el aumento de resorción ósea puede ser el factor más importante. (Nolla 1997, Castiñeiras 1999, Cotran 1999)

Las manifestaciones clínicas del déficit estructural del esqueleto dependen de los huesos que resultan afectados. Las fracturas vertebrales que a menudo aparecen en la región dorso-lumbar son dolorosas. las fracturas en los distintos niveles pueden causar una disminución considerable de la estructura y varias deformidades, como lordosis lumbar y cifoscoliosis. Con frecuencia aparecen complicaciones en las fracturas abiertas en el cuello

del fémur, la pelvis o la columna, tales como embolia pulmonar y neumonía. (Nolla 1997, Castiñeiras 1999)

Hiperparatiroidismo (osteodistrofia paratiroidea) (osteítis fibrosa quística)

Es una osteopatía rara que procede del hiperparatiroidismo y se caracteriza por una combinación de excesiva resorción osteoclástica, generalizada y localizada, del hueso con fibrosis medular. Por lo tanto, la enfermedad ósea que resulta está constituida, no sólo por una forma generalizada de osteoporosis, sino también por lesiones osteolíticas diseminadas. (Nolla 1997, Castiñeiras 1999)

La disminución de la masa ósea predispone a fracturas, deformidades secundarias al esfuerzo de cargar pesos, dolores y trastornos funcionales de las articulaciones cuando se alteran las líneas de fuerza que soportan normalmente el peso. Las fracturas tienden a ser en rama verde, principalmente en huesos largos y pelvis. También son frecuentes las fracturas no unidas (con condensación de tejido óseo en los bordes de los extremos de la fractura) (Nolla 1997, Castiñeiras 1999)

5. INJERTOS ÓSEOS

A pesar de que los injertos óseos pueden tener propiedades osteoinductivas, osteoconductoras y osteogénicas; su uso y predictibilidad están limitados debido a la dificultad para obtener una cantidad adecuada, tamaño o forma específica del hueso, así como frecuente inhabilidad para integrarse funcionalmente dentro del defecto óseo. (Henostroza 1999)

El injerto autólogo es el método natural en la reconstrucción de los defectos esqueléticos, puesto que mantiene las propiedades osteoconductoras y osteoinductivas y permite la reabsorción del mismo, sin peligro de transmitir enfermedades y sin presentar problemas de histocompatibilidad. Como inconveniente hay que decir que la cantidad disponible es limitada y siempre existe riesgo de morbilidad en la zona donadora. (Álvarez 2002)

La incorporación del injerto óseo es un proceso secuencial que comienza con la inflamación y atraviesa por diferentes estadios de revascularización, osteogénesis y remodelación hasta conseguir una estructura mecánica adecuada sin olvidar que el requisito fundamental en un injerto es su capacidad de formar o de ser substituido por hueso sin ser rechazado por el receptor.

Se consideran tres mecanismos en la incorporación de los injertos óseos:

1. la osteoinducción, proceso que induce a la formación de hueso localmente, reclutando las células necesarias;
2. la osteoconducción, proceso habitual de reconstrucción ósea que consiste en aportar un soporte para el depósito óseo, como una estructura o trama que sirve para el crecimiento óseo y que será progresivamente reemplazada por hueso y,
3. por último, el propio injerto, el cual actúa como fuente de formación de células óseas.

También se puede hablar de osteosustitución cuando un material inerte actúa como una estructura que es substituida por hueso, como las cerámicas bioactivas. Todas las técnicas de implantes óseos se basan en utilizar, en mayor o menor grado, una o varias de estas funciones. (Álvarez 2002)

Las propiedades mecánicas del injerto son su rigidez, resistencia mecánica y resistencia de fatiga. (Rojas, 2002)

La biología de la incorporación del injerto determina su capacidad biomecánica. El proceso de incorporación está determinado por varios factores, no obstante se basa predominantemente en la vascularidad en el injerto. Si el proceso de incorporación es exitoso, las propiedades biomecánicas se recuperan con el tiempo hasta lograr niveles normales. Si el desempeño del injerto respecto a las cargas fisiológicas disminuye por debajo de un nivel crítico, ocurre la falla. (Rojas, 2002)

El desempeño biomecánico de los injertos está determinado por tres factores: (1) las propiedades mecánicas del injerto, (2) la mecánica de la interfase injerto-huésped y (3) la naturaleza de las cargas aplicadas.

Las carga repetitivas o cíclicas, ocasionan que las piezas fallen aún cuando la intensidad sea menor que la resistencia del material. El fenómeno de la fatiga se debe a que dentro del material se forman microgrietas, las cuales por efecto de las cargas repetitivas se van propagando, hasta que la falla se presenta. (Rojas, 2002)

La interfase injerto-huésped, particularmente la integración en la unión, juega un papel importante en la transferencia de cargas entre el huésped y el injerto. Para esto se logre es necesario que exista un mínimo de estabilidad entre las dos partes. La presencia de tejido necrótico que no sea reparado puede crear el riesgo de fallas por fatiga, aún cuando existan uniones sólidas. (Rojas, 2002)

Los injertos óseos son ampliamente usados en cirugía ortopédica y maxilofacial. El material ideal de un injerto es el hueso esponjoso autólogo (tomado de la cresta ilíaca de o de la epífisis proximal de la tibia), sin embargo, puede existir morbilidad en el sitio donador, además de la cantidad requerida frecuentemente excede a lo que se mantiene disponible, por lo que se ha sugerido diferentes alternativas del uso de biomateriales de injerto. (Rojas, 2002)

La desmineralización del hueso, disminuye la respuesta inmune y expone los factores de crecimiento de la matriz, los cuales tienen participación directa en las funciones de osteogénesis, osteoinducción, remodelación, realización y homeostasis en el microambiente celular óseo. (Rojas, 2002)

6. MARCADORES BIOQUÍMICOS DEL HUESO

El hueso se remodela de manera constante, redistribuyendo su matriz y los depósitos minerales a lo largo de las líneas de fuerza, impuestas por las necesidades mecánicas. Éste proceso de renovación, mantiene el hueso saludable, presentando al metabolismo óseo dos actividades opuestas; la formación de hueso nuevo por el osteoblasto y la degradación de hueso viejo por el osteoclasto. Estas actividades se acoplan en el espacio y en el tiempo constituyendo las llamadas "unidades de remodelado óseo" (BRU). Por tanto la masa ósea dependerá del equilibrio entre la formación y resorción en cada unidad de remodelado, como del número de unidades activas; cuya regulación depende de factores hormonales (PTH, Vitamina D, hormona tiroidea, estrógenos, cortisol, hormona del crecimiento, andrógenos), físicos y neurales. (Sandoval 2005)

6.1. Marcadores de la resorción ósea

Pueden medirse como:

- Producto de la síntesis de los osteoclastos: Fosfatasa ácida tartrato resistente, parece un reflejo más específico de la actividad osteoclástica y, lo más importante parece no estar influenciada en pacientes con fallo hepático o renal. (Sandoval 2005)
- Producto de la degradación de la matriz mineral: calcio urinario
- Productos de la degradación del colágeno tipo I: hidroxiprolina, piridinolina, Telopéptidos N terminal de colágeno; relativamente específicas de hueso. Estas estructuras no son absorbidas por la dieta y se filtran por riñón sin degradarse, ya que no son metabolizadas excretándose en la orina unida a proteínas o de forma libre. (Sandoval 2005)

6.2. Marcadores de la formación ósea

Todas son proteínas sintetizadas por el osteoblasto

- Fosfatasa alcalina ósea, es una enzima que interviene en la formación ósea y en la mineralización del osteoide. Aunque puede originarse en muchos tejidos, en condiciones normales 50% de la FA sérica proviene del hígado y el otro 50% es de procedencia ósea. (Sandoval 2005)
- Propéptido carboxiterminal de procolágeno tipo I; del hueso procede de una molécula de procolágeno que es sintetizada por el osteoblastos. Al ser liberada sufre una escisión de sus extremos amino y carboxiterminal que resulta en la formación de la molécula de colágeno por un lado y de los péptidos de los extremos amino y carboxilo por el otro. Estos se conocen como “protelopéptidos amino y carboxiterminal del colágeno I”. (Sandoval 2005)
- Osteocalcina, es una proteína con tres residuos de ácido gamma-carboxiglutámico, que le proporciona una apetencia por el calcio. Cuando se forma, parte de ella no se deposita en el hueso, si no pasa a la sangre, donde su determinación proporciona un índice de la actividad osteoblástica. (Sandoval 2005)

7. OSTEOCALCINA

La OC es un polipéptido que se encuentra en mamíferos, aves y algunos peces; es sintetizada por el osteoblasto e incorporada a la matriz ósea y una fracción se libera a la circulación donde puede ser medida. Hay una correlación directa entre mayores niveles de OC y mayor actividad de los osteoblastos. (Allison 2000, Delmas 1993)

El ácido gamma-carboxiglutámico (GLA) es un aminoácido que resulta de la carboxilación del ácido glutámico y que requiere la presencia de la vitamina K₁ y de una carboxilasa. Se halla contenido en la protrombina y en otros factores de la coagulación dependiente de la vitamina K₁ tiene una afinidad por el calcio. El término proteína GLA de la matriz indica el hecho de que permanezca íntimamente ligada a la matriz orgánica del hueso incluso después de la mineralización. Se ha encontrado en numerosos tejidos y en diferentes tipos de cartílago; de crecimiento, costal, esternal, nasal y traqueal, aparece antes que la OC en el proceso de mineralización del hueso. En la actualidad es prematuro atribuir un papel fisiológico a la GLA, aunque en el cartílago podría tener una función análoga a la OC en el hueso. (Allison 2000, Eastel 2001)

La OC se halla exclusivamente en el hueso y dentina; es una proteína no colagénica constituida por una sola cadena de polipeptídica compuesta por 49 aminoácidos con un peso molecular de 5800 Daltons. Su síntesis tiene lugar en los osteoblastos y es estimulada por la 1,25 dihidroxicolecalciferol, se incorpora a la matriz ósea, pero una fracción pasa a circulación. Esta molécula consiste en tres partes, en 23-residuo péptido de señalización durante la translocación, en 26 residuo proteína para la gamma carboxilación y el 49 residuo proteína madura. (Allison 2000, Eastel 2001)

Gamma carboxilación de la osteocalcina

Es una proteína dependiente de la vitamina K₁ o filoquinona es un co-factor esencial para la post-translocación γ - carboxilación de osteocalcina. Durante la carboxilación, un segundo grupo carboxilo es agregado como residuo glutamil específico en la posición 17,21 y 24 formando γ - carboxiglutamil. Este cambio estructural, estabiliza la porción α - helicoidal asignando afinidad por el calcio e hidroxapatita. Los residuos de GLA facilitan que la OC se una a la hidroxapatita, favoreciendo de este modo la formación ósea y su mineralización. (Allison 2000, Eastel 2001)

En medicina en humanos, existe una correlación inversa entre los niveles de OC y la dosis de prednisona recibida durante largos períodos de tiempo en pacientes con diferentes enfermedades reumáticas, hipercorticismo endógeno, disminuyendo la osteocalcina y se recupera el nivel normal con el tratamiento. En la osteomalacia la OC se relaciona con la producción de osteoide, pero no con la mineralización.

En la exposición con Warfarina Sódica en el feto durante el primer trimestre, tuvo como resultado el nacimiento de infantes con hipoplasia nasal, no hubo calcificación en falanges distales. (Allison 2000, Eastel 2001)

La intoxicación con Cadmio, muestran estadios tempranos de disfunción tubular renal, manifestándose patologías óseas como la osteoporosis o la combinación de ésta con osteomalacia. (Kido 1991)

8. INMUNOFLUORESCENCIA

Este conjunto de técnicas, que han sido tomadas tanto de la genética molecular como de la bioquímica, nos permite analizar fenómenos biológicos y patológicos en el nivel molecular. Al igual que la microscopía electrónica y la inmunofluorescencia, estas técnicas pueden aplicarse para refinar un diagnóstico. (García 2001)

Corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en la célula o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. (García 2001)

Estas técnicas necesitan de controles internos o paralelos, usualmente positivos y negativos. El control negativo se obtiene realizando la misma técnica, pero con omisión del paso de incubación con anticuerpo primario. Existen sistemas automatizados que permiten la tinción de un gran número de casos simultáneamente con la ventaja de pasos definidos y estandarización de las variables usuales con costo relativamente bajo y en mucho menor tiempo. (García 2001)

8.1. Fundamento

La fluorescencia es una forma de luminiscencia entendiéndose ésta última como la emisión de luz que se produce a partir de una fuente de energía no térmica y bajo el efecto de una excitación. (García 2001)

Los tejidos que no poseen esta propiedad se puede inducir la fluorescencia, llamándola fluorescencia secundaria, esto se puede hacer mediante tinción histoquímica con sustancias fluorescentes llamadas fluorocromos o uniendo fluorocromos a antígenos dirigidos a anticuerpos tisulares. De este último procedimiento se sirven las técnicas de inmunofluorescencia. (García 2001)

8.2. Fluorocromos

Son sustancias químicas que tienen la propiedad de absorber fotones de alta energía procedente de la radiación ultravioleta o del espectro visible. Ello provoca una redistribución de los electrones de las moléculas fluorescentes, puesta de manifiesto por la emisión de una radiación luminosa de longitud de onda distinta aunque dentro del espectro visible. (García 2001)

Si al iluminar una sustancia con luz visible ocurre un fenómeno similar descrito y la liberación de energía se produce de forma gradual, prolongándose la emisión de luz después de cesar la iluminación del objeto, este fenómeno se llama fluorescencia. (García 2001)

Los fluorocromos más utilizados en las técnicas de inmunofluorescencia son:

- Fluoresceína: absorbe luz azul y emite fluorescencia verde manzana
- Rodamina: absorbe luz verde y emite fluorescencia roja anaranjada.
-

8.3. Técnicas de inmunofluorescencia

En la técnica de **inmunofluorescencia directa** se utiliza un anticuerpo específico frente al antígeno que se desea detectar. Dicho anticuerpo está ligado a un fluorocromo. (García 2001)

En las técnicas de **inmunofluorescencia de tipo indirecto** se emplea en un primer paso el anticuerpo específico no marcado y en una segunda fase un anticuerpo marcado con el correspondiente fluorocromo que reacciona de forma específica con el anticuerpo primario. (García 2001)

8.4. Microscopio de fluorescencia

Las técnicas de inmunofluorescencia deben examinarse siempre con un microscopio especial llamado **microscopio de fluorescencia**. (García 2001)

Este tipo de microscopio lleva incorporado una fuente de luz ultravioleta y luz visible, varios filtros que selecciona la longitud de onda de la luz que incide sobre la muestra a estos filtros se llaman filtros de excitación o filtros primarios. También tienen un filtro que selecciona las longitudes de onda emitidas dentro del espectro de la luz visible dejando pasar sólo la luz emitida por las sustancias fluorescentes e impidiendo el paso de la luz excitadora, este filtro se llama filtro secundario o de barrera.

Existen 2 tipos fundamentales de microscopio de fluorescencia: En uno de ellos la luz de excitación se transmite a través de la muestra y le llamamos microscopio de transmisión.

En el otro la luz se refleja en el tejido procedente de un foco de iluminación superior, a este lo llamamos microscopio de luz de incidencia o epiiluminación. (García 2001)

Un aspecto elemental, pero esencial, es la preservación del tejido desde el momento de su obtención. La inmensa mayoría de técnicas de IHQ pueden aplicarse a tejido fijado e incluido en parafina con buenos resultados, siempre que la fijación tisular, su proceso e inclusión se realicen correctamente. La utilización de métodos o reactivos inapropiados en el tratamiento tisular previo a la IHQ determina pérdidas de antigenicidad que limitarán o impedirán la obtención de resultados fiables. (García 2001)

9. OBJETIVOS

9.1. General

Evaluar las características histológicas e identificar mediante la inmunohistoquímica la presencia de osteocalcina en la reparación ósea con la utilización de aloinjertos tubulares en caninos.

9.2. Específicos

1. Identificación de la osteocalcina, por medio de inmunofluorescencia indirecta en muestras fijadas en formol y procesadas por el método de inclusión en parafina de rutina.

2. Evaluación de la actividad osteogénica mediante la detección de osteocalcina.

10. HIPÓTESIS

Si la incorporación de los aloinjertos en la fase de reparación ósea favorece la osteogénesis a través de la osteconducción y osteinducción, entonces será posible determinar los procesos de reparación ósea a través de la detección de osteocalcina mediante inmunohistoquímica, con el fin de encontrar zonas con mayor reacción, en las áreas de osteogénesis a diferencia de aquellas que no fueron injertadas.

11. MATERIAL

Material biológico.

Este estudio se constituye en la continuación del trabajo “Evaluación clínica, radiológica de injertos tubulares”, realizado por en el cual se evaluó la integración de hueso desmineralizado durante la reparación ósea.

- Se utilizarán 12 muestras de perros criollos machos, comprendiendo una edad de 2 a 3 años, los cuales fueron sometidos a una osteotectomía en el tercio medio de la tibia derecha de aproximadamente 1cm.; a un grupo se injerto con hueso desmineralizado y fueron sacrificados semanalmente, fijados en formol y procesados por el método de inclusión en parafina de rutina, para la obtención de cortes histológicos a las 4, 5, 6 y 7 semanas.

- A estas mismas muestras se les realizarán cortes para su procesamiento a través de técnicas de inmunofluorescencia indirecta, para identificar la osteocalcina. Para esto se hará reaccionar el preparado a analizar con un anticuerpo primario “osteocalcin (V-19)sc18319 Lot# D2507 Santa Cruz Biotechnology” dirigido a la osteocalcina, lo cual será marcado con un anticuerpo secundario Goat Anti-rabbit IgG Fluorocein Conjugated Lot #1403, BIOSURCE, dirigido contra el anticuerpo primario, con lo cual se forma un complejo secundario visible mediante microscopia de fluorescencia.

- Albumin Bovine, Initial fraction by heat shock, Lot # 112KO588, SIGMA

Material no biológico

Reactivos:

- Tritón X-100 Lot# 115152, Ultrapure, USB Corporation
- Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS)
- Ultra Cruz Mounting Medium for Fluorescence with DAPI, Lot# B2808 Santa Cruz Biotechnology
- Agua desionizada
- Probetas
- Matraz Erlenmeyer
- Vaso de precipitados
- Pipetas graduadas
- Micropipetas de Repetición de Volumen
- Puntas de dispensación estériles
- Espátula
- Agitador vortex
- Balanza analítica METTLER TOLEDO
- Papel aluminio
- Refrigerador

12. METODOLOGIA

El trabajo se realizó en las instalaciones de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria ubicada en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. Localizada en el Km. 2.5 de la carretera Cuautitlán Teoloyucan, municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

La obtención de los aloinjertos fue a partir de tibias de donadores previamente evaluados (clínica, biometría completa y química sanguínea, perfil renal y hepático), constatando que se encuentren sanos, posteriormente se sacrificaron y la obtención de las tibias se realizó con todas las medidas de asepsia, antisepsia y colocación de campos estériles. Obtenidas las tibias fueron lavadas y desmineralizadas utilizando solución ácida de Van Ebner.

Mezcla de Acido Clorhídrico-Sodio de Van Ebner:

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

El proceso de descalcificación se agregó diariamente por quince días, 5 ml de ácido clorhídrico a la fórmula, así hasta lograr la completa éste, valorando su consistencia blanda y color semitransparente, lo cual indicaba su desmineralización.

Durante la inmunotinción es conveniente aplicar alguna forma de fijación para preservar el tejido.

Aunque los procedimientos habituales de deshidratación y aclaración no deterioran excesivamente los antígenos, la inclusión habitual tanto en parafina como en algunas resinas sintéticas pueden afectar a los resultados La inclusión en parafina caliente (60°) produce pérdida de antigenicidad, por lo que el tiempo de infiltración debería reducirse al mínimo y se ha llegado a recomendar el empleo de parafinas de bajo punto de fusión.

Los cortes de parafina se obtienen de un grosor de 3 – 5 micrómetros y se dejan secar toda la noche en la estufa a 37° C.

A continuación se desparafinan e hidratan cuidadosamente, se debe evitar la deshidratación de las muestras es necesario sumergirlas en solución de Amortiguador salino de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés).

Cuando se aplican los métodos inmuno enzimáticos es bastante fácil que se desprendan los cortes debido a los numerosos lavados que es preciso efectuar. Por ello

se recomienda emplear un adhesivo que fije las secciones al portaobjetos, existen varios tipos de adhesivos como albúmina de Mayer.

Para contrarrestar la escasa penetración de algunos conjugados se suele recurrir al uso de detergentes como el Tritón X – 100 que actúa permeabilizando las membranas.

Preparación de Tritón 20ml= 100µl Tritón + 20ml de PBS

Para un buen desarrollo de la técnica es conveniente realizar siempre los siguientes controles:

- Control negativo: se omite el antisuero primario o se sustituye por una solución tamponada, utilizando el mismo tejido que para el control positivo.
- Control positivo: se utiliza una sección de tejido del que se tenga certeza absoluta de que contiene el antígeno por determinar, de esta forma si con un control positivo la técnica es negativa me indica un fallo en el procedimiento técnico o un defecto de fijación.

Dilución

Para obtener una tinción óptima es importante que cada antisuero se use en la dilución adecuada, que no se evapore durante la incubación y que el anticuerpo no unido al antígeno se elimine por completo antes de la incubación siguiente.

Anticuerpo 1:20, para muestras pequeñas se utilizan 30µl de A´c por laminilla y para muestras grandes 50µl de A´c por laminilla.

6 laminillas (muestras grandes) – 50µl= 300µl de Anticuerpo
20 / 300µl = 15µl de A´c
285µl de PBS

12.1. TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

- 1.- Sumergir las laminillas en PBS para evitar que la muestra se deshidrate.
- 2.- Permeabilizar con Tritón al 5% por 20 min.
- 3.- Lavar tres veces con PBS.
- 4.- Bloquear con BSA durante 20 min.
- 5.- Lavar tres veces con PBS.
- 6.- Poner anticuerpo primario osteocalcina 1:20, incubar en cámara húmeda en refrigeración toda la noche.
- 7.- Lavar tres veces con PBS.
- 8.- Poner el anticuerpo secundario cerdo anti-cabra conjugado con fluoresceína.
- 9.- Incubar tres hrs. a temperatura ambiente, manteniendo en oscuridad.
- 10.- Lavar tres veces con PBS.
- 11.- Lavar con agua desionizada
- 12.- Secar las laminillas cuidando la muestra.
- 13.- Montar el cubreobjetos con medio de montaje.
- 14.- Observación al microscopio de fluorescencia.

13. RESULTADOS

Una vez realizada la preparación de las laminillas, realizamos una descripción de éstas encontrando cambios a partir de la quinta semana y para ello lo describimos a continuación.

En la evaluación histológica a las 5 semanas con la tinción H.E, se pudo observar que la reparación ósea, en la zona de defecto del grupo experimental, se distinguen lagunas de formación ósea en la zona central de ésta, presencia de fibras de colágeno y consecuentemente infiltración de células polimorfonucleares que se orientan del periostio hacia la zona del área del defecto (figura 1ª). Mientras tanto, en el grupo control en la zona medular se pudo distinguir la organización de diversas trabéculas cartilagosas, la aparición de zonas de neovascularización, así como una mayor actividad osteoblástica en la periferia de las lagunas de formación ósea (figura 1b).

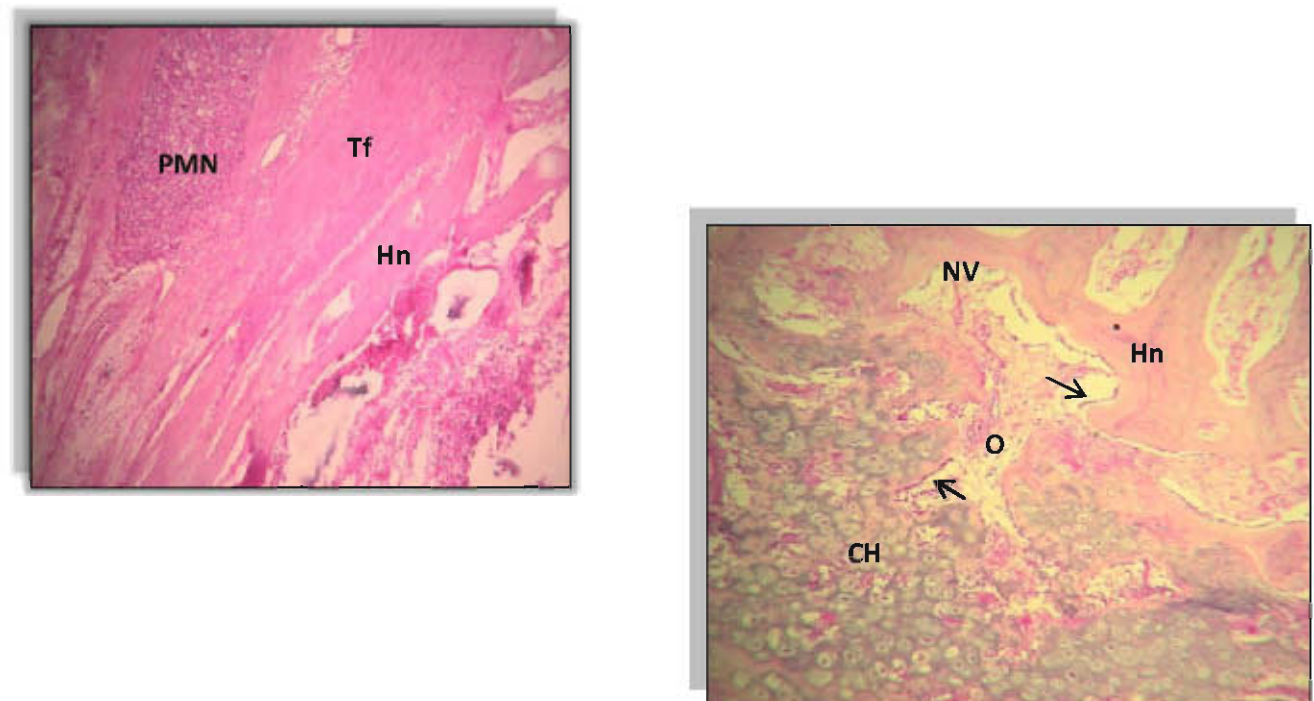


Figura 2. Regeneración ósea a las 5 semanas; a) experimental y b) control, microscopio óptico 10x PMN- polimorfonucleares, Hn- Hueso de nueva formación, Tf- Tejido fibroso, CH- Cartilago Hialino, O- Osteoblastos (flechas), NV – neovascularización.

A las 6 semanas de la reparación ósea de la tibia, en grupo experimental la zona de defecto, en la porción media hubo una mayor formación de cartílago, observándose en la periferia de éste una infiltración de osteoblastos y en algunos puntos ya la formación de osteocitos. (Figura 3^a) El grupo control presentó y sobre todo en el contorno del corte y de forma localizada, cartílago en estado de necrosis, así mismo se pudo observar el inicio de la deposición de minerales entre las fibras de colágeno. (Figura 3b)

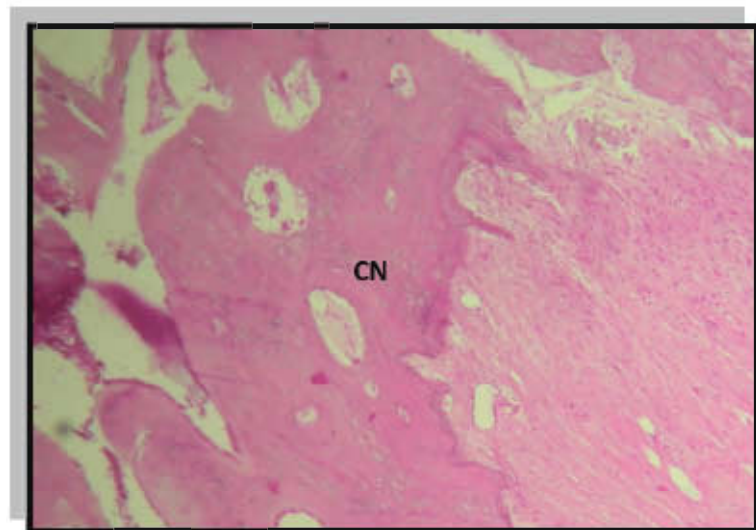
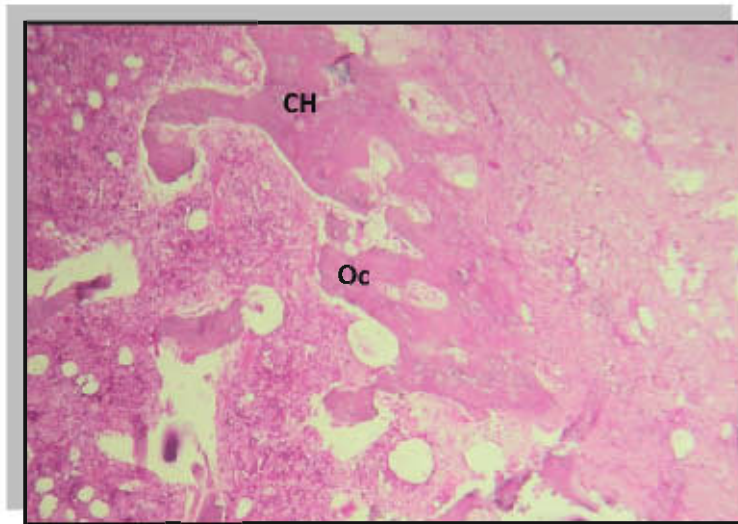


Figura 3. Regeneración ósea a las 6 semanas HE. Experimental y b) Control, microscopio óptico 10x CH- Cartílago Hialino, Oc- Osteoclastos, CN-Cartílago en Necrosis.

Por otro lado en la evaluación a las 7 semanas se pudo observar que el grupo experimental, en la región media del corte se continúa con un infiltrado de células PMN, así como la formación de lagunas ósea. (Figura 3^a). Mientras que el grupo control y principalmente en el endóstio y medula se continúa con la formación de lagunas de osificación y una evidente neovascularización. (Figura 3b)

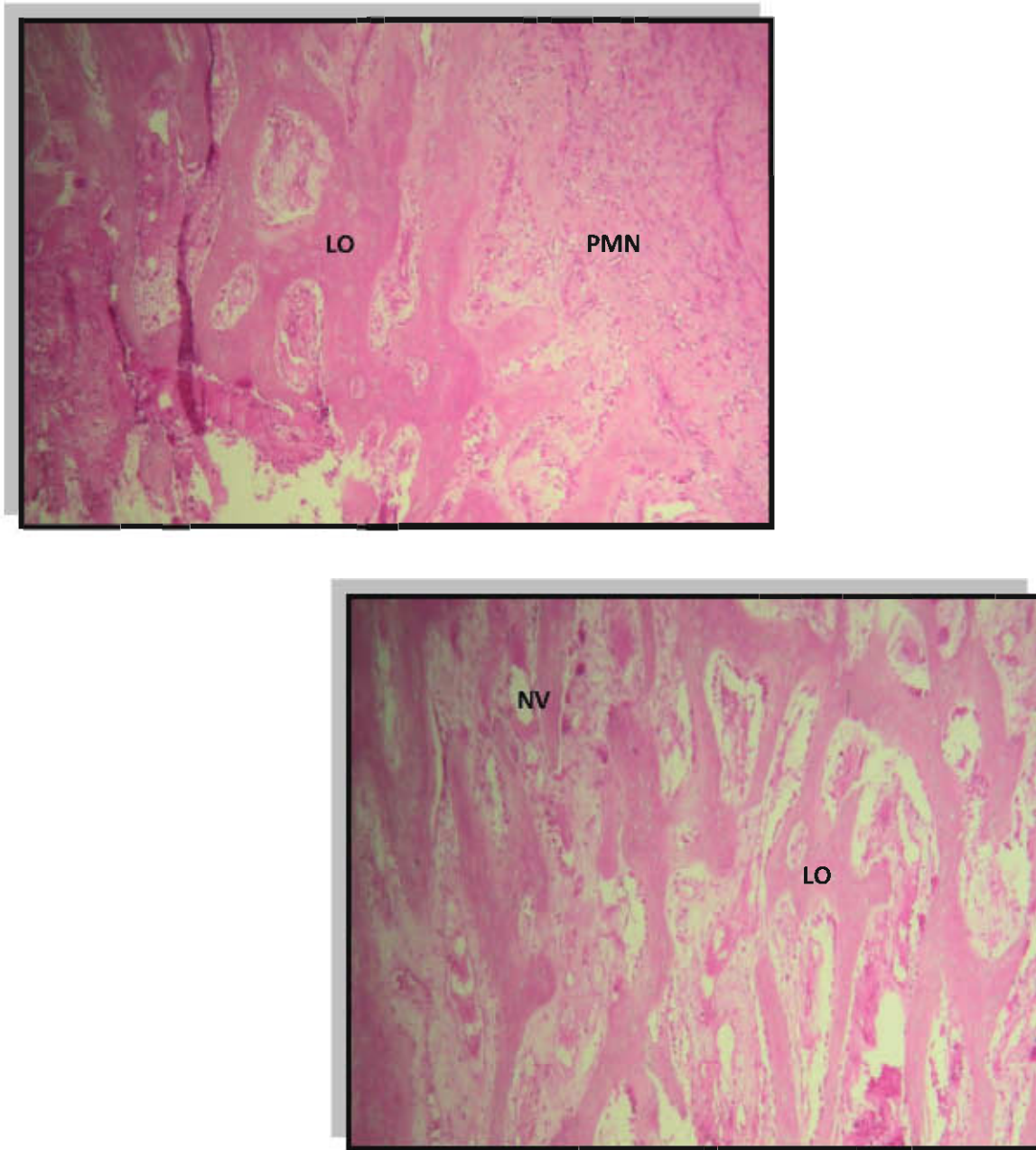


Figura 4. Regeneración ósea a las 7 semanas HE; A) experimental y b) Control, microscopio óptico 10x, PMN- Polimorfonucleares LO- Lagunas de Osificación, NV – neovascularización.

A las 8 semanas de la regeneración ósea del grupo experimental se observa abundante tejido fibrocartilaginoso, una infiltración de PMN, y aún se localizan restos del injerto, sin embargo, se distingue una mayor formación de hueso nuevo (figura 4^a). Mientras tanto en el grupo control se pudo determinar la deposición de matriz cartilaginosa, continuando su calcificación hasta formar hueso maduro. (figura 4b).

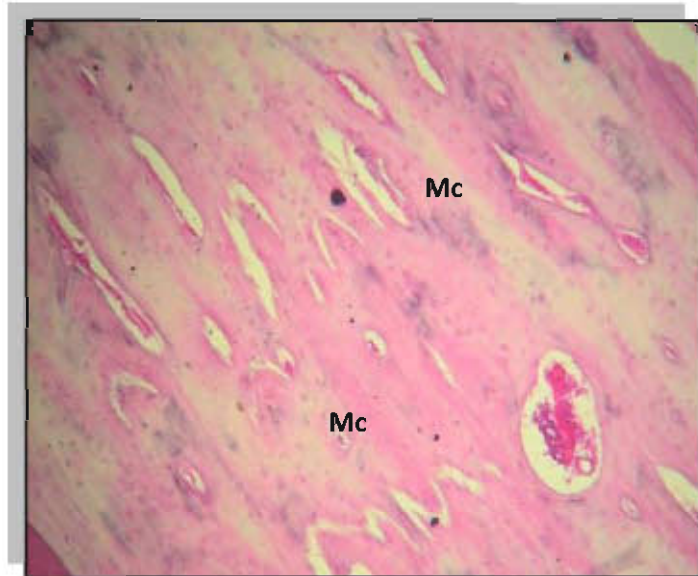


Figura 5. Regeneración ósea a las 8 semanas. HE. Experimental y b) Control, microscopio óptico 10x Ha- Hueso aloinjerto, Hn- hueso de nueva formación, PMN- polimorfonucleares, Mc- Matriz cartilaginosa.

Figura 6. Características histológicas más importantes que se representan en las muestras, se analiza la zona de defecto óseo a diferentes tiempos.

MUESTRAS	Controles				Experimentales			
	C5	C6	C7	C8	E5	E6	E7	E8
Hueso en Neoformación	-	+	+	++	+	+	+	++
Fibro/granulomatosis	++	-	+	-	++	++	++	+
Acumulo de PMN	++	+	++	-	++	++	++	+
Vascularización	+	+	+	++	+	+	+	+
Periostio de neoformación	-	-	+	++	-	-	+	+
Degradación del injerto	-	-	-	-	+	+	++	++
Cartílago hialino	+	+	+	++	+	++	++	+
Cartílago fibroso	+	+	+	+	++	++	+	++

Tanto en el grupo experimental, como en el grupo control; en la figura 5 se analiza de forma condensada las características histológicas más importantes que se presentaron en ambos grupos durante el experimento, es decir el tipo de celularidad o alguna otra característica y que se presentaron a partir de la 5 semana y hasta la 8. Se puede observar que de acuerdo a la hallazgo encontrado se pudieron categorizar de la siguiente forma: con un (-) cuando no se observaba ningún cambio; (+) cuando se observaba cambios y (++) cuando se exacerbaba ésta.

A partir de la semana 5 el grupo experimental presento mayor proliferación de células inflamatorias, disminuyendo a las 7 semanas y poca formación de cartílago en la semana 8, y aún se observaban zonas en las que se refiere al injerto, sin embargo se apreciaban zonas de mayor formación de tejido cartilaginoso.

El grupo control en la semana 5, en la zona de defecto mostró mayor vascularización, exacerbándose hasta la octava semana, así como una formación de cartílago; en la semana 8, se presentó la formación de hueso nuevo.

Es importante hacer mención que debido a que el método de inmunohistoquímica no se logró captar ninguna luminiscencia, no se pudieron obtener resultados derivados de esta prueba, por lo que se dio como negativo el resultado. Sin embargo, las muestras fueron sometidas a una nueva tinción la cual fue Azul de Alciano, con el fin de verificar la formación y presencia de matriz cartilaginosa, tal y como se puede observar en la Figura 7, en la cual se tiñe de azul celeste, que indica la producción osteoblástica.

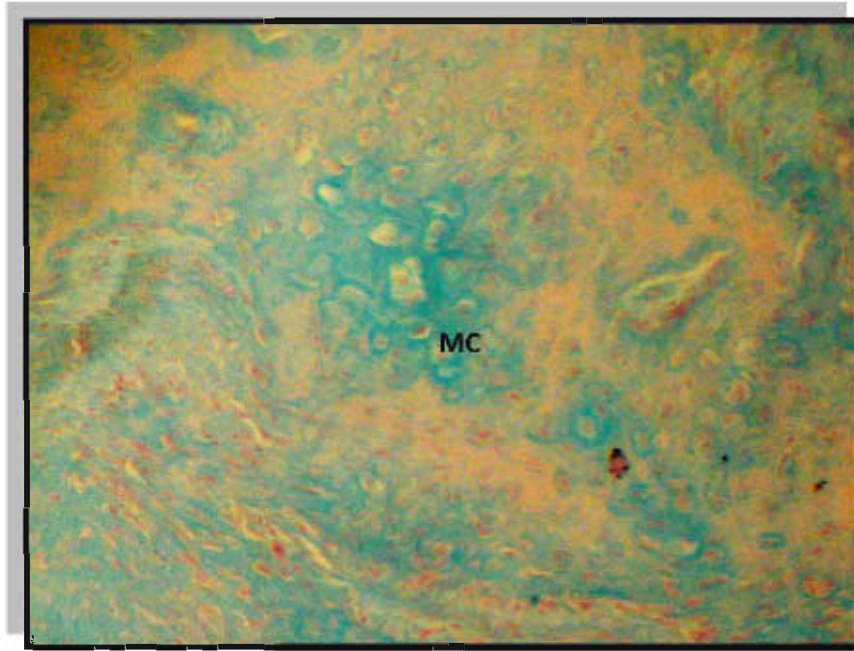


Figura 7. Regeneración ósea a las 7 semanas del grupo control, tinción Azul de Alciano, microscopio óptico 10x. MC- Matriz Cartilaginosa en formación.

14. DISCUSIÓN

Durante el daño ejercido sobre los tejidos profundos existe la producción y liberación de ciertos factores de crecimiento, mismos que actúan de diferentes formas; una de ellas es ser un estimulante celular que favorece el crecimiento óseo. (Diez García 2002)

El aloinjerto utilizado conforma un biomaterial totalmente libre de la parte orgánica por medio de procesos de eliminación con soluciones ácidas y calor, mismos que permiten evitar que exista un rechazo del receptor, además de poseer factores de crecimiento para una adecuada reparación, fenómeno conocido como osteoinducción. Al realizar una comparación histológica entre el grupo experimental (injertado) y control, se pudo observar que en ambos grupos en un inicio del experimento se comportaron en una forma similar, desde el punto de vista histológico, sin embargo, al paso de la 6 semana en el grupo control se pudo observar cierta calcificación y mayor formación de hueso suave. A diferencia de esto, el grupo experimental mostró eventos continuos de inflamación, menos formación de lagunas óseas y angiogénesis la cual aporta células osteoprogenitoras que asegura la osteointegración que es la sustitución de un complejo óseo necrótico por uno viable y nuevo (Palacios 2005); lo cual hace suponer que el injerto tuvo influencia en la inflamación y la posible inhibición de formación de tejido fibroso. Por otro lado, en la valoración clínica durante la reparación, el implante proporciona funciones mecánicas. Entre éstas funciones está proveer un microambiente estable en la zona de defecto y tejido adyacente, lo cual permite la corrección del daño.

Así mismo Flores (2004), en un trabajo previo a éste con injertos tubulares, presentaron características histológicas similares a este trabajo; en el cual el grupo control mostró una mejor reparación ósea presentando un significativo tejido de granulación y tejido fibroso, en donde el análisis en el punto de apoyo tuvieron mejor respuesta, manifestaron menos dolor, debido a que había menos inflamación en la zona de defecto. La pérdida de tejido óseo y especialmente de contacto físico entre los bordes de la fractura, fue de alguna manera disminuida por el implante, es decir actuó como un puente entre los bordes del defecto, lo que redujo la intensidad de la respuesta y probablemente una menor producción de factores de crecimiento celular. El espacio físico ocupado por el implante, reduce el espacio “vacío”, que en el animal sin implante es ocupado por sangre y especialmente por un coagulo plaquetario. (Flores 2004)

Por otro lado Dasso y col. (1998) dentro de su trabajo en conejos y donde realizo defectos de 3-4 mm en el tercio proximal de la tibia y comparando diferentes tipos de preservación de los injertos (liofilización, congelación y desmineralización), así como la resolución de la fractura sin injerto (control); al analizar los tratamientos determinaron que los desmineralizados son más eficientes ya que a través de este procedimiento se destruyen los componentes orgánicos y los elementos antigénicos presentes en el implante,

disminuyendo de esta manera las posibilidades de rechazo por parte del huésped y facilitando la llegada de células indiferenciadas desde el periostio, endostio y médula ósea. El mayor grado de reparación observado en el grupo control, se explicaría por el tamaño de la lesión, la que al ser capaz de reparar por sí sola, comenzó inmediatamente la síntesis de hueso, a diferencia de los injertados en el cual de forma paralela a la síntesis de neohueso ocurre la reabsorción del implante, y que al parecer retarda la reparación, haciéndola más lenta. En nuestro trabajo sucedió algo similar ya que en los injertados la presencia de células de inflamación persistió hasta la séptima semana y que coincide con una mayor degradación de injerto (Dasso y col. 1998)

Por otro lado la reparación de las lesiones ocurrió a través de osificación directa, sin formación de cartílago intermediario. Esta situación explica por el hecho de que no se realizó una fractura completa del hueso sino que sólo se realizó una lesión circular y muy pequeña 3-4 mm, por lo cual no hubo inestabilidad ósea que promoviera el movimiento, comportándose como una fractura estable en la cual las células mesenquimáticas se diferencian a osteoblastos, los que sintetizan hueso sin formación de cartílago intermediario. (Dasso y col. 1998) En nuestro trabajo existió evidentemente una fractura inestable con un defecto de 1 cm., la cual fue estabilizada mediante un fijador esquelético y que permitió la existencia de cartílago hialino en ambos grupos.

Domínguez 2007, trabajó con implantes de origen bovino en cresta iliaca de conejos; en estos ejemplares, la invasión de la médula se muestra en las zonas periféricas al implante debido a la existencia de los espacios intertrabeculares, los cuales son posibles a causa de las trabéculas del implante bovino que funcionan como patrón donde las células osteoprogenitoras forman el hueso nuevo. Adelanta los eventos mostrando compactación y calcificación del tejido al tiempo de las 4 semanas, exhibiendo colonización de osteocitos maduros sobre la matriz, semejando características del tejido original. (Domínguez y col. 2007). Sin embargo sus resultados son diferentes a los nuestros y consideramos que se debe al tipo y amplitud del defecto y la zona de injertación.

Las nuevas técnicas de biología molecular están disponibles para la investigación de la consolidación ósea, éste proceso de consolidación tiene que ver con el transporte de calcio, resorción de tejido conectivo y del metabolismo celular. El periostio está innervado por fibras sensoriales que pueden contribuir a la regulación del flujo sanguíneo perióstico y medular. (Diez García 2002)

Simes y col. (2003) identificó la proteína GLA en cartílago bronquial en peces, por medio de varios métodos entre ellos la inmunohistoquímica, para la preparación de estos tejidos, primero los congelaron en nitrógeno líquido para su preservación y posteriormente removieron la matriz orgánica con HCL. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-rabbit peroxidasa conjugado en dilución de 1:1500, en los controles negativos se utilizó suero

normal de conejo. Describiendo la histología se encontró inmunoreacción, en el citoplasma de algunas células, proliferación de condrocitos en la periferia de la matriz cartilaginosa. Para su se utilizó como tinción Azul de Alciano, se demostró matriz extracelular cartilaginosa. (Simes 2003)

Así mismo Bar y col. (2003) detecto la regulación de Osteocalcina en la reparación del hueso por medio de inmuohistoquímica, como modelo experimental utilizaron hueso femoral de ratón. Las muestras extraídas fueron sumergidas en formol al 4%/ PBS por 14 días, para su descalcificación y fueron tratados con parafina, posteriormente se mantuvieron en refrigeración, sin congelar. Se utilizó anticuerpo policlonal rabbit anti-mouse, diluido 1:100 en PBS. Los resultados mostraron formación de cartílago hipertrófico y hueso trabecular, detectaron la luminiscencia de del citoplasma de las células. (Bar 2003).

En nuestro trabajo el resultado de la inmuohistoquímica, fue negativo, no se obtuvo luminiscencia debido a que las muestras fueron sometidas a varios procesos, como son la desnaturalización con solución ácida la cual se considera muy agresiva para la muestra, produciendo movimientos de epitopos.

Posteriormente para estabilizar la muestra se utiliza formol al 10%, produciendo que las proteínas se enmascaren; para la utilización de la inmuohistoquímica es necesario utilizar paraformaldehído, solución que es libre de alcohol evitando la coagulación de proteínas; ésta solución no se utilizó por que no se tenía contemplado la realización de la prueba de inmuohistoquímica.

Sucesivamente las muestras fueron tratadas por el método de inclusión de parafina de rutina sometiéndolas a un calentamiento de 60° C, la cual deteriora los antígenos, alterando los resultados.

Sin embargo, varios autores utilizaron diluciones de 1:200 a 1:500; en el experimento se utilizaron diluciones de 1:20 que es mas especifica para que el anticuerpo se adhiera a la enzima, un control positivo basado en una muestra de cartílago de pez, aun así no se obtuvo lumiscencia lo que hace suponer que el anticuerpo no estaba en buenas condiciones.

15.- RECOMENDACIONES

Para el uso de la inmunohistoquímica se sugiere el uso de biomateriales de reciente obtención, ya que muestras mayores de cuatro años pierden cualidades específicas requeridas para el estudio.

Someter los biomateriales a procesos de refrigeración o congelación con nitrógeno líquido, o la utilización de paraformaldehídos, evita la coagulación de proteínas o disfrazar epítopos; estos procedimientos se requieren para garantizar resultados confiables en la utilización de la inmunohistoquímica.

16. CONCLUSIONES

- 1.- En este trabajo se demostró que la utilización de muestras sometidas a procesos de descalcificación y calentamiento elevado; pierden propiedades de antigenicidad, lo que altera considerablemente los resultados en la técnica de inmunohistoquímica.
- 2.- Al no obtener los resultados esperados en la inmunohistoquímica; aún con el uso de una muestra control positivo a base de cartilago de pez, nos hace deducir que probablemente el anticuerpo utilizado no estaba en condiciones óptimas.
- 3.- El uso de método alternos, como la tinción en H.E. y Azul de Alciano, nos sirvieron para verificar que había repuesta de inducción por parte de la Osteocalcina, evidenciando crecimiento celular y formación de lagunas de osificación.
- 4.- Este trabajo puede ser un antecedente de que el uso de muestras antiguas, no actúan de manera positiva para ser procesadas a la técnica de inmunohistoquímica.
- 5.- El uso de aloinjertos desmineralizados en defectos óseos en caninos puede ser utilizado en la clínica, ya que al no encontrarse evidencia celular de rechazo en nuestro trabajo, nos permite pensar que el método de desmineralización optimiza la respuesta del receptor para aceptarlos.
- 6.- En los resultados se evidencia que la aparición de células polimorfonucleares y acumulo de tejido fibrocartilaginoso fue más evidente y persistente en el grupo experimental, lo cual indica que entre la 6 y 7 semana se mantiene la resorción del injerto, ya que en el control no fue tan evidente.

17. – BIBLIOGRAFÍA

1. Sternber S. M.D. 1997, Histology for pathologists 2da. ed. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 85-105.
2. Junqueira L.C., Carneiro José 2000, Histología básica 5ta. ed Ed. Masson, Barcelona, España, pp. 127-146.
3. Sandoval Cote Rosahyra M. 2005, Osteoinmunología: bases celulares y moleculares del remodelamiento óseo, Pontificia Universidad Javeriana, Santa Fé de Bogotá, Colombia.
4. Fawcett W. Don, M.D., Jensch P. Ronald, Ph D. 1999, Compendio de histología, Ed. MacGraw-Hill Interamericana, Madrid, España, pp. 73-79.
5. Telser G.A., Young J.K., Baldwin M.K. 2007, Elsevier's integrated histology 1ra ed., Ed. Mosby Elsevier, Philadelphia, pp. 125-155.
6. Cotran Ramzi 1999, Patología estructural y funcional 6ta ed. Ed MacGraw-Hill Interamericana, México D.F.
7. Nolla Solé J. M., Acebes Cachafeiro J. C. 1997, Enfermedades óseas, Ed. Elsevier, España, pp. 25-37, 47-51.
8. García Tamayo F. 1997, Fundamentos de inmunobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. pp. 109-112.
9. Henostroza N, Gómez P. 1999, Proteínas morfogénicas, Artículo de Revisión, Facultad de Estomatología, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú.
10. Rojas Dotor M. C. y col. 2002, Alternativas para obtener un injerto óseo, Acta Ortopédica Mexicana; Jul-Agosto. Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI- IMSS.

11. Gartner, Hiatt 2003, Atlas color de histología, 3ra ed., Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
12. Maxie Grant 2007, Jubb, Kennedy, and Palme's, Pathology of domestic animals vol. I, 5ta ed, Ed ELSEVIER, Philadelphia, USA. pp. 1-14
13. Castiñeiras y Col, Bioquímica clínica y patología molecular vol. II, 2da ed., Ed. Reverté, 1999
14. Allison Jane, Stephen Hodges, Richard Eastell, measurement of osteocalcin, University of Sheffield, Ann. Clin. Biochem, United Kingdom, 2000.
15. Eastel R., Baumann M., Hoyle N. 2001, Bone markers: biochemical and clinical perspectives, Ed. Informa Health and Care, Ginebra
16. Kido Teruhiko M. D.; Honda M. Sc., Tsuritani M. Sc. "Serum levels of bone gla-protein in inhabitants exposed to environmental cadmium", Archives Environmental Health, Japan, 1991.
17. García Tovar CG. 2001 Localización celular y subcelular de la distrofina de 71 kDa "founder sequence" (Dp71f) en encéfalo de rata. Tesis de Doctorado en Biología Celular, CINVESTAV-IPN, México D.F.
18. Díez García M.P., Chávez D., Mercado C.R. 2002, Modelo experimental de fracturas y consolidación ósea en ratas, Vol. 16 No. 3 Revista Mexicana Ortopedia y Trauma, Ciudad de México.
19. Palacios B. F. 2005, Aloinjertos óseos conservados en cloruro de benzalconio, Acta Ortopédica Mexicana Vol. 19, No. 3, IMSS Ensenada Baja California
20. Dasso G. M. V., Fernández M. M. Sc., Arias J.L M.V. 1998, Reparación ósea mediante aloimplantes sometidos a diferentes métodos de conservación en conejos, Arch. Med. Vet. 30, No. 2. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

21. Domínguez A. Torres V. C.K., Villegas F. 2007 Descripción histológica de la regeneración ósea en cresta íliaca de conejos implantados con Nukbone a las 4, 8, 12, 16 semanas, Investigación Universitaria Multidisciplinaria Año 6 No. 6, México.
22. Simes D.C., Williamson M.K. 2003, Purification of matrix gla protein from marine teleost fish, *argyrosomus regius*, calcified cartilage and not bone as the primary site of mgp accumulation in fish, Vol. 18, No. 2 Journal of Bone and Mineral Research.
23. Bar I., Zilberman Y. Zeira E. 2003, Molecular imaging of the skeleton: quantitative real-time bioluminescence monitoring gene expression in bone repair and development, Vol. 18, No. 3 Journal of Bone and Mineral Research.