



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.  
FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**TESIS**

**“DESARROLLO DE HUESO DE NOVO GENERADO EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL EN CRANEO DE RATONES ATIMICOS”**

**QUE PRESENTA:**

**ANA LUISA SESMAN BERNAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**FIRMAS**

**ANA LUISA SESMAN BERNAL**

\_\_\_\_\_

**D EN C. CRISTINA VELASQUILLO MARTINEZ**

\_\_\_\_\_



Universidad Nacional Autónoma de México  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,  
Odontológicas y de la Salud.  
Facultad de Medicina

Instituto Nacional de Pediatría  
Proyecto de Investigación

Desarrollo de Hueso de Novo Generado en un Modelo Experimental en Craneo de  
Ratones Atimicos

#### INVESTIGADOR PRINCIPAL

Ana Luisa Sesman Bernal  
Médico Adscrito al Servicio de Cirugía Plástica y Reconstructiva  
Instituto Nacional de Pediatría

#### INVESTIGADORES ASOCIADOS

D. en C. María Cristina Velasquillo Martínez  
Jefe del Servicio de Ingeniería de Tejidos,  
Terapia Celular y Medicina Regenerativa  
Instituto Nacional de Rehabilitación

Dr. Carlos Jiménez Gutierrez  
Responsable de la Unidad de Análisis de la Evidencia. Centro Colaborador  
Cochrane INP. Red Cochrane Mexicana / Iberoamericana



## PARTICIPANTES

D en C. Clemente Ibarra Ponce  
Jefe de Servicio de Oropedia del Deporte y Artroscopia  
Instituto Nacional de Rehabilitación

D en C. Hilda Villegas Castrejón  
Directora de Investigación  
Instituto Nacional de Rehabilitación

Dra. Leticia del Carmen Baena Ocampo  
Médico Adscrito Anatomía Patológica  
Instituto Nacional de Rehabilitación

M en C. Lilia Solís Arrieta  
Adscrita al Departamento de Morfología Celular y Molecular  
Instituto Nacional de Rehabilitación

Dr. Hugo Lecona Butrón  
Jefe de Servicio del Bioterio  
Instituto Nacional de Rehabilitación

Biol. Valentín Martínez López  
Biólogo del Servicio de Ingeniería de Tejidos,  
Terapia Celular y Medicina Regenerativa  
Instituto Nacional de Rehabilitación

M en C. Erika Ruvalcava  
Ayudante de Investigador en C.M. C  
Instituto Nacional de Rehabilitación

Dr. Luis Núñez Ochoa  
Profesor Fac. Medicina Veterinaria  
Universidad Nacional Autónoma De México

Dr. Sergio Sánchez Guerrero  
Jefe de Banco de Sangre  
Instituto Nacional de Cancerología



## INDICE

	Página
1. Resumen estructurado .....	4
2. Pregunta de investigación .....	4
3. Planteamiento del problema .....	6
4. Marco Teórico .....	15
Formacion (regeneracion) y remodelacion de hueso.....	17
Formación de hueso <i>de novo</i> .....	21
Marcadores del metabolismo oseo .....	24
5. Justificación .....	24
6. Factibilidad .....	26
7. Objetivos e hipótesis .....	27
8. Material y Métodos .....	28
Clasificación de la investigación .....	28
Población objetivo y elegible .....	28
Criterios de selección .....	28
Tamaño de la muestra .....	28
11. Descripción de variables .....	29
Definiciones conceptuales y operacionales de las variables	
12. Descripción de procedimientos .....	33
13. Análisis estadístico e interpretación de resultados .....	42
14. Controles de calidad internos y externos .....	43
15. Consideraciones éticas .....	43
16. Resultados.....	46
17. Discusion .....	90
18. Conclusiones.....	93
16. Cronograma .....	93
17. Productos esperados .....	94
18. Bibliografía.....	95
19. Anexos .....	(SECCION ANEXOS)
Anexo 1. Búsqueda de la Literatura .....	1
Anexo 2. Síntesis de estrategia de búsqueda de la literatura.....	32
Anexo 3. Técnicas de Tinciones .....	34
Anexo 4. Inmunohistoquímica .....	35
Anexo 5. Técnicas de microscopia .....	50
Anexo 6. Citometría de Flujo .....	59
Anexo 7. Cuadro de control interno .....	62
Anexo 8. Consentimiento Bajo Información .....	93

## RESUMEN ESTRUCTURADO

**TITULO** Desarrollo de Hueso de Novo Generado en un Modelo Experimental en Craneo de Ratones Atimicos

**ANTECEDENTES.** Existe un continuo interés en el desarrollo de materiales sustitutos de injertos óseos para la reparación de defectos craneales de espesor total, especialmente para corrección de defectos congénitos y postrauma, en los cuales la principal limitante del injerto autólogo radica en la cobertura del laminado. Por lo que desarrollamos una Unidad Osteogénica en donde se verificaron de manera simultánea la osteoconducción, la osteoinducción y la osteogénesis para la reparación biológica de dichos defectos, a través de tinciones específicas de hueso, inmunohistoquímica, así como mediante el uso de microscopia electrónica de barrido.

**MATERIAL Y METODO.** Unidad Osteogénica: Hueso desmineralizado en pasta, médula ósea humana y dermis humana acelular. Aplicamos primero un andamio de dermis humana acelular en el sitio del defecto en contacto con la duramadre, e hicimos una pasta con el hueso desmineralizado y la médula ósea humana.

Se realizó una incisión medio sagital a lo largo de la superficie antero superior del cráneo de ratones atímicos, incidiendo el pericráneo en la línea media, formándose dos colgajos; piel y pericráneo que fueron disecados y elevados bilateralmente. Posteriormente se hizo una craneotomía de aproximadamente 4x4 mm, con bisturí, sin lesionar la duramadre ni el cerebro. Se implantó la unidad osteogénica en este sitio de lesión en el grupo experimental y en el grupo control solo se hizo el defecto de cráneo.

La muestra de trabajo estuvo formada de 3 grupos aleatorios para el grupo experimental y 3 para el grupo control colocando 5 ratones en cada grupo determinando el tamaño de la muestra, por conveniencia. Todos los animales del grupo experimental fueron operados e implantados con la misma unidad osteogénica. El primer grupo fue sacrificado a los 30 días, el segundo a los 2 meses y el tercer grupo a los 3 meses, con la finalidad de analizar las características inmunohistoquímicas, por microscopia de barrido e histológicas del hueso de novo. Para cada muestra se retiró la calota completa de ratón y se sometieron a:

- a) Análisis mediante Inmunohistoquímica se determinó la expresión para fosfatasa alcalina, colágena tipo I, osteocalcina, osteopontina y Runx 2
- b) Análisis histológico de tejido neoformado, resultado del implante de unidad osteogénica, este se llevó a cabo mediante la evaluación de la tinción de Hematoxilina- Eosina, Masson y Von Kossa, para evaluar formación de tejido osteoide y la presencia de depósitos de calcio en el grupo experimental y fibrosis en el grupo control
- c) Microscopia Electrónica de Barrido para determinar la cantidad de depósitos de fosfato, calcio, sodio, magnesio, etc.

## RESULTADOS.

-Obtuvimos positividad mayor para fosfatasa alcalina, colágena I, osteocalcina, osteopontina y Runx2 en el grupo experimental al compararlo con el grupo control en



los estudios de inmunohistoquímica, es evidente la diferencia en cuanto a los marcadores de formación ósea en el grupo en el que se usó la unidad osteogénica -El análisis por tinción histológica con Hematoxilina-Eosina, Masson y Von Kossa para evaluar tejido osteoide y la presencia de depósitos de calcio respectivamente no tuvo un impacto importante en los resultados porque al hacer una regresión logística binaria pudimos observar que hasta en un 99% de los casos principalmente en el análisis por grupo los resultados estaban relacionados con el azar.

-Finalmente los valores más significativos y que dieron más información con respecto a que en el grupo experimental hubo mayor depósito de minerales principalmente calcio, fósforo y magnesio en comparación con el grupo control fue la microscopía de barrido, donde desde el análisis bivariado se veía una franca diferencia entre ambos grupos.

**CONCLUSIONES** De acuerdo a los resultados podemos concluir que cuando logramos unir los tres factores propuestos como osteogénesis (células de médula ósea) osteoiducción (hueso desmineralizado) y osteoconducción (dermis humana acelular) logramos la formación de hueso de características muy similares al normal, hecho que se corrobora al comparar el grupo experimental a los 3 meses de implantada la unidad con el grupo de referencia de la normalidad.

Esto es únicamente un parteaguas a más investigaciones ya que aun quedan muchas preguntas sin responder

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Una unidad osteogénica con propiedades de osteoconducción, osteoinducción y de osteogénesis permiten formar hueso de novo en un defecto de cráneo de tamaño crítico en ratones atímicos?



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### **Magnitud, frecuencia y distribución**

La pérdida de hueso en cráneo, principalmente en niños es una patología que puede ser secundaria a múltiples causas<sup>1</sup>, una de ellas es la craneosinostosis que se presenta en uno de cada 2000 nacidos vivos, en donde los procedimientos reconstructivos incluyendo los avances fronto-orbitarios llegan a tener grandes complicaciones como secuestros óseos (24 a 56%) y espacios muertos intracraeanos. Del mismo modo los traumatismos craneoencefálicos son también una causa de pérdida ósea hasta en un 30% principalmente en niños<sup>2</sup>, estos son secundarios a caídas y accidentes automovilísticos; el 75% de todas las hospitalizaciones por trauma en niños se debe a traumatismo craneoencefálico, cada año en México hay 600,000 consultas por esta causa y una patología asociada en más del 10%<sup>3</sup> al trauma craneoencefálico es la fractura evolutiva de cráneo que frecuentemente no puede ser cubierta por tejido óseo autólogo, generalmente se presenta en niños menores de 3 años lo que hace aún más difícil su cobertura. Así también la craniectomía descompresiva es un procedimiento en el que puede haber pérdida de hueso hasta en un 60% de los casos, el 90% de los pacientes (incluyendo niños) con hipertensión endocraneana refractaria secundaria a un accidente vascular cerebral, traumatismo, tumores o hemorragia subaracnoidea, requieren de craniectomía descompresiva que llega a tener complicaciones hasta en un 94% como herniación del cerebro debida a esa pérdida ósea.<sup>2-3</sup>

### **¿Cuál es el conocimiento actual sobre el problema y sus causas? ¿Hay consenso? ¿Hay discrepancias? ¿Hay evidencias conclusivas?**

La selección del material para sustituir la bóveda craneana es difícil debido a la diversidad de productos existentes; el material debe ser inerte, ligero, fácil de colocar y adaptable al defecto, con lo cual se ofrece mejores resultados estéticos y funcionales. Los injertos óseos son necesarios para proporcionar soporte, rellenar y favorecer la reparación biológica de los defectos esqueléticos. El hueso autólogo es el estándar de oro pero tiene limitaciones como morbilidad del sitio donador, cantidad inadecuada y dificultad para moldear para ciertos defectos. También se puede usar los alo injertos, puede ser hueso esponjoso o cortical o ambos también con sus limitaciones como riesgo de transmisión de enfermedades, inmunogenicidad con la pérdida concomitante de sus propiedades biológicas y mecánicas, etc.<sup>4</sup> Microestructuralmente el hueso está compuesto por células (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos), matriz orgánica y matriz inorgánica (ambos insolubles) y factores solubles (proteínas morfogénicas y factores de crecimiento) dando como consecuencia 3 mecanismos clave para la generación ósea.<sup>4</sup> osteogenesis, osteinducción y osteoconducción

Los injertos óseos tienen una doble función: mecánica y biológica. Dependiendo del resultado clínico que se busque, una de las funciones puede ser más importante que

la otra. En la interfase injerto óseo-huésped existe una compleja relación donde múltiples factores pueden intervenir en la correcta incorporación del injerto; dentro de ellos destacan la zona de implantación, vascularización del injerto, interfase hueso-huésped, inmunogenética entre donante y huésped, técnicas de conservación, factores locales y sistémicos diversos (hormonales, uso de medicamentos, calidad ósea, enfermedades crónicas degenerativas) y las propiedades mecánicas (que dependen del tamaño, la forma y tipo de injerto utilizado).<sup>3</sup> De manera inicial se debe determinar cuál es la función que debe cumplir el injerto a utilizar. Los injertos tienen diferentes propiedades:

- *Osteogénesis*: síntesis de hueso nuevo a partir de células derivadas del injerto o del huésped. Requiere células capaces de generar hueso.<sup>4</sup>
- *Osteoinducción*: proceso por el que las células madre mesenquimatosas son reclutadas en la zona receptora y a su alrededor para diferenciarse en condroblastos y osteoblastos. La diferenciación y el reclutamiento son modulados por factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto, cuya actividad es estimulada al extraer el mineral óseo. Entre los factores de crecimiento se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas 2, 4 y 7, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, interleucinas, factor de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento pseudoinsulínico, factores estimuladores de las colonias de granulocitos y factores estimuladores de las colonias granulocitos-macrófagos. También se liberan factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio y la angiogenina.
- *Osteoconducción*: proceso en el que tiene lugar un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células madre mesenquimatosas, desde la zona receptora del huésped hacia el injerto. Este andamiaje permite la formación de hueso nuevo mediante un patrón previsible, determinado por la biología del injerto y el entorno mecánico de la interfase huésped-injerto.<sup>4</sup>

De manera ideal un injerto óseo debe tener estas tres propiedades, además de ser biocompatible y proporcionar estabilidad biomecánica.

**Soluciones posibles: ¿Cuáles han sido las formas de resolver el problema? ¿Qué se ha propuesto? ¿Qué resultados se han obtenido?**

## **Injertos óseos**

El empleo de injertos óseos como alternativa de reconstrucción de defectos óseos, ya sean congénitos u ocasionados como traumatismos, secuelas oncológicas e infecciosas, tienen como finalidad restablecer la integridad anatómica y funcional de una estructura alterada. Durante décadas, los investigadores se han dado a la tarea de encontrar en los injertos ciertas características que respondan a cada una de las necesidades de reconstrucción; este hecho a llevado a estudiar y comparar los beneficios de algunas estructuras óseas potencialmente donadoras, que incrementen las probabilidades de éxito del tratamiento y disminuyan considerablemente los posibles riesgos y complicaciones durante la toma del injerto<sup>5</sup>

Aunque actualmente los autoinjertos están considerados como la técnica de elección para la reparación de los grandes defectos óseos en la región craneofacial<sup>1-5</sup>, no están exentos de importantes limitaciones<sup>6</sup>: limitada cantidad disponible, necesidad de una segunda herida quirúrgica, incremento del tiempo quirúrgico, aumento de la morbilidad del proceso, posibilidad de aparición de complicaciones neuroquirúrgicas y defectos de contorno en la zona donante.

Los injertos óseos se clasifican conforme a su origen:

- *Autoinjerto óseo*: trasplante de hueso llevado de una zona anatómica a otra del mismo individuo.
- *Alloinjerto óseo*: hueso transferido entre dos individuos genéticamente diferentes pero de la misma especie.
- *Xenoinjerto óseo*: tejido transferido entre dos individuos de diferentes especies.<sup>5</sup>

El proceso de incorporación de un injerto óseo es un mecanismo complejo que varía dependiendo del sitio de colocación y el tipo de injerto utilizado. Se divide en tres fases:

- *Fase temprana* (1 a 3 semanas): osificación membranosa en la zona adyacente a la cortical ósea y la conversión del hematoma posoperatorio en estroma fibroblástico alrededor del injerto.
- *Fase intermedia* (4 a 5 semanas): incorporación y remodelación del injerto con una zona central cartilaginosa y osificación endocondral alrededor de la misma.
- *Fase tardía* (6 a 10 semanas): mayor cantidad de médula ósea en formación de hueso cortical alrededor de la zona central y remodelación ósea.<sup>6</sup>

### **Injerto óseo autólogo**

El injerto óseo autólogo desde hace más de 100 años representa el estándar de oro de los injertos óseos.<sup>4,5</sup> Puede ser de hueso esponjoso, corticales no vascularizados o corticales vascularizados, y los diferentes tipos de injertos pueden tener distintas propiedades.<sup>5</sup> El injerto tiene propiedades osteogénicas (células osteoblásticas derivadas de la médula ósea y células preosteoblásticas precursoras), osteoconducativas (proteínas no colágenas de la matriz ósea, incluyendo factores de crecimiento) y osteoconducativas (mineral óseo y colágeno). Hay histocompatibilidad total y ningún riesgo de transmisión de enfermedades.

El injerto óseo autólogo ofrece, además, soporte estructural a implantes colocados y termina convirtiéndose en estructuras mecánicas eficientes capaces de soportar cargas debido a la sustitución progresiva por hueso.<sup>6</sup>

Sin embargo, existen problemas con el uso de autoinjertos óseos, como la insuficiente cantidad de injerto, riesgo de morbilidad posquirúrgica significativa en la zona donadora de hasta 30 %: infección, dolor, hemorragia, debilidad muscular y lesión neurológica. También implica mayor tiempo quirúrgico, pérdida sanguínea y un costo adicional.<sup>5</sup> En cirugía reconstructiva se asocia a tasas de falta de integración y reabsorción ósea de 50 % sin instrumentación y de 10 a 15% con instrumentación.<sup>7</sup>

### **Alloinjerto óseo**

En Estados Unidos se utilizan anualmente más de 200 mil aloinjertos óseos para procedimientos reconstructivos.<sup>3</sup> En México se cuenta desde septiembre de 2000

con el Banco de Huesos y Tejidos del Servicio de Traumatología y Ortopedia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, Universidad Autónoma de Nuevo León, el cual ha proporcionado 4,175 tejidos que han sido utilizados en 2,451 procedimientos quirúrgicos desde su creación hasta el año 2006; de éstos, 67 % ha sido requerido por cirujanos reconstructivos, en su mayoría en forma de hueso.<sup>8</sup> Los aloinjertos se emplean fundamentalmente para soportar cargas mecánicas y resistir fallos en las zonas donde hace falta soporte estructural. Cuentan con propiedades osteoconductoras. Tienen las ventajas de estar disponibles en cantidades importantes y en diferentes formas y tamaños, no se sacrifican estructuras del huésped y no hay morbilidad del sitio donador.<sup>5</sup> La mayor preocupación cuando se utilizan aloinjertos es la posibilidad de transmitir algunos virus como el VIH o el de hepatitis C o B.

Además, los procesos que se utilizan para eliminar los componentes antigénicos (congelamiento o irradiación) del injerto para evitar la inducción de una respuesta inmune del huésped y asegurar la esterilidad, tienen un efecto dosis-dependiente sobre las propiedades biológicas y biomecánicas de los injertos.<sup>1,3-5</sup>

Dadas las complicaciones de los autoinjertos y aloinjertos óseos, actualmente existen estrategias para tratar de aumentar las tasas de consolidación ósea en presencia de injerto óseo o para tratar de reemplazar la necesidad de su utilización o la cantidad del mismo. A los materiales con potencial generador de hueso se les clasifica como:

- *Extensor óseo*: material que permite la utilización de una menor cantidad de injerto óseo con el mismo resultado final o de la misma cantidad de injerto pero cubriendo mayor área de superficie para obtener la misma tasa de fusión final.<sup>3</sup>
- *Potenciador óseo*: sistema que en conjunto con el injerto óseo aumenta las tasas de fusión utilizando la misma o una menor cantidad de injerto.<sup>3</sup>
- *Sustituto óseo*: material que se puede emplear en lugar del injerto y que obtiene tasas de fusión iguales o mejores que el injerto óseo autólogo.<sup>3</sup>

## Cerámicas

Los materiales osteoconductoros deben tener una porosidad que permita la vascularización y provea un área de adherencia a las células osteogénicas. El tamaño del poro óptimo para que esto ocurra es entre 100  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$  con un volumen total de poros de 75 a 80 %; <sup>7-9</sup> además, los compuestos deben ser no inmunogénicos y el hueso debe tener una capacidad alta de adherencia a los mismos. La hidroxiapatita y los compuestos de fosfato cálcico son los materiales más utilizados como materiales osteoconductoros ya que cumplen con estas características, sin embargo, tienen propiedades biomecánicas pobres con baja capacidad para soportar las sollicitaciones en flexión y compresión, produciendo con facilidad fracturas del material, lo que los imposibilita para realizar reconstrucciones que requieran estas propiedades. <sup>10,11</sup> Cuando se utilizan estos compuestos, un factor importante a considerar es la tasa de biorreabsorción de las mismas, que generalmente es prolongada y afecta la remodelación ósea en el sitio de colocación; la tasa de biorreabsorción está determinada por la densidad del compuesto y su

capacidad para ser revascularizado.<sup>12</sup> El fosfato tricálcico es una cerámica porosa que se convierte de manera parcial en hidroxiapatita una vez implantada en el cuerpo. El fosfato tricálcico es más poroso y se reabsorbe más rápido que la hidroxiapatita, lo que le da ventaja para favorecer la remodelación ósea, sin embargo, lo hace biomecánicamente más débil a las fuerzas de compresión.<sup>10</sup> La hidroxiapatita coralina es procesada por un intercambiador electrotermal que convierte el fosfato cálcico de coral a hidroxiapatita cristalina, cuyos poros tienen un diámetro entre 200 y 500  $\mu\text{m}$  y su estructura es muy similar a la del hueso esponjoso.<sup>11</sup> Bucholz reportó que el injerto autólogo esponjoso y el cristal de hidroxiapatita tienen un desempeño clínico similar cuando son utilizados para rellenar defectos óseos metafisarios que provocan hundimiento de superficies articulares en las fracturas de tibia.

Una contraindicación para utilizar este material en metafisis es la existencia de un defecto articular que permita la migración del material hacia la articulación.<sup>12</sup>

Cho y colaboradores reportaron el uso de calcio bifásico y lo comparó con injerto autólogo de cresta iliaca en pacientes con pérdida de hueso craneal en los que se realizó reconstrucción; indicó tasas de unión de 100 % más rápidas en el grupo con injerto autólogo a los cinco meses, contra 100 % a los seis meses en el grupo con fosfato cálcico, sin embargo, los días de hospitalización, tiempo quirúrgico, sangrado fueron menores en este grupo, además no hubo morbilidad de la toma del injerto, que en el grupo de injerto autólogo fue de 6 %. Concluyeron que el uso de fosfato cálcico es una buena opción como alternativa al injerto autólogo en estos pacientes.<sup>13</sup>

Existe un considerable interés en el desarrollo de las alternativas al autoinjerto de hueso fresco. En años recientes, diversos laboratorios han reportado el aislamiento de factores de la matriz de hueso desmineralizado que induce la formación ósea, tal como proteína morfogenética ósea (Urist et. al., 1984), osteogenina (Luyten et. al., 1989), y factor osteoinductivo (Bentz et. al., 1989). Además, genes de moléculas osteoinductoras, BMP-1, BMP-2A, BMP-2B, y BMP-3, han sido clonados (Wozney et. al., 1988). Posteriormente, Yasui et. al. (1977) y Sato et. al. (1998) reportaron un tercer mecanismo de osificación, "formación de hueso transcondroide".<sup>14</sup> El hueso condroide, un tejido intermedio entre hueso y cartílago, fue formado directamente por condrocitos como células, con la transición de tejido fibroso a hueso ocurriendo gradualmente y consecutivamente sin invasión capilar.

El interés por obtener una óptima reconstrucción tanto funcional como estética del cráneo ha conducido a la utilización de diversos materiales aloplásticos que incluyen el Silicón, la Hidroxiapatita, el Titanio, y el Metilmetacrilato.<sup>15</sup>

En la actualidad se han destacado 3 grupos de principales investigadores:

a) Eppley<sup>10,13</sup> (Eppley, Morales, Wood, Pensler, Goldstein, Havlik, Habal, Losken, Williams, Burstein, Rozzelle, Sadove) Investigadores originarios de Estados Unidos que han dirigido sus investigaciones principalmente al comportamiento de las placas de materiales absorbibles en cirugía pediátrica craneofacial.

b) Gosain<sup>14</sup>, (Gosain, Santoro, Song, Capel) han puesto sus esfuerzos para explicar el papel de los biomateriales en reconstrucción de cráneo, pero la dirección de sus últimos estudios es explicar cual es el papel tanto de la duramadre como del periostio y tejido circundante en la Osteogénesis.

c) Spector<sup>15</sup> (Spector, Greenwald, Warren, Bouletreau, Crisera) buscan explicar la Biología de la Duramadre sobre el factor de crecimiento de Fibroblastos, así como el cultivo de osteoblastos y su diferenciación que se encuentran en un área de investigación sumamente importante para este tema la Ingeniería Tisular

**Preguntas sin respuesta: ¿Qué sigue siendo una interrogante? ¿Qué no se ha logrado conocer, determinar, verificar, probar?**

### **Matriz ósea desmineralizada (MOD)**

En 1965, Urist describió la preparación de la MOD y su uso como agente osteoinductivo, demostrando que la implantación extraesquelética de la MOD en animales resulta en osificación heterotópica.<sup>14</sup> Una solución ácida moderada remueve del hueso sus componentes minerales y se obtiene una mezcla de colágena tipo I y proteínas no colágenas que incluyen factores de crecimiento, dentro de los cuales se encuentran las proteínas morfogenéticas del hueso. La MOD no proporciona ninguna integridad estructural, por lo que se debe utilizar en un ambiente de estabilidad como factor osteoinductivo, sin embargo, tiene también potencial osteoconductor debido a su contenido de colágena.<sup>15</sup> A pesar de su elevado empleo, en la actualidad existen pocos estudios que validen a la MOD como una alternativa a los injertos óseos, pero existen estudios que la validan como un potenciador de la fusión cuando se acompaña del injerto óseo autólogo.<sup>16-18</sup> Sassard y colaboradores informan un estudio retrospectivo donde comparan al injerto autólogo de hueso esponjoso con MOD (Grafton Osteotech Inc.®) contra el injerto autólogo solo. Reportaron tasas bajas de fusión en ambos grupos, 60 y 56 % respectivamente, sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos.<sup>18</sup> Haciendo una evaluación de los compuestos de la MOD, la actual actitud clínica debe ser utilizarla únicamente como potenciadora y extensora de injerto óseo autólogo y no como sustituto del mismo.<sup>18-20</sup>

### **Proteínas morfogenéticas del hueso**

Urist informó el descubrimiento de glicoproteínas solubles de bajo peso molecular que nombró proteínas morfogenéticas del hueso, las cuales encontró dentro de la porción osteoinductiva de la MOD.<sup>14</sup> Wozney clonó estas proteínas y las identificó como parte de las superfamilia de proteínas del factor de crecimiento transformador de proteínas beta, logrando clonar nueve de estas moléculas, designándolas "proteínas morfogenéticas del hueso".<sup>20</sup> De esta manera, las proteínas morfogenéticas del hueso pueden ser sintetizadas por técnicas moleculares, por lo que potencialmente pudieran conseguirse cantidades ilimitadas, motivando la existencia de estudios en los que se trata de comprobar su potencial osteoinductor.<sup>21</sup> Las proteínas morfogenéticas del hueso más estudiadas son las proteínas morfogenéticas recombinantes 2 y 7 (PMHrh-2 y PMHrh-7). En 11 de 14 pacientes,

Boden utilizó esponjas de colágena con PMHrh-2 en cajas de titanio para reconstrucción mandibular y en los tres pacientes restantes empleó injerto autólogo de hueso esponjoso. En el grupo con PMHrh-2, 10 de los 11 pacientes (91%) presentaron integración a los tres meses y a los seis meses todos los pacientes presentaban integración.

En el grupo control, dos de los pacientes tuvieron integración al año y un paciente presentó no unión.<sup>22</sup> Vaccaro y colaboradores publicaron su serie en la que evaluaron la seguridad y eficacia de la PMHr-7 como sustituto de hueso esponjoso autólogo en reconstrucción craneofacial. Se trató de un estudio prospectivo donde participaron 24 pacientes: a 12 se les colocó PMHr-7 y a los otros 12, injerto autólogo de hueso esponjoso de cresta iliaca. Al año de seguimiento, 86 % de los pacientes a quienes se les había colocado PMHr-7 mostró mejoría clínica, comparado con 73 % de los pacientes del grupo de injerto autólogo. En términos de tasas de integración, 74 % de los pacientes con PMHr-7 tuvo criterios de integración exitosa en comparación con 60 % del grupo con injerto autólogo.<sup>23</sup> Widemann y colaboradores<sup>24</sup> probaron la posibilidad de recubrir los materiales de osteosíntesis con factores osteoinductivos, factores de crecimiento y proteínas morfogenéticas del hueso; demostraron la eficacia de esta técnica en un modelo experimental, introduciendo un nuevo concepto que de desarrollarse servirá para que se cuente con materiales de osteosíntesis bioactivos.

Actualmente el uso de las proteínas morfogenéticas del hueso tiene un nivel de evidencia I, sin embargo, existen muchas variables que influyen en el resultado final. El costobeneficio de estos productos no está bien establecido y están en estudio medios de transporte como polímeros biodegradables que permitan el transporte al lugar donde son requeridos.<sup>25-29</sup>

### **Médula ósea no fraccionada y células madre mesenquimatosas**

La médula ósea autóloga representa una fuente de células madre osteoprogenitoras y factores de crecimiento que funcionan como reforzadores de la formación ósea. Estas propiedades están bien documentadas.<sup>29-31</sup> La médula ósea se utiliza en múltiples procedimientos reconstructivos; la toma de la misma comparada con la de injerto autólogo es mucho menos agresiva, por lo que la morbilidad de la toma del injerto es menor, puede ser aspirada de la cresta iliaca posterosuperior en volúmenes de 100 a 150 ml y se puede inyectar a nivel de una fractura o sitio de no unión, estimulando la curación ya que contiene células madre mesenquimatosas capaces de diferenciarse en diferentes tipos de tejido mesodérmico además de hueso, incluyendo el cartílago, músculo y tejido conectivo, y su diferenciación hacia una línea tisular en particular depende de señales inductivas específicas proveídas por citocinas y factores de crecimiento locales. La implantación de células madre mesenquimatosas funciona para reforzar la producción de hueso, aumentando el número de células osteogénicas capaces de participar en este proceso de regeneración.<sup>32-35</sup> La MOD es un excelente transportador dado que cuenta con propiedades osteoconductoras y osteoinductivas. Connolly y colaboradores usaron médula ósea autóloga combinada con 10 mg de MOD, lo que formó un material de consistencia similar a la arena, que rellena defectos óseos de manera adecuada.

Este compuesto se puede inyectar de manera percutánea.<sup>31</sup> La médula ósea y las células madre mesenquimatosas no ofrecen ningún soporte estructural y cuando se colocan solas, los elementos osteogénicos tienden a esparcirse lejos del área donde son necesarias. Por esta razón es necesario combinarlas con el uso de barreras o membranas físicas para evitar que las células del tejido adyacente y del tejido conjuntivo invadan las zonas que van a ser regeneradas.<sup>36</sup> De ahí surge el término de **Regeneración Ósea Guiada (ROG)** es una técnica de estimulación para la formación de hueso nuevo en áreas donde existen deficiencias, de esta forma se favorece que las células osteoprogenitoras puedan proliferar para formar hueso nuevo. Se puede usar una membrana como la dermis humana acelular para proporcionar protección adicional a la herida, disminuyendo el choque de las fuerzas que inciden sobre ella y garantizando la diferenciación de las células mesenquimatosas hacia osteoblastos, en lugar de hacia fibroblastos.

### **Plasma rico en plaquetas**

Las plaquetas liberan diferentes factores de crecimiento que funcionan de manera sinérgica para aumentar la formación de tejido óseo promoviendo la proliferación de células madre mesenquimatosas. Estas moléculas incluyen el factor  $\beta$  de crecimiento plaquetario y factor de crecimiento derivado de las plaquetas. La estrategia consiste en obtener una muestra de sangre del paciente y se concentra en una matriz de fibrinógeno; la preparación se combina con trombina formando un coágulo de fibrina que se puede administrar junto con un transportador osteoconductor formando un injerto óseo combinado. La administración de plasma rico en plaquetas provoca migración de células madre mesenquimatosas al sitio de la lesión, y sus factores de crecimiento promueven la mitosis y activación osteoprogenitora de estas células.<sup>37</sup> En el año 2003, Schlegel y colaboradores publicaron los resultados del empleo de hueso autólogo esponjoso en defectos creados en la cabeza de cerdos, contra hueso autólogo combinado con concentrado rico en plaquetas. En estudios microrradiográficos y de microscopía de luz encontraron que el hueso autólogo provee buenos resultados para rellenar los defectos óseos y cuando se utiliza en combinación con concentrado plaquetario produce resultados similares que el hueso autólogo solo y no significativamente mejores.<sup>38</sup> Arpornmaeklong y colaboradores publicaron la capacidad del plasma rico en plaquetas para provocar la diferenciación de las células madre mesenquimatosas en osteoblastos *in vivo* y lo compararon con la PMHr-2; encontraron que el plasma rico en plaquetas disminuye la actividad de la fosfatasa alcalina y el depósito de calcio, por lo que sugieren que el plasma rico en plaquetas inhibe la diferenciación osteoblástica de las células madre mesenquimatosas.<sup>39</sup>

### **Ingeniería de tejidos óseos**

En la actualidad la comunidad científica ha desarrollado la utilización de los principios básicos de la biología, química, matemáticas, física e ingeniería, para diseñar materiales y compuestos materiales con células para mejorar o asistir la reconstrucción quirúrgica de los tejidos dañados; las características de los diseños



intentan replicar los procesos biológicos básicos de los diferentes tejidos.<sup>40-42</sup> Estos conceptos se conocen como biomimética y la aplicación de los mismos para la restauración, reparación, reemplazo, montaje o regeneración de la función se conoce como *ingeniería de tejidos*.<sup>42</sup> El hueso formado por ingeniería de tejidos debe contener una matriz extracelular biomimética, células capaces de diferenciarse en osteoblastos y factores de crecimiento que envíen señales que promuevan el reclutamiento celular, la mitogénesis, la diferenciación y la renovación celular. Las matrices que funcionan como andamios para el crecimiento celular deben ser absorbibles y favorecer el anclaje y desarrollo de las células a los mismos, por lo general son polímeros sintéticos que cumplen con estas características y que, además, son fáciles de producir; la cantidad puede ser ilimitada y tiene potencial de degradación que les permite ser sustituidos por la regeneración tisular. En la actualidad no se cuenta todavía con un material sintético que cumpla con todas estas características, se encuentran en desarrollo los estudios que permitirán que estas tecnologías sean aplicables clínicamente; cuando esto suceda, su uso deberá estar basado en estudios que demuestren la seguridad, efectividad y costo-beneficio.<sup>43, 44</sup>

## **Panorama general**

Dada la demanda cada vez mayor de injertos óseos, han surgido alternativas al injerto óseo autólogo. Si bien los más utilizados son los aloinjertos y xenoinjertos, se encuentran en desarrollo alternativas sintéticas conocidas como sustitutos óseos, de manera ideal éstos deben ser biocompatibles, biodegradables, osteoconductivos, osteoinductivos, con una estructura similar al hueso, de fácil uso y bajo costo. Estos productos varían en su composición, mecanismo de acción y efectividad, su uso se debe basar en determinar la función que queremos que realicen, valorar el ambiente en el que van a ser colocados y emplearlos únicamente si cuentan con estudios que validen su seguridad. Es razonable pensar que una combinación de estas sustancias dará mejores resultados que el injerto autólogo de hueso, por lo que es de esperar que en los próximos años sea definido un nuevo estándar de oro, y estamos en la búsqueda del mismo.

## **Hay una gran cantidad de preguntas sin respuesta**

Luego de realizar una revisión extensa de la literatura, (ANEXOS 1 Y 2 ) podemos concluir que aun no existe un material en el que se conjunten las propiedades de osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis que puedan influir en la actividad biológica de los osteoblastos para formar hueso prácticamente normal que tenga la capacidad de crecer junto con el individuo que es lo que haría la diferencia entre los materiales que se están utilizando actualmente para la cobertura de defectos óseos en cráneo, pero que su principal limitante es precisamente la incapacidad de crecer o incluso su retraso en el crecimiento de tejido adyacente con una secundaria deformidad, se ha mencionado que las citocinas derivadas de la duramadre pueden ser la explicación de porque los animales inmaduros y los infantes (en los primeros 24 meses de nacidos) con duramadre intacta pueden reosificar grandes defectos de calota pero para tener

éxito en la cobertura de un defecto óseo craneal con capacidad de crecimiento hace falta un estudio que conjunte las 3 características inigualables hasta ahora del hueso: Osteoinducción, osteoconducción y Osteogénesis así como también investigaciones a largo plazo de fuerza biomecánica e ingeniería tisular, de lo cual se desprende la pregunta de investigación que planteamos

## MARCO TEÓRICO

La reconstrucción de los huesos del cráneo es un procedimiento complejo y representa un reto para el grupo médico tratante; generalmente se realiza en pacientes con pérdida de la bóveda craneana secundaria a diferentes procesos como craneosinostosis, traumatismo craneoencefálico, craniectomía descompresiva, etc. En ocasiones puede haber complicaciones como infecciones que implica mayor posibilidad de fracaso o rechazo de los materiales utilizados para la reparación del defecto, como por ejemplo el injerto óseo autólogo. En los últimos 50 años con el desarrollo de la cirugía craneofacial se han utilizado diferentes técnicas quirúrgicas para el tratamiento de deformidades como la craneosinostosis,<sup>1-15</sup> pioneros como el Dr. Paul Tessier<sup>7-12</sup> en Francia y el Dr. Ortiz Monasterio<sup>13-15</sup> en México han hecho importantes contribuciones para la corrección de estas malformaciones, con los procedimientos denominados avances fronto-orbitarios en monobloc con resultados estéticos y funcionales subóptimos hasta en un 30%. Se han reportado en diferentes series clínicas complicaciones que van desde leves a graves y de estas últimas destacan significativamente, los espacios muertos intracraneos y los secuestros óseos hasta en un 40%<sup>16,17</sup> que dan como consecuencia pérdida de tejido óseo.

En nuestro país de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI)<sup>18</sup> en el año 2005 en la población infantil los accidentes fueron la principal causa de muerte en edades de 1-15 años.<sup>18</sup> Siendo los traumatismos craneoencefálicos (TCE) responsables del 50% de estas muertes<sup>18</sup> De acuerdo a lo reportado actualmente<sup>19-20</sup> 7 de cada 10 hospitalizaciones por trauma en niños se deben a un traumatismo craneoencefálico. Cada año 300 de cada 100.000 niños sufren un TCE y alrededor de 250.000 casos son hospitalizados.<sup>21</sup> Una patología asociada al traumatismo craneoencefálico (en una de cada 10 fracturas) es la fractura evolutiva de cráneo y puede suceder en la infancia, consiste en una fractura con un desgarramiento dural subyacente que se ensancha progresivamente hasta provocar un defecto craneal, que frecuentemente no puede ser cubierto con injerto óseo autólogo o algún otro material debido a su magnitud; su fisiopatología así como su aspecto de manejo son aun controvertidos, principalmente porque se presenta en niños menores de 3 años<sup>22</sup>, lo cual dificulta más su manejo.

Otro procedimiento en el que puede haber pérdida de hueso es la craniectomía descompresiva<sup>23</sup> que es la resección de parte de la bóveda craneana con el objeto de dar espacio al cerebro y aliviar la hipertensión endocraneana producida por accidente vascular cerebral isquémico, trauma, tumores, hemorragia subaracnoidea, etc<sup>24</sup>. Algunos pacientes son sometidos a craniectomía con el objeto de drenar hematomas y en algunos de ellos el cirujano puede optar por no reponer la placa ósea para contribuir a aliviar la hipertensión endocraneana. También se llega a considerar la craniectomía descompresiva en la tumefacción cerebral difusa traumática, que se presenta frecuentemente en niños. Técnicamente Existen diferentes modalidades de craniectomía descompresiva. Todas tienen en común la

resección de grandes porciones de hueso. Así, existe la craniectomía frontoparietotemporal, la hemicraniectomía (resección de gran parte de la mitad de la bóveda craneana, incluyendo huesos frontal, temporal, parietal y parte del occipital), craniectomía bifrontal y bifrontoparietal<sup>25</sup>. La durotomía se puede realizar de diversas maneras pero el objetivo principal es realizar durotomía amplia para permitir al cerebro un desplazamiento mayor.<sup>26</sup>

Todas estas causas de pérdida ósea principalmente en niños son hoy en día un reto para dar cubrimiento a la bóveda craneana desde el punto de vista quirúrgico y funcional, la problemática para dar cobertura a estos defectos es debido frecuentemente a su gran tamaño y falta de capacidad de crecimiento que requiere el desarrollo del cerebro de un niño, estos defectos craneales son lo que se ha denominado en la literatura “defectos de tamaño crítico” que pueden ser definidos como Defectos óseos creados que no regeneren espontáneamente a lo largo de la vida del humano o animal de experimentación. Tales defectos se conocen como defectos de tamaño crítico y fueron inicialmente descritos por Schmitz y Hollinger.<sup>27</sup>,<sup>28</sup> determinando la pérdida del 10% de la superficie de tejido óseo sano de la estructura a estudiar (cráneo, hueso largo, mandíbula, etc.)<sup>29</sup> Por tanto cualquier defecto que tenga capacidad de regeneración espontánea se llamará de tamaño no crítico.

### **Formacion (regeneracion) y remodelacion de hueso**

Los injertos óseos son necesarios para proporcionar soporte, rellenar y favorecer la reparación biológica de los defectos esqueléticos. El hueso autólogo es el estándar de oro pero tiene limitaciones como morbilidad del sitio donador, cantidad inadecuada y dificultad para moldear para ciertos defectos. También se puede usar los aloinjertos, puede ser hueso esponjoso o cortical o ambos, también con sus limitaciones como riesgo de transmisión de enfermedades, inmunogenicidad con la pérdida concomitante de sus propiedades biológicas y mecánicas, etc.

Microestructuralmente el hueso está compuesto por células (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos), matriz orgánica y matriz inorgánica (ambos insolubles) y factores solubles (proteínas morfogénicas y factores de crecimiento) hay 3 mecanismos clave para la generación ósea.<sup>30</sup>

1. Osteogénesis
2. Osteoinducción
3. Osteoconducción

a) OSTEOGENESIS  
Proceso de formación y desarrollo de hueso nuevo<sup>31</sup>.

Estudios recientes sugieren que las células procedentes de la médula ósea, puede llegar a ser implantada a los tejidos no hematopoyéticos, donde pueden adquirir características de las células del tejido donde se implanten<sup>32</sup> y se ha señalado que una lesión en un tejido específico puede originar cambios en el micro ambiente de un órgano determinado y desempeñar una importante función en la atracción de las células madre implantadas. Durante años se consideró a la célula madre hematopoyética como la única célula en la médula ósea con capacidad generativa y se pensaba que solo era multipotencial. Sin embargo estudios recientes han demostrado que la composición de la médula ósea es más compleja pues en ella se han identificado un grupo heterogéneo de células madre adultas<sup>33</sup>

- Hematopoyéticas.
- Mesenquimatosas.
- Población lateral.
- Células progenitoras adultas multipotentes.<sup>34</sup>

Las Hematopoyéticas se ha planteado que tienen una intervención en el desarrollo hematopoyético y vascular tan importante para evitar la resorción ósea y permitir la formación de tejido óseo con liberación de factores de crecimiento del endotelio vascular y han mostrado potencial para la regeneración de crecimiento de diversos tejidos.<sup>35</sup>

Las células Mesenquimatosas son células madre no Hematopoyéticas que se aíslan de la médula ósea y tienen aspecto de fibroblastos, se ha demostrado que son necesarios para el mantenimiento y expansión de las células madre hematopoyéticas derivados de la médula ósea que dan apoyo a la hematopoyesis y estas son las células que pueden diferenciarse en osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, pero requieren de la presencia de la estimulación angiogénica de las hematopoyéticas.<sup>36</sup>

Las células de población lateral son células madre aun más primitivas y estas pueden dar lugar a diferentes tipos de células especializadas e integrarse en tejidos in vivo que incluyen tejidos no hematopoyéticos, estas células son las que pueden dar origen en un momento dado tanto a las células hematopoyéticas como a las mesenquimatosas.<sup>37</sup>

Las células multipotentes tienen propiedades de diferenciación similares a las células embrionarias y estas a su vez se pueden obtener mediante cultivos a largo plazo de células estromales y de la médula ósea mantenidas en condiciones específicas pero requieren estímulo angiogénico de las hematopoyéticas.<sup>38</sup>

En los últimos años se ha acumulado una serie de conocimientos que convalidan el dogma de que un solo tipo de célula madre adulta puede diferenciarse en células de un tejido específico por lo que ha surgido el concepto de plasticidad de las células madre adultas, con el planteamiento de 4 mecanismos.<sup>39</sup>

1. Heterogeneidad de las células madre presentes en una población celular de la médula ósea.
2. Fusión de las células madre trasplantadas con las células específicas residentes de un órgano.
3. Consumación de un proceso de desdiferenciación y rediferenciación celular.
4. Persistencia de células madre adultas con capacidad multi o pluripotencial.<sup>40</sup>

## b) OSTEINDUCCION.

Es el proceso de estimulación de la Osteogénesis.<sup>41</sup> Los materiales osteoinductivos se pueden utilizar para mejorar la generación ósea y el hueso puede crecer o extenderse por una zona donde normalmente no se encuentra<sup>42</sup>. La regeneración ósea es estimulada por la liberación de proteínas inductivas<sup>43</sup> que facilitan la diferenciación celular, ejemplos de estos son los factores de crecimiento y las proteínas morfogénicas las cuales se encuentran en gran cantidad en el hueso desmineralizado y son eje importante en la diferenciación de las células de la médula ósea hacia osteocitos.

Los agentes osteoinductivos son generalmente proteínas que inducen la diferenciación o proliferación de células madre<sup>44</sup> Urist<sup>45</sup> en 1965 estableció la capacidad osteoinductiva de la matriz ósea desmineralizada, esta se produce

mediante la extracción ácida de hueso cortical humano y los componentes que se obtienen de dicho tratamiento incluyen proteínas no colágenas<sup>46-48</sup>, factores de crecimiento osteoinductivo (principalmente proteínas morfogenéticas<sup>49-53</sup>) y colágena tipo I. La médula ósea desmineralizada que se obtiene a partir de hueso alogénico<sup>54</sup> tiene un índice osteoinductivo variable. Esta forma de proteína ósea morfogenética es no inmunogénica y no especie específica.<sup>55</sup>

El prolapso de tejidos blandos adyacentes y una migración rápida de fibroblastos hacia el defecto óseo han sido descritos como obstáculos para la regeneración ósea por lo que surgió el concepto de “Regeneración ósea dirigida”<sup>56</sup> que radica en la utilización de diversas membranas diseñadas para funcionar como barrera con la finalidad de prevenir que los tejidos blandos adyacentes y los fibroblastos entren en el defecto y facilitar la proliferación de células productoras de hueso.

Lorenz<sup>57</sup> en 2003 publicó su experiencia, con la utilización exitosa de la dermis humana acelular en la reconstrucción de defectos de la base de cráneo. Este material proporciona un andamio para el crecimiento de fibroblastos y neovascularización, así como membrana de barrera para la “regeneración dirigida” tal como lo reportó Eppley<sup>58</sup> en el 2001 y una gran fuente de colágena tipo I<sup>59</sup>

La dermis humana acelular es uno de los materiales osteoinductivos que proporciona un andamio en la formación de algún tipo de tejido.<sup>60</sup> Es dermis humana acelular que evita el riesgo de rechazo o inflamación porque retira las células a través de un proceso muy delicado pero que mantiene los elementos cruciales de la estructura del tejido (principalmente colágena tipo I) elastina y proteoglicanos<sup>61</sup>, esta matriz extracelular contiene los canales de vasos sanguíneos que favorece y conduce la revascularización; la colágena los proteoglicanos y la elastina proveen estructura e información para la repoblación celular y más importantemente estimula los proteoglicanos y proteínas directas del paciente para iniciar la revascularización y la repoblación celular, por lo tanto actúa favoreciendo la neoformación vascular y como parte de la “Regeneración Ósea Dirigida”.<sup>62</sup>

Entre en 7<sup>o</sup> y 10<sup>o</sup> día los fibroblastos del huésped y los vasos sanguíneos responden al trasplante de la dermis acelular iniciando la revascularización y el proceso de remodelación normal de tejido.

Hacia el día 45 y 90 el reemplazo celular y la revascularización continúan hacia tejido conectivo normal con una gran cantidad de depósito de colágena. A los 6 meses la dermis acelular ha sido totalmente remodelada con tejido normal sin fibrosis.<sup>63</sup>

### c) OSTEOCONDUCCION.

Proceso tridimensional que se verifica cuando se implantan ciertos materiales porosos. La porosidad no es suficiente para favorecer el crecimiento del hueso. El prerequisite esencial es que exista porosidad con interconectividad.<sup>64-67</sup> Basado en las conexiones tridimensionales existentes entre las lagunas óseas que proporcionan comunicación intercelular. El tamaño de los poros para que se favorezca el crecimiento óseo es de 100 a 500 micras y las interconexiones mayores de 100 micras.<sup>68-69</sup> La Osteoconducción proporciona la estructura o matriz física apropiada para la deposición de hueso nuevo, el mejor ejemplo de esta es el hueso desmineralizado, pero también puede haber otros materiales como hidroxapatita, fosfato de calcio, fibrina liofilizada etc. El ejemplo más fehaciente es la colágena tipo I<sup>70</sup>

El hueso desmineralizado<sup>71</sup> es un producto que ofrece un gran contenido óseo, óptima osteoinductividad y osteoconductividad, características excepcionales. Contiene un nivel residual de calcio controlado, es totalmente acelular y facilita el crecimiento y formación de hueso, es totalmente compatible con células sanguíneas o de médula ósea con pH 7.2 idéntico a la sangre humana. Tiene un alto peso molecular, mantiene su integridad física y resiste movimientos a la irrigación<sup>72</sup>.

La duramadre es la cobertura de las meninges y es esencial para la morfogénesis de la calota, en la fusión postnatal de las suturas y la reparación ósea de los defectos de cráneo<sup>73-74</sup>. Numerosos estudios han mencionado el papel fundamental de la duramadre, hay poca información acerca de los mecanismos de regulación de la biología celular de la duramadre durante la osificación de la calota. Por décadas los cirujanos han explorado la habilidad de los infantes de reosificar grandes defectos en cráneo, se ha demostrado el rol de la duramadre en comunicación con los osteoblastos durante el proceso de reosificación craneal, existen signos parácrinos de la duramadre inmadura que influyen en la actividad biológica de los osteoblastos. La esqueletogénesis embrionaria requiere íntima interacción entre la superficie epitelial y mesodermo. Observaciones clínicas durante la cirugía de craneosinostosis sugieren que la dura tiene una influencia directa sobre la formación de hueso craneal. Operman demostró que la dura podía inhibir la formación de hueso en la sutura coronal al producir una sustancia soluble similar a la heparina. Sin duda la duramadre juega un papel central en la morfogénesis del cráneo pero es difícil aislarla ya que en vivo también tiene otros efectos sobre los componentes del sistema nervioso central como líquido cerebroespinal, cerebro y leptomeninges, la dificultad *in vitro* es que la duplicación auténtica requiere un microambiente extremadamente complejo, por lo que es sumamente importante la presencia de la duramadre para realizar la formación, regeneración y remodelación ósea en el cráneo<sup>75-77</sup>.

Se ha demostrado que el periostio tiene una población celular, incluyendo condroprogenitoras y osteoprogenitoras, que pueden formar cartílago y hueso en condiciones apropiadas. Por otra parte, se sabe que el periostio de huesos largos desempeña un papel importante en la cicatrización de fracturas; sin embargo, el periostio del cráneo parece que no interviene de manera significativa en la cicatrización de defectos craneales, independientemente de la edad del animal, debido a que su participación en osificación mesenquimatosa es poca.<sup>78-79</sup>

Existe un considerable interés en el desarrollo de las alternativas al autoinjerto de hueso fresco. En años recientes, diversos laboratorios han reportado el aislamiento de factores de la matriz de hueso desmineralizado que induce la formación ósea, tal como proteína morfogenética ósea (Urist et. al., 1984), osteogenina (Luyten et. al., 1989), y factor osteoinductivo (Bentz et. al., 1989). Además, genes de moléculas osteoinductoras, BMP-1, BMP-2A, BMP-2B, y BMP-3, han sido clonados (Wozney et. al., 1988).

Posteriormente, Yasui et al. (1977) y Sato et al. (1998) reportaron un tercer mecanismo de osificación, "formación de hueso transcondroide".<sup>27</sup> El hueso condroide, un tejido intermedio entre hueso y cartílago, fue formado directamente por condrocitos como células, con la transición de tejido fibroso a hueso ocurriendo gradualmente y consecutivamente sin invasión capilar.

El interés por obtener una óptima reconstrucción tanto funcional como estética del cráneo ha conducido a la utilización de diversos materiales aloplásticos que incluyen el Silicón, la Hidroxiapatita, el Titanio, y el Metilmetacrilato <sup>80-83</sup>

Los avances en la ingeniería tisular<sup>72</sup> y la integración de ciencias biológicas y físicas, están creando y desarrollan una serie de materiales que conllevan factores de crecimiento, andamios biológicos, así como la incorporación de células madre mesenquimatosas.

Recientemente el desarrollo de biorreactores *ex vivo* capaces de manufacturar hueso, proporcionan diversos materiales de ingeniería tisular para utilizarse directamente en el sistema esquelético. Por ejemplo, Viveseos es un hueso creado mediante ingeniería tisular que se está utilizando en fusiones espinales y en implantes dentales <sup>89-91</sup>.

Actualmente todos los materiales utilizados para la regeneración ósea poseen al menos uno de estos tres mecanismos de acción y sólo el hueso autólogo posee los 3. De ahí que sea indispensable buscar un sustituto de hueso que tenga los 3 factores osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis

### **Formación de hueso *de novo***

El hueso se forma por sustitución de un tejido conjuntivo preexistente (el cartílago). Existen principalmente dos tipos de osificación: intramembranosa (o directa) y endocondral (o indirecta) <sup>92</sup>. La Osificación intramembranosa (o directa) tiene lugar directamente en el tejido conjuntivo, por este proceso se forman los huesos planos de la bóveda del cráneo: hueso frontal, hueso occipital, hueso parietal y hueso temporal. El mensénquima se condensa en tejido conjuntivo vascularizado en el cuál las células están unidas por largas prolongaciones y en los espacios intercelulares se depositan haces de colágeno orientados al azar que quedan incluidos en la matriz<sup>93</sup>. La primera señal de formación ósea es la aparición de bandas de matriz más densas que se depositan equidistantemente de los vasos sanguíneos que forman la red ósea.

Las células se agrandan y se reúnen sobre las trabéculas, adquieren forma cuboidea o cilíndrica y permanecen unidas por prolongaciones cortas, se transforman en osteoblastos que depositan matriz osteoide no calcificada, las trabéculas se hacen más gruesas, se secreta colágeno que forma fibras orientadas al azar formando hueso reticular (colágena que corre en todas las direcciones) <sup>94</sup>, y se depositan sales de calcio sobre la matriz extracelular (lo que denominamos calcificación), el hueso neoformado que se deposita en forma de matriz ósea no mineralizada y se denomina osteoide. Debido al engrosamiento trabecular los osteoblastos quedan atrapados en lagunas y se convierten en osteocitos que se conectan con los osteoblastos de la superficie por medio de los canalículos, el número de osteoblastos se mantiene por la diferenciación de células primitivas del tejido conjuntivo laxo. En las áreas de esponjosa que debe convertirse en hueso compacto las trabéculas siguen engrosándose hasta que desaparecen los espacios que rodean los vasos sanguíneos. <sup>95</sup> Las fibras de colágeno se vuelven más ordenadas, donde persiste el tejido esponjoso termina el engrosamiento trabecular y el tejido vascular interpuestos se transforma en tejido hematopoyético finalmente el tejido conjuntivo se transforma en el periostio. Los osteoblastos superficiales se transforman en células de aspecto fibroblástico que persisten como elementos

osteoprogenitores en reposo ubicados en el endostio o el periostio pudiéndose transformar de vuelta en osteoblastos si son provocados.<sup>96</sup>

Las células osteoprogenitoras son células del mesénquima, las cuales tienen la capacidad de proliferar y diferenciar a osteoblastos. En el control transcripcional de la diferenciación de estas células a osteoblastos, se ha identificado un factor de transcripción, que resultan claves en el control de la expresión de múltiples genes correspondientes al desarrollo del fenotipo de osteoblastos, estos son “*Core binding factor a 1*” (*Cbfa1*) también conocido como *Runx 2*,<sup>97</sup> es el marcador molecular más temprano y altamente específico de células del linaje osteoblástico. La expresión de *Runx 2* es indispensable para la diferenciación de las células osteoprogenitoras en osteoblastos, como se demostró por su inactivación en animales experimentales, en los que se observó la formación de esqueletos compuestos por cartílago con ausencia completa de hueso. La expresión de *Runx 2* incrementa constantemente en las células osteoprogenitoras durante su diferenciación y se mantiene presente en osteoblastos diferenciados. Como parte del control ejercido por *Runx 2*, se ha identificado la regulación de la expresión de otros factores de transcripción. La diferenciación de las células osteoprogenitoras, es un proceso esencial para la formación, el crecimiento y la reparación de los huesos

Los osteoblastos son las células encargadas de sintetizar, secretar y ordenar las proteínas que conforman la fase orgánica de la matriz extracelular ósea. Los osteoblastos además regulan la mineralización, disponiendo de manera adecuada a las proteínas y formando pequeñas depresiones (100nm), sobre la matriz, rodeadas por parte de su membrana plasmática que posee enzimas como fosfatasa alcalina (ALP)<sup>98</sup>, la cual aumenta la concentración local de fosfato y calcio, creando así centros de nucleación de las sales que constituyen la fase mineral. Numerosos factores sistémicos y locales regulan la proliferación, diferenciación y metabolismo de los osteoblastos, mediante diversos mecanismos moleculares.

Los osteocitos se localizan inmersos en la matriz extracelular ósea dentro de espacios, lagunas osteocíticas, en donde están bañados por líquido tisular y conectado con otros osteocitos, con osteoblastos en la superficie del tejido óseo y con los conductos de Havers, a través de prolongaciones de su membrana que se extienden por una red de conductos denominados canalículos. En general los osteocitos presentan un metabolismo menos activo que los osteoblastos y, aunque en forma limitada, tienen la capacidad de sintetizar y remover (resorber) Matriz Extra Celular ósea. Los osteocitos son responsables del proceso de osteólisis osteocítica, en el cual se resorben las sales amorfas de calcio y de fosfato depositadas en la fase mineral de la matriz extracelular ósea y de esta forma la actividad de los osteocitos contribuye de manera importante a la homeostasis de calcio.

Los osteoclastos son responsables de la resorción ósea. Son células multinucleadas localizadas en las superficies de tejido óseo, dentro de las depresiones de resorción que forman, llamadas lagunas de Howship. La parte de la membrana celular del osteoclasto que se encuentra en contacto con la superficie del tejido óseo, forma un espacio autoconteniente, en donde son liberadas tanto enzimas lisosomales, que permiten la lisis de las proteínas, como ácido, que solubiliza las sales de la matriz extracelular ósea. Mediante la resorción, se liberan factores de crecimiento previamente depositados por los osteoblastos en la matriz extracelular, los cuales



junto con algunas hormonas provenientes de otros tejidos (PTH y 1,25(OH) D), estimulan a los osteoblastos a depositar hueso nuevo en las zonas recién resorbidas, en una proporción similar al hueso que fue removido por los osteoclastos. Esta coordinación, entre las actividades de los osteoclastos y de los osteoblastos, permite mantener el equilibrio entre los procesos de formación y resorción, determinándose así el estado óptimo de la masa esquelética<sup>96-97</sup>

En la Matriz ósea extracelular ósea la proteína más abundante es la colágena tipo I, representa la proteína más abundante de la matriz extracelular del hueso, posee una estructura conductiva, promueve el depósito de mineral y se une a proteínas no colágenas de la matriz, cuando se une a proteínas óseas morfogénicas promueve de manera significativa la generación ósea. El 90% de la matriz extracelular en hueso está constituida por colágena, sobre todo tipo I (>95%). En la molécula de colágeno se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas. Contiene característicamente, los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina siendo, este último, un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno. Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas.<sup>99</sup> Las fibras de colágena tipo I le confieren al hueso su resistencia a las fuerzas tensionales.

El resto de la matriz orgánica está compuesto principalmente por glicoproteínas, como la osteocalcina que es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas durante la formación ósea, dependiente de las vitaminas D y K, incorporándose dentro de la matriz del hueso. Puede unirse a la hidroxiapatita. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y contiene tres restos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico. Sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos. Se observan incrementos de osteocalcina en aquellos procesos donde hay un incremento de la formación del hueso o, lo que es lo mismo, un aumento en la actividad osteoblástica. En estos casos las concentraciones de osteocalcina correlacionan bien con otros marcadores como la fosfatasa alcalina y la histomorfometría ósea. Es un marcador del metabolismo óseo. Es marcador de la formación y remodelación ósea.<sup>100</sup>

Otra proteína sumamente importante es la Osteopontina la cual es una fosfoproteína capaz de unirse al calcio, que tiene una elevada afinidad hacia la hidroxiapatita y que juega un papel importante en la mineralización del hueso y en calcificación. Proteína con el tripéptido RGD, que forma parte de las llamadas SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) Es una glicoproteína fundamental en los procesos de remodelado y regeneración óseos, con una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocida por las integrinas de los osteoblastos y los osteoclastos ( $\alpha v\beta 3$ , entre otras). También actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales celulares<sup>101</sup>

Durante un estudio histológico en hueso mandibular canino Schenk<sup>102</sup>, al igual que Aerssens<sup>103</sup> en un estudio de calidad ósea en 1996 y 1998 determinaron las características histológicas de hueso por medio de la tinción de Hematoxilina-Eosina

donde mencionan que se observa el osteoide de color rosado pálido y el hueso mineralizado de color rosado oscuro, la tinción de Von Kossa permitió ver el ribete de osteoide de color rojo intenso y el hueso mineralizado de color negro, y en la tinción de Tricrómico de Masson o Goldner los núcleos se tiñeron de azul púrpuro, las zonas osificadas de verde y el resto de tejido de una tonalidad naranja rosa. Este gran contraste facilita las lecturas histomorfométricas

De acuerdo a lo publicado por Basurto<sup>104</sup> en el 2008 actualmente hay diferentes metodologías para abordar la evolución de la formación de hueso *de novo* como radiografías, densitometrías y de manera indirecta determinación de iones en sangre, pero no informan sobre el porcentaje de los componentes minerales, ni del tamaño de las espículas óseas y como van cambiando a través del tiempo como lo hace la microscopia de barrido. El microscopio electrónico de barrido ambiental, se usa para evaluar la morfología y evaluar la cuantificación de elementos químicos por dispersión de rayos X (como calcio o fosfato) durante el proceso de consolidación ósea. Además el microanálisis con microscopia de barrido presenta varias ventajas, a) se realiza in situ, b) es cuantitativo (a diferencia de otras técnicas que son cualitativas) y c) es específico para cada zona de hueso.<sup>105</sup>

Por lo anterior podemos centrarnos en medir los principales marcadores del metabolismo óseo que permiten detectar formación ósea por osteoblastos y resorción ósea por osteoclastos.<sup>106</sup>

- **RUNX2** La proteína RUNX2, también denominada CBFA1, es un factor de transcripción clave asociado con la diferenciación de los osteoblastos, codificada en humanos por el gen *runx2*. RUNX2 pertenece a la familia de factores de transcripción RUNX y tiene un dominio Runt de unión a ADN. Es esencial en la diferenciación osteoblástica y en la morfogénesis del esqueleto, y actúa como una proteína estructural para los ácidos nucleicos y factores reguladores implicados en la expresión génica relacionada con el esqueleto. Esta proteína puede unir al ADN tanto en forma de monómero como formando parte de un complejo heteromérico, en este último caso, con mayor afinidad. Se han descrito diversas variantes transcripcionales del gen *runx2* que codifican diferentes isoformas de la proteína, gracias al uso de promotores alternativos.<sup>107</sup>
- **Colageno tipo I:** Proteína de 1678 aminoácidos codificada en el cromosoma X. Abundante en la dermis, el hueso, el tendón, la dentina y la córnea. Se presenta en fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro, agrupándose para formar fibras colágenas mayores. Sus subunidades mayores están constituidas por cadenas alfa de dos tipos, que difieren ligeramente en su composición de aminoácidos y en su secuencia. Es sintetizada por fibroblastos, condroblastos y osteoblastos. Su función principal es la de resistencia al estiramiento. Específicamente en el hueso el colágeno constituye el 90% de la matriz orgánica.<sup>108</sup>
- La **osteocalcina** es una hormona peptídica lineal formada por 49 aminoácidos y producida por los osteoblastos durante la formación ósea, incorporándose dentro de la matriz del hueso. Puede unirse a la

hidroxiapatita. Los niveles de osteocalcina correlacionan positivamente con el cociente de formación ósea, Se considera un marcador específico del metabolismo óseo.

- La **osteopontina** es una fosfoproteína capaz de unirse al calcio, que tiene una elevada afinidad hacia la hidroxiapatita y que juega un papel importante en la mineralización del hueso y en calcificación, es una proteína constituyente de la matriz ósea, es producida por los osteoblastos y participa en la remodelación de las áreas de resorción creada por los osteoclastos. Puede unirse a la hidroxiapatita, con características parecidas a la fibronectina. Se considera un marcador específico del metabolismo óseo.<sup>109-110</sup>
- La **fosfatasa alcalina** es una enzima que se encuentra en todos los tejidos, es responsable de eliminar grupos fosfatos a varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides. Las fosfatasas alcalinas son enzimas que se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. Tanto el aumento, así como su disminución en plasma tienen significado clínico. En el caso particular del hueso, favorece la hidrólisis de la matriz ósea como parte del proceso de remodelación. Correlaciona con la actividad osteoblástica y el depósito de calcio en el hueso.<sup>111</sup>

Estos son los principales marcadores del metabolismo óseo y su determinación permite estimar la diferenciación ósea (RUNX2), la capacidad de formación de una matriz ósea mineralizada (colágena I, y fosfato de calcio) y la capacidad de regular procesos de remodelación al sintetizar enzimas específicas (fosfatasa alcalina) y proteínas óseas específicas (osteocalcina y osteopontina).

## JUSTIFICACION

Las anomalías craneofaciales han sido reconocidas y documentadas desde la antigüedad y consideradas como deformidades que relegan al individuo dentro de la Sociedad<sup>1</sup>.

La incidencia en la presentación de anomalías craneofaciales oscila desde la fisura facial incompleta hasta los cuadros sindrómicos en craneosinostosis y fisuras faciales atípicas. Su frecuencia se estima entre el 1 por 1.000 a 10.000 nacidos vivos<sup>2-3</sup>; en México un 60% tendrán una supervivencia superior a un año.

Cuando el tratamiento de las malformaciones craneofaciales es temprano (antes de los 3 meses), una cirugía garantiza en muchos casos una corrección adecuada. Sin embargo, por encima de los 6 meses, los pacientes presentan significativos cambios secundarios que requieren intervenciones más complejas<sup>4</sup>. El tratamiento quirúrgico va encaminado a corregir la hipertensión endocraneana y a proporcionar corrección estética, en la mayoría de las malformaciones, sin embargo se han mencionado complicaciones frecuentes en estas reconstrucciones de entre

un 30 a un 50%, principalmente falta de integración ósea, reabsorción y secuestro óseo

Por otro lado los accidentes ocupan la primera causa de mortalidad dentro de la población general en México, constituyen la primera causa entre los escolares y la segunda en preescolares. El traumatismo craneoencefálico ocupa el 40 al 70% del total de accidentes, son más frecuentes en el sexo masculino 2:1, los mecanismos de producción más frecuentes son caídas y accidentes de tránsito, el traumatismo craneoencefálico tiene una incidencia muy elevada en la práctica pediátrica, ocurren en más del 50% de los niños politraumatizados y pueden representar una condición que compromete la vida en un 70 a 80% cuando hay pérdida de hueso o requiere craniectomía descompresiva, como parte del manejo del trauma craneoencefálico, y al mismo tiempo el 30% de los niños menores de 3 años pueden sufrir un desgarro dural que puede provocar pérdida evolutiva de hueso craneal que hace sumamente difícil su manejo

Nuestro hospital es un Instituto Nacional donde se refieren estos pacientes y es una de las primeras causas de atención en consulta y cirugía.

El estudio proporciona información sobre la generación de una unidad osteogénica que podría permitir la reconstrucción de grandes defectos óseos con morbilidad mínima.

Esta unidad osteogénica podrá ser usada en diferentes tipos de hueso: con osificación membranosa u osteocondral, en huesos planos o largos y para diferentes especialidades que tengan como objetivo la reconstrucción de algún tejido óseo

Es un proyecto de gran interés científico, ya que la unidad osteogénica se podrá usar en los pacientes con defectos de cráneo de espesor total, especialmente para corrección de defectos congénitos y postrauma, donde la principal limitante del injerto autólogo radica en la cobertura del laminado, y en niños las placas no absorbibles y absorbibles no tienen la capacidad de crecimiento, que permita un desarrollo cerebral adecuado

Es un proyecto innovador ya que no hay un material hasta el momento que cumpla con la osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis, para cubrir defectos en cráneo.

Después de realizar la actualización de la revisión de la literatura (**ANEXOS 1 y 2**) y un análisis de la calidad metodológica de la información en la materia de "Medicina Basada en la Evidencia" se llegó a las siguientes conclusiones:

- Con los antecedentes previamente establecidos y los resultados en vías de publicación, demostrados de manera experimental, basados en la búsqueda de una unidad ósea a través de estudio comparativo de hueso craneal generado en un modelo experimental de osteogénesis consideramos que existía la posibilidad de llevar a cabo un protocolo experimental en defectos craneales en los que proporcionar regeneración ósea podría contribuir de manera importante para favorecer la reparación biológica de los mismos con las tres características de osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis que

no tiene algún material que hasta ahora exista, incluso con capacidad de crecimiento.

- Previo a realizar un protocolo experimental en humanos proponemos un modelo en animales murinos atímicos en los cuales se realice un defecto de tamaño crítico en cráneo de los mismos y sea cubierto con una unidad osteogénica propuesta con las propiedades osteoconductoras de la Colágena en forma de Dermis Humana Acelular, con una Matriz Ósea Desmineralizada favoreciendo la Osteoinducción y además de células provenientes de Médula Ósea por su potencial osteogénico, para formar hueso de novo.
- Consideramos que tenemos grandes posibilidades de formar hueso con la unidad osteogénica propuesta, pero es importante realizar este experimento con la finalidad de determinar si las características del hueso que vamos a formar en el defecto de tamaño crítico en cráneo del modelo murino son similares a las características del hueso sano del cráneo de los mismos ratones, además de determinar las características histomorfométricas, estudiaremos si tiene el mismo grosor, si rebasa o no más allá del defecto de tamaño crítico que pretendemos rellenar y si infiltra o no otras estructuras como duramadre o encéfalo.

## **FACTIBILIDAD**

Dado que el Instituto Nacional de Pediatría es un centro de referencia a nivel nacional de malformaciones craneofaciales y secuelas de traumatismo craneoencefálico, es una necesidad la búsqueda de substitutos de hueso que permitan el tratamiento de estos niños con complicaciones derivadas de la pérdida ósea en cráneo o ausencia congénita del mismo

En el Instituto Nacional de Pediatría se cuenta con la experiencia para el tratamiento de secuelas de trauma craneoencefálico y manejo de anomalías craneofaciales con deficiencia de hueso en caso de que se pueda plantear una etapa clínica a mediano- largo plazo.

Contamos con el apoyo interinstitucional de la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa para realizar la fase de Referente de normalidad de la técnica y la fase experimental en animales en el Instituto Nacional de Rehabilitación.

La Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa cuenta con todo el equipamiento necesario (para realizar estudios de inmunohistoquímica, micrófono, bioterio con área para animales inmunocomprometidos, centrífugas, campanas de flujo laminar, citómetro de flujo, microscopio óptico y de barrido, etc.) para la realización del protocolo experimental. La unidad cuenta con los permisos necesarios y la autorización para el manejo de tejidos siguiendo normas y estándares de calidad en los procesos.



Se describe la participación de las instituciones que colaboraron en el proyecto:

1. En el Instituto Nacional de Rehabilitación:
  - A) La Unidad de Ingeniería Tisular, Terapia Celular y Medicina Regenerativa procesó el tejido de forma que se garantizó la obtención de óptimos resultados
  - B) El servicio de Patología procesó los tejidos para corroborar Histológicamente el tejido de neoformación
  - C) En el servicio de microscopía de Barrido se observaron las características fisicoquímicas del tejido neoformado
  - D) El Bioterio del Instituto en donde se llevaron a cabo las cirugía de los animales así como el cuidado y alimentación de los mismos en el área para animales inmunocomprometidos
2. En el Instituto Nacional de Pediatría se proporcionó el apoyo científico y técnico del Investigador principal y los tutores asociados en cuanto a la captura, análisis y procesamiento de datos, para publicación y obtención de grado
3. El Servicio de Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cancerología permitió llevar a cabo la obtención de células de médula ósea de donador alogénico a paciente relacionado previa autorización firmando el consentimiento informado

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Generar hueso *de novo* en el cráneo de ratones atímicos, utilizando una unidad osteogénica con hueso desmineralizado en pasta como soporte para la osteoinducción, dermis humana acelular para promover la osteoconducción y células madre de médula ósea para promover la osteogénesis.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluar el tejido de neoformación por microscopía electrónica para describir la presencia de depósitos de compuestos orgánicos como calcio y fosfato
- Describir por histoquímica la morfología del hueso neoformado, mediante técnicas de Hematoxilina y Eosina, Von Kossa y Tricrómico de Masson
- Describir por inmunohistoquímica la presencia de fosfatasa alcalina, colágena tipo I y las proteínas típicas del hueso osteocalcina y osteopontina
- Describir la expresión del gen Runx 2 por Inmunohistoquímica



## HIPOTESIS.

- Analizar el tejido de neoformación por microscopía electrónica para la presencia de depósitos de compuestos orgánicos como calcio, fosfato y magnesio en el tejido óseo nuevo
- Por medio de histoquímica describir la morfología del hueso neoformado, mediante tinciones de Hematoxilina y Eosina, Von Kossa y Tricrómico de Masson para demostrar la presencia de tejido osteoide y el hueso desmineralizado en el hueso neoformado
- Realizar inmunohistoquímica para demostrar la presencia de fosfatasa alcalina, colágena tipo I y las proteínas típicas del hueso osteocalcina y osteopontina, por ser marcadores específicos del metabolismo óseo y debido a que correlacionan con la actividad osteoblástica y el depósito de calcio en el hueso *de novo*
- Se demostrara la expresión del gen Runx 2 por inmunohistoquímica para medir la diferenciación de células progenitoras a osteoblastos en el hueso *de novo*

## MATERIAL Y MÉTODOS

### DISEÑO DEL ESTUDIO

#### EXPERIMENTAL

### DESCRIPCION DEL UNIVERSO DE TRABAJO

#### POBLACIÓN OBJETIVO Y POBLACION ELEGIBLE

Ratones atímicos, de 4-5 semanas de edad, destetados. Se usaron 3 grupos experimentales y 3 grupos control incluyendo 5 ratones atímicos en cada grupo y un grupo de 5 ratones para Referente de normalidad de las técnicas establecidas.

Un total de 35 ratones atímicos

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Ratones sanos
2. peso entre 8-10 g.

#### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Muerte durante el período de estudio

#### CRITERIOS DE ELIMINACION

No existen

## TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se determinó el tamaño de la muestra por conveniencia, decidimos hacer 6 grupos (3 grupos control y 3 grupos objetivo) con 5 ratones en cada grupo por así convenir metodológicamente para nuestro estudio

## DESCRIPCION DE VARIABLES

### DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO Y SUS ESCALAS DE MEDICIÓN

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL (parcial y en desarrollo)	TIPO DE VARIABLE
Número de células mononucleares totales de la médula ósea	Se refiere al número de células obtenidas en la muestra de tejido de médula ósea.	Por análisis diferencial en frotis	Numérica discreta (1-100)
Tipo de población	Es la expresión fenotípica de marcadores en la superficie (CD) de las células aisladas en el cultivo primario	Se realizará mediante marcaje de las células con marcadores fluorescentes específicos para identificar mediante Citometría de Flujo: CD14, CD45, CD34, CD166, CD90, CD73. Cuando el marcador está presente se considera positiva.	Nominal Dicotómica 1- Positivo 2- Negativo
Porcentaje de células positivas a un marcador	Es el porcentaje de la población celular que es positiva a cierto marcador mediante Citometría de flujo	Se realiza mediante Citometría de Flujo, se reporta como el porcentaje de la población celular total que fue positivo a un marcador específico, P/E el 99.8 % fue positivo a CD45	Numérica discreta (1-100)
Gramos de hueso desmineralizado por ml de médula ósea	Se refiere al peso del hueso desmineralizado por mm <sup>3</sup> que se requiere para preparar la pasta por ml de médula ósea	Por gramaje de mm <sup>3</sup> de médula ósea en pasta	Numérica discreta (1-100)



Fosfatasa alcalina	Se refiere a la medición de la actividad de la FA resultado del estímulo de la actividad osteoblástica	Inmunohistoquímica Para evaluar la presencia de osteoblastos	Nominal 0.-Nulo 1.-Presente débil (25% del campo) células aisladas 2.-Presente franco (50% del campo) Focales grupos celulares 3.-Presente difuso (75% del campo) Múltiples grupos en el total de la muestra 4.-Presente generalizado (100% del campo) Todo el tejido 5. No valorable
Colágeno I	Proteína estructural de la matriz ósea, conformada por 1678 aa.	Proteína sintetizada por los osteoblastos, detectada en el constructo osteogénico mediante inmunohistoquímica.	Nominal 0.-Nulo 1.-Presente débil (25% del campo) células aisladas 2.-Presente franco (50% del campo) Focales grupos celulares 3.-Presente difuso (75% del campo) Múltiples grupos en el total de la muestra 4.-Presente generalizado (100% del campo) Todo el tejido 5. No valorable

Histología del hueso neoformado	Se refiere a la tinción de hematoxilina y eosina,(presencia de tejido osteoide y hueso mineralizado) Tinción de Von Kossa(presencia de tejido osteoide) Tricrómico de Massón (presencia de zonas osificadas)	Histología 1.Ausente 2.Presente	Nominal Dicotómica 1- Presente 2- Ausente
RUNX2	Factor de transcripción expresado por las células progenitoras que estimula la diferenciación ósea. En osteoblastos su expresión se asocia a proliferación celular.	Inmunohistoquímica Medición de la diferenciación de células madre a osteoblastos	Nominal 0.-Nulo 1.-Presente débil (25% del campo) células aisladas 2.-Presente franco (50% del campo) Focales grupos celulares 3.-Presente difuso (75% del campo) Múltiples grupos en el total de la muestra 4.-Presente generalizado (100% del campo) Todo el tejido 5. No valorable
Osteopontina	Proteína sintetizada específicamente por osteoblastos, favorece la proliferación celular y la remodelación en defectos óseos	Inmunohistoquímica Marcador tardío de la formación ósea al mineralizarse y remodelarse el tejido óseo	Nominal 0.-Nulo 1.-Presente débil (25% del campo) células aisladas 2.-Presente franco (50% del campo) Focales grupos celulares 3.-Presente difuso (75% del campo) Múltiples grupos en el

			total de la muestra 4.-Presente generalizado (100% del campo) Todo el tejido 5. No valorable
Osteocalcina	La osteocalcina es una hormona peptídica lineal formada por 49 aminoácidos y producida por los osteoblastos durante la formación ósea,	Inmunohistoquímica Marcador intermedio de la formación ósea por osteoblastos	Nominal 0.-Nulo 1.-Presente débil (25% del campo) células aisladas 2.-Presente franco (50% del campo) Focales grupos celulares 3.-Presente difuso (75% del campo) Múltiples grupos en el total de la muestra 4.-Presente generalizado (100% del campo) Todo el tejido 5. No valorable
Presencia de depósitos de fosfato, calcio, magnesio y sodio	Se refiere a Presencia de grupos carbono, oxígeno, fosfato, calcio, magnesio, sodio y otros minerales para determinar la presencia de hueso de novo	Microscopía electrónica	Numérica continua



## DESCRIPCION DE PROCEDIMIENTOS

Fase de:

### **Referente de normalidad de los procedimientos con hueso normal de calota de ratón atímico**

Los procedimientos se realizaron en el siguiente orden:

#### **1. Toma del tejido**

Se realizó en quirófano del bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación bajo condiciones de esterilidad obligatorias, en el área de animales Inmunocomprometidos. Hicimos una incisión medio sagital a lo largo de la superficie antero superior del cráneo de ratones atímicos, incidiendo el pericráneo en la línea media, formándose dos colgajos; piel y pericráneo que fueron disecados y elevados bilateralmente. Posteriormente se realizó una craneotomía de aproximadamente 4x4 mm, con bisturí y fue colocada en un tubo estéril que contenía 5 ml de Formol con Buffer para posteriormente ser procesado. Para la Referente de normalidad de las técnicas de Inmunohistoquímica para Runx2, Fosfatasa alcalina, Osteocalcina, Osteopontina y Colágena I, al igual que para las tinciones de Hematoxilina y Eosina, Tricrómico de Masson y Von Kossa y la Microscopía de Barrido utilizaremos 5 ratones atímicos de 5 semanas a los que previamente se les realizó eutanasia con sobredosis de pentobarbital.

#### **2. Transporte y recepción del tejido**

El tejido fue transportado en el tubo estéril y llevado al departamento de patología de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación donde se llevó a cabo la preparación para realizar los procedimientos de visión bajo Microscopía Electrónica, Inmunohistoquímica y Tinciones histoquímicas. Cada frasco estuvo etiquetado como Referente de normalidad 1 a 5 (E-1, E-2, E-3, etc) para identificar posteriormente durante el procesamiento de la muestra para su inclusión y cortes de parafina.

El tejido fue recibido por la Citotecnóloga Bertha Vargas, quien verificó que estuvieran adecuadamente etiquetados y que contuvieran efectivamente el material especificado como calota de ratón con los datos de Referente de normalidad y el número correspondiente y que se encontraran en Formol con Buffer. Y se anotaron en la libreta del registro los siguientes datos: 1) Identificación de la muestra, 2) Tamaño de la biopsia, 3) Tipo de tejido recibido y 4) Observaciones.

Fase de:

### **Experimentación de los procedimientos con hueso formado de novo de calota de ratón atímico**

Se utilizaron 30 ratones atímicos que permanecieron en el bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Unidad Osteogénica- Hueso desmineralizado en pasta, médula ósea humana y dermis humana acelular.

Aplicamos primero un andamio de dermis humana acelular en el sitio del defecto en contacto con la duramadre, e hicimos una pasta con el hueso desmineralizado y la médula ósea humana

Usamos médula ósea de Humana debido a la factibilidad de la toma de la misma por la participación del servicio del Banco de sangre del Instituto Nacional de Cancerología, previa firma de un consentimiento informado de un donador alogénico para un paciente relacionado y sabiendo que los ratones son atímicos, esperado no tener rechazo de la unidad osteogénica al usar medula humana

### **1. Implantación de la unidad osteogénica**

Se llevó a cabo en quirófano del bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación bajo condiciones de esterilidad obligatorias, en el área de animales Inmunocomprometidos. Hicimos una incisión medio sagital a lo largo de la superficie antero superior del cráneo, incidiendo el pericráneo en la línea media, formándose dos colgajos de piel y pericráneo que se disecaron y elevaron bilateralmente. Posteriormente se realizó una craneotomía de 4 x 4 mm que correspondió aproximadamente al 20% de la superficie de la calota del ratón efectuada con bisturí, teniendo precaución de no lesionar la duramadre ni el cerebro y procedimos a implantar la unidad osteogénica. (Hueso desmineralizado en pasta, médula ósea humana y dermis humana acelular)

La médula ósea fue obtenida de un donador alogénico para un paciente relacionado ya que al ser los ratones atímicos consideramos tener poca o nula respuesta antigénica. Esta médula es técnicamente más fácil de obtener previa firma de un consentimiento bajo información que la autóloga del ratón por el tamaño y el gramaje de los mismos, donde es técnicamente inviable la toma de la misma.

La muestra de trabajo estuvo formada de 3 grupos aleatorios para el grupo experimental y 3 para el grupo control colocando 5 ratones en cada grupo. Todos los animales experimentales fueron operados e implantados con la misma unidad osteogénica. Los grupos se distribuyeron aleatoriamente

Los ratones del grupo control únicamente fueron sometidos a la resección de un fragmento craneal de tamaño similar al grupo experimental sin ser implantada en ellos la unidad osteogénica

### **2. Toma de tejido**

Se llevó a cabo en quirófano del bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación bajo condiciones de esterilidad obligatorias, en el área de animales Inmunocomprometidos El primer grupo fue sacrificado a los 30 días , el segundo a los 2 meses y el tercer grupo a los 3 meses, con la finalidad de analizar las características moleculares e histológicas del hueso de novo Para cada muestra se retiró la calota completa de ratón y fueron sometidos a:

- a) Análisis histológico de tejido neoformado, resultado del implante de unidad osteogénica, este se llevó a cabo mediante la evaluación de la tinción de hematoxilina- eosina, Masson y Von Kossa,
- b) Análisis mediante inmunohistoquímica para evaluar de la presencia de fosfatasa alcalina ósea, colágena tipo I , Osteopontina, Osteocalcina y Runx 2

c) Microscopía Electrónica de Barrido la estructura del tejido óseo de novo para determinar la cantidad de depósitos de fosfato, magnesio, calcio, sodio, etc.

### **3. Transporte y recepción del tejido**

El tejido fue transportado en un tubo estéril y llevado al departamento de patología de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación donde se llevó a cabo la preparación para realizar los procedimientos de visión bajo Microscopía Electrónica, Inmunohistoquímica y Tinciones histoquímicas. Cada frasco fue etiquetado como Experimental (grupos 1, 2 y 3) dependiendo de si se sacrificaron al mes a los dos meses o a los tres meses respectivamente y además con un número aleatorio de acuerdo al orden en que se fueron sacrificando para poder identificarlos como aquellos a los que se aplicó la unidad osteogénica y como Control (grupos 1, 2 y 3) de igual forma si se sacrificaron al mes a los dos meses o a los tres meses respectivamente y además con un número aleatorio de acuerdo al orden en que se fueron sacrificando para poder identificarlos como aquellos a los que no se le aplicó la unidad osteogénica (ejemplo Exp 1-1, Exp 1-2 o en su caso Contr 1-1, Contr 1-2 etc) para su identificación posteriormente durante el procesamiento de la muestra para su inclusión y cortes de parafina.

El tejido se recibió por la Citotecnóloga Bertha Vargas verificando que estuvieron adecuadamente etiquetados y que contenían efectivamente el material especificado como calota de ratón con los datos de grupo control o grupo experimental y el número correspondiente de acuerdo al mes que se recogió la muestra así como que se encuentren en Formol con Buffer. Y se anotaron en la libreta del registro los siguientes datos: 1) Identificación de la muestra, 2) Tamaño de la biopsia, 3) Tipo de tejido recibido y 4) Observaciones.

### **4. Procesamiento de muestras para la fase de Referente de normalidad y fase experimental (grupo experimental y control):**

Deshidratación e inclusión de muestras.112

1. La muestra se encuentra en Formol con Buffer
2. Se cambian las muestras a PBS 1x se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos
3. Se cambian las muestras a etanol al 50%, se mantienen en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos
4. Se cambian las muestras a etanol al 70% se mantienen en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos
5. Se cambian las muestras a etanol al 96%, se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos
6. Se cambian las muestras a etanol absoluto, se mantienen en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos
7. Se cambian las muestras a etanol absoluto, se mantienen en agitación a temperatura ambiente por 60 minutos
8. Se cambian las muestras a xilol, se mantiene en agitación a 30 minutos a temperatura ambiente



9. Se cambian las muestras a xilol, se mantiene en agitación a 30 minutos a temperatura ambiente
10. Se pasan a xilol parafina 20:80 y se dejan toda la noche a temperatura de 56° Celcius en la estufa durante toda la noche
11. Se ponen en parafina a temperatura de 56°C en la estufa durante 60 minutos
12. Se incluyen las muestras en las barras de Leuckart se vierte la parafina a 60°C, colocando las piezas en forma orientada en relación al sitio que se desea observar específicamente
13. Se coloca a 4°C durante 15 a 30 minutos hasta que la parafina solidifique completamente y se realizaran los cortes con un micrótomo
14. Los bloque se colocan en un micrótomo tipo Minot
15. La cuchilla se queda fija y es la pieza la que se desliza sujeta a una platina, esta se desliza verticalmente cuando se hace girar la manivela
16. Se obtienen cortes seriados en forma de cinta de 3 micras
17. Estos cortes se extienden, al obtenerlos del micrótomo, en agua tibia (42°C) contenida en un cristizador. En esa misma agua se introducen los portaobjetos, previamente tratados con Tespa y se colocan los cortes

## 5. Tinciones (ANEXO 3)

### Tinción de hematoxilina-eosina

Esta técnica de tinción comprende el siguiente proceso:

- Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
- Lavado con agua corriente.
- Diferenciación con alcohol-ácido.
- Lavado con agua corriente.
- Inmersión en agua amoniacal.
- Lavado con agua corriente (10-20 minutos).
- Tinción con eosina a temperatura ambiente.
- Inmersión en alcohol al 95 % para eliminar el exceso de eosina.
- Deshidratación y montaje.

La tinción hematoxilina-eosina permite observar el osteoide de color rosado pálido y el hueso mineralizado de color rosado oscuro.

### Tinción de tricrómico de Masson

Este método considera la siguiente secuencia:

- Hematoxilina férrica durante 5 minutos.
- Agua corriente durante 10 minutos.
- Ponceau de xilidina durante 45 minutos.
- Lavado rápido en ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Ácido fosfotúngstico-Orange G durante 7 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Verde luz durante 12 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético durante 5 minutos.
- Lavado rápido con agua destilada.

- Deshidratar y montar.

En este caso se observa el osteoide de color rojo y el hueso mineralizado de color verde.

### Tinción de Von Kossa

Esta técnica comprende los siguientes puntos:

- Nitrato de plata al 3 % durante 5 minutos.
- Dos lavados de 5 minutos con agua destilada.
- Formol-carbonato de sodio durante 5 minutos.
- Agua corriente durante 10 minutos.
- Ponceau de xilidina durante 45 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Ácido fosfotúngstico-Orange G durante 7 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Deshidratación y montaje.

La tinción de Von Kossa permite ver el ribete de osteoide de color rojo intenso y el hueso mineralizado de color negro. Este gran contraste facilita las lecturas histomorfométricas.

## 6. Tipificación del tejido

Se realizaron los siguientes procedimientos para la tipificación por inmunohistoquímica

- 1) Inmunohistoquímica para identificación de Colágena I, Runx2, Osteocalcina, Osteopontina y Fosfatasa alcalina<sup>116-20</sup> (ANEXO 4)

### METODOLOGÍA

Inmunohistoquímica

#### Desparafinar y rehidratar:

- Fijar con PFA 1% 20 min en refrigeración.
- Lavar con PBS 2 veces 3 min

#### Oxidación endógena y Bloqueo:

Soluciones	Tiempo (min)	No. de Veces
Peróxido de Hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) al 3.0% (Este paso se realiza para bloquear la actividad Endógena de la peróxidasa que se podría encontrar en el tejido)	10	1
PBS	3	2



Solución de Bloqueo (PBA)	20	A Temperatura Ambiente
---------------------------	----	------------------------

### Inmunoreacción y Tinción:

Soluciones	Tiempo (min)	No. de Veces
PBS		3
Anticuerpo 1° (Solución de Bloqueo; Anticuerpo primario, 1:50)	Durante toda la noche	4°C en Cámara Húmeda
PBS (PBS; Triton al 0.1%)	3	4
Anticuerpo 2° (Solución de Bloqueo; Anticuerpo primario, 1:50)	2 h	37°C en Cámara Húmeda
PBS (PBS; Triton al 0.1%)	3	A Temp Ambiente
Reactivo A+B	20	4
PBS (PBS; Triton al 0.1%)	3	4
Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System	5-20	Hasta notar la reacción deseada
PBS	3	2

### Para contrastar:

Soluciones	Tiempo (min)	No. de Veces
DAPI		1 gota de DAPI y se pone el cubre-objetos y se deja secar durante toda la noche en oscuridad
		Al siguiente día se puede leer la muestra en microscopía de Fluorescencia

- Se elimina el exceso de Xilol de la laminilla y se aplica resina transparente hasta cubrir todos los cortes histológicos que contenga la laminilla.
- Cuidadosamente, se coloca un cubreobjetos sobre los tejidos embebidos en la resina y se dejan secar hasta el próximo día.

### Preparación de los reactivos y soluciones:<sup>121-23</sup>

- **Etanol al 96 %:**  
Se toman 96 ml de etanol absoluto y se agregan 4 ml de agua destilada.
- **Etanol al 70%:**  
Se toman 70 ml de etanol absoluto y se agregan 30 ml de agua destilada.
- **PBS 1X**
  1. Pesar:
 

4.4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
80.0 g NaCl	2.0 g KCl

 Diluir con 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1 litro.
  2. Diluir el PBS stock 10X a 1X.

- **Peróxido de Hidrógeno 3.0%:**  
Tomar 3 mL de Peróxido de Hidrógeno 30% (stock) y diluir en 97 mL de PBS.
- **Solución de Bloqueo (PBA):**  
Tomar 100 mL PBS al 1x y adicionar 1g de Albumina más 300 µL de Tritón
- **Anticuerpo 1° (1:50):**  
Tomar 0.5 mL de PBA más 10 µL de Anticuerpo primario
- **PBS/Triton:**  
Tomar 100 mL de PBS al 1x y adicionar 300 µL de tritón
- **Anticuerpo 2° (1:100):**  
Tomar 0.5 mL de PBA más 5 µL de Anticuerpo secundario

## 7.- Microscopía de Barrido (Técnica en ANEXO 5)

Realizamos 35 determinaciones de elementos químicos para establecer si había o no calcificación por medio de dispersión de rayos X. Los macrominerales determinados fueron Ca y P que forman los cristales de hidroxapatita, y los microminerales determinados fueron Na, Fe, Zn, y Mg.

Se Buscaron estos elementos en el hueso debido por que es un material anisótropo compuesto por una fase orgánica que constituye el 35% de su peso seco, su mayor componente es la colágena tipo I (90%), el resto son proteoglicanos, proteínas no colágenas y agua. La fase mineral (65%) está compuesta por cristales de fosfato de calcio, organizados en la forma de un cristal conocido como hidroxapatita. En el cual, también, se depositan otros iones (zinc, magnesio, manganeso, hierro, cobre) que no forman cristales definidos, pero juegan un papel importante en las funciones catalíticas del metabolismo óseo<sup>144-145</sup>.

## 8.- Obtención y procesamiento de células progenitoras movilizadas.

La colección de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) fue realizada mediante leucoféresis de flujo continuo, con el empleo de una máquina separadora de células COBE Spectra, con el programa de mononucleares y el set P1Y, el cual es un sistema cerrado con una cámara de separación de una sola etapa y que realiza las fases siguientes:

- Fase de separación: la sangre total anticoagulada con ACD-A es separada en plasma rico en plaquetas (PRP), eritrocitos y leucocitos, El PRP y los eritrocitos son devueltos continuamente al donante. Los leucocitos, y entre ellos las células progenitoras, se mantienen en la cámara de separación. Al final del ciclo el flujo sanguíneo disminuye y las células son concentradas.
- Fase de spillover o de rebosado: mediante un alto flujo de plasma los leucocitos son bombeados por la bomba de plasma hacia la salida de la cámara de separación.
- Fase de colección: inmediatamente después del spillover, la bomba de células comienza a impulsar las células fuera de la centrífuga hacia la bolsa colectora.

En las leucoféresis de gran volumen (procesamiento de más de 3 volémias o más de 15 L de sangre ), empleamos 10 U de heparina sódica por cada mililitro de ACD-A y

directo en la bolsa colectora adicionamos 40 cc de esta dilución. La relación ACD/ST fue de 25/1. En las leucoféresis convencionales (procesamiento de menos de 3 volemias), no empleamos heparina, y la relación ACD/ST fue de 12/1.

La profilaxis de la hipocalcemia consistió en la administración el día antes de 1 g de carbonato de calcio por vía oral (8:00 a.m. y 8:00 p.m.) y luego 1g cada 1 hora mientras duró la colecta. En las leucoféresis de gran volumen además se administraron 2 ámpulas de gluconato de calcio al 10 % diluidas en 1 000 cc de solución salina al 0,9 % a través de una vena periférica .

Como factor estimulante de la hematopoyesis, para lograr la movilización de las CPH, empleamos factor estimulante de colonias granulocíticas (FSC-G) en dosis de 10 µg x Kg dividido en 2 subdosis; a los donantes para trasplante alogénico se les suministró desde 3 días antes de la colecta y hasta el día de la última leucoféresis; en el trasplante autólogo desde 4 días antes de la colecta y hasta el día de la última leucoféresis.

## 9.- Citometría de Flujo para tipificación de células de médula ósea<sup>124-30</sup> (ANEXO 6)

### METODOLOGIA

#### Tripsinización y marcaje

- Aspirar Medio de cultivo
- Añadir PBS
- Lavar la caja
- Aspirar PBS
- Añadir EDTA 1mM
- Incubar a 37 °C 5 min
- Aspirar EDTA
- Añadir Tripsina
- Incubar 1 min 37 °C
- Observar al microscopio si ya están desprendidas las células
- Añadir Albúmina lavar
- Transferir todo el volumen a un tubo cónico de 15 ml
- Añadir Albúmina
- Transferir todo el volumen a un mismo tubo cónico de 15 ml
- Centrifugar a 1500 rpm 10 min.
- Desechar el sobrenadante
- Resuspender las células en PBS
- Contar y determinar la viabilidad celular
- Tomar el volumen en donde se tenga 100000- 200000 células
- Pasar a un tubo fondo redondo de 5 ml
- Necesitamos 5 tubos
- Centrifugar a 1500 rpm 10 min.
- Desechar e sobrenadante por decantación
- Se que da un volumen aprox de 100 µl
- Marcar las células 5 µl de anticuerpo
- CD 34 PE/ CD 166 incubar en la obscuridad 30 min. 4 °C

- Añadir Secundario IGG anti mause FITC incubar en la obscuridad 15 min 4 °C
  - CD 14 APC/ 45 CD FITC incubar en la obscuridad 30 min 4 °C
  - CD 73 PE /CD 90 FITC incubar en la obscuridad 30 min 4 °C
  - Isotipo PE FITC/ APC incubar en la obscuridad 30 min 4 °C
  - Células sin marca incubar en la obscuridad 30 min 4 °C
- 
- Añadir 2 ml de PBS
  - Centrifugar 1500 rpm 10 min
  - Desechar sobrenatante
  - Resuspender las celulas
  - Agregar 500  $\mu$ l solución para Fijar, Solucion de Lisis BD 1:10
  - Leer en Citometro de Flujo: la cuenta celular mínima será de  $1 \times 10^6$  células

### Material

Pipetas Serologicas 2, 5 ,10, 25 ml  
Pipetas Pasteur estériles  
Tubos cónicos para centrifuga 15 ml  
Tubos fondo redondo para citometria de flujo  
Puntas para micropipeta 10 200 1000  $\mu$ l

### Equipo

Campana de Flujo laminar  
Bomba de aspiración  
Centrifuga  
Camara de Nuebauer

### Reactivos

Tripsina 0.25 % EDTA  
EDTA 1  
Albumina 2.5 %  
PBS  
Medio de Cultivo DMEM F12 Antibiótico antimicótico  
Azul Tripano  
Solución de Lisis BD

CD 34 , CD 73 PE  
CD 90 45 FICT  
CD 14 APC  
CD 166  
Secundario ani IGG mause FITC  
Control de isotipo APC  
Control De Isotipo PE /FITC

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El análisis se apoyó con el software SPSS versión 15.0 y 16.0, en este programa se desarrolló la base de datos donde se capturaron los resultados obtenidos, antes del análisis verificamos que no existieran datos erróneos.<sup>131-33</sup> En este trabajo de tesis se ha fijado un grado de significación de 0.05 que corresponde a un intervalo de confianza del 95 %.

### ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

#### VARIABLES CUALITATIVAS

Las variables cualitativas, nominales y ordinales, se describen expresando el porcentaje de cada categoría.

#### VARIABLES CUANTITATIVAS

Las variables cuantitativas se describen utilizando la media aritmética y la desviación estándar

El análisis se realizó con el software SPSS versión 16.0.

Se analizaron las siguientes variables mediante estadística descriptiva:

Fase de Referente de normalidad - La descripción de referencia de medición para las variables de Inmunohistoquímica para marcadores óseos como fosfatasa alcalina, colágena I, Runx2, Osteocalcina y Osteopontina, Variables de estructura ósea mediante Microscopía de Barrido con presencia de depósitos de calcio, fosfato, magnesio y sodio en porcentaje de mineralización y características histológicas de tejido osteoide y osificado mediante tinciones en hueso craneal de ratones atímicos que no se han descrito

Fase de experimentación- La descripción de medición para las variables de Inmunohistoquímica para marcadores óseos como fosfatasa alcalina, colágena I, Runx2, Osteocalcina y Osteopontina, Variables de estructura ósea mediante Microscopía de Barrido con presencia de depósitos de calcio, fosfato, magnesio y sodio en porcentaje de mineralización y características histológicas de tejido osteoide y osificado mediante tinciones en hueso craneal formado de novo en ratones atímicos comparándolos con los resultados del estudio de Referente de normalidad.

Este estudio nos permitió obtener parámetros de referencia ya que consideramos que existe la posibilidad de llevar a cabo en un siguiente paso un protocolo experimental y tratar de formar hueso en niños con defectos craneales en los que proporcionar regeneración ósea podría contribuir de manera importante para favorecer la reparación biológica de los mismos con las tres características de



osteinducción, osteoconducción y osteogénesis que no tiene algún material que hasta ahora exista con la capacidad de crecimiento y mejorar su calidad de vida

## **CONTROLES DE CALIDAD INTERNOS Y EXTERNOS**

### **Gestión de calidad.**

Nos encontramos en este momento realizando la fase de Referente de normalidad de las variables, se implantó la unidad osteogénica en los ratones de experimentación, al igual que se realizó el defecto de tamaño crítico en los animales del grupo control y ya obtuvimos los resultados

Estamos desarrollando los Manuales de procedimientos operativos para la aplicación de una unidad osteogénica que reúne las características de osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis

Se encuentran en fase de actualización los manuales de referencia y los formularios de transmisión de la información: **(ANEXO 7)**

Las líneas de investigación autorizadas son evaluadas por controles de calidad interna en la Unidad (informes de actividad periódica, notificación de efectos y reacciones graves que se presentan ante la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación), pero no se cuenta aún con controles externos.

### **Sistema de recolección y custodia de la información**

La información clínica fue compilada en la hoja de recolección de datos y se llenó exclusivamente por el investigador responsable. El registro fotográfico fue almacenado como parte de la recolección de los datos para su publicación. Los resultados fueron vertidos en una base de datos (SPSS 16.0) para su análisis. Se guardó la confidencialidad del paciente donador de las células de médula ósea; la información deberá estar disponible en cualquier momento que se requiera para evaluaciones internas o externas. Se realizaron reportes semestrales de actividades dirigidos a los comités de Éticas de las instituciones involucradas y reportes semestrales al CONACYT.

## **CONSIDERACIONES ETICAS**

El estudio incluye la investigación de células de médula ósea humana por lo que las consideraciones éticas del estudio se encontraron basadas por lo dispuesto en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud y el Código Penal.

Ley General de Salud<sup>134-37</sup>: Título V., artículo 100, fracciones I, II, III y IV, la investigación en seres humanos deberá adaptarse a los principios científicos y éticos que justifiquen la investigación, podrá efectuarse sólo cuando el conocimiento que se pretenda producir no pueda obtenerse por otro medio idóneo, podrá efectuarse sólo cuando exista una razonable seguridad de que no se expone a riesgos ni daños innecesarios al sujeto en experimentación y deberá contar con el consentimiento por escrito del sujeto en quien se realizará la investigación, o de su representante legal, una vez enterado de los objetivos de la experimentación y de las posibles consecuencias positivas o negativas para su salud (H. Congreso de la Unión 1984d).

Las consideraciones éticas del estudio en torno al Reglamento de la Ley General de Salud se encontrarán basadas por lo dispuesto en el Título Segundo del Capítulo I, artículo 13, del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud, en donde se establece que toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar (H. Congreso de la Unión 1984b). De acuerdo a lo establecido en el artículo 17 del Título Segundo del Capítulo I, el estudio se considera como una investigación **con riesgo mayor al mínimo** en donde se incluyen aquellos estudios prospectivos que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios (H. Congreso de la Unión 1984a), entre los que se consideran la extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud.

La elaboración de la carta de autorización (**ANEXO 8**) se basó en las pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos, preparadas por el consejo de Organizaciones Internacionales de las ciencias Médicas (CIOMS)<sup>138-40</sup> en colaboración con la Organización Mundial de la Salud. Ginebra 2002 y en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud, en base al Título Segundo del Capítulo I, artículos 20, 21 y 22, que estipulan el contenido del consentimiento informado así como las disposiciones relacionadas a los sujetos que lo deberán firmar (H. Congreso de la Unión 1984).

Obtuvimos el consentimiento informado directamente del donador alogénico para un paciente relacionado. En caso de negativa a participar en el proyecto esta decisión fue respetada.

Se realizó una primera cita de contacto inicial con el donado de la médula ósea donde se le informó, repitió y explicó la composición del proyecto, sus implicaciones, riesgos y beneficios.

Se prestó especial atención en que la información fuera clara y sencilla. Se buscó ser imparcial para no influir tendenciosamente sobre la voluntad del paciente. Hicimos incapie en que las células que se usaron para el protocolo de investigación fueron tomadas del tejido sobrante de la muestra de la médula ósea que se usa para llevar a cabo la cuantificación celular, las pruebas de histocompatibilidad y la citometría de flujo para valorar la viabilidad y conteo de células madre.



Este sobrante generalmente es desechado cumpliendo con los protocolos y estándares establecidos en el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cancerología para el manejo de Desechos Biológico Infecciosos de acuerdo a la regulación emitida con la Norma Oficial Mexicana NOM-087 ECOL 2002.<sup>141-43</sup>

Este material que generalmente se desecha una vez sometido a las pruebas antes mencionadas es el que se utilizó para aplicarlo en las unidades osteogénicas que se pretenden formar.

Esto fue ampliamente explicado al donador y se designó un tiempo de preguntas, donde se dió oportunidad al paciente a aclarar dudas y ampliar cualquier información, antes que firmara el consentimiento

Se le proporcionó una copia de la carta de autorización, donde se incluyeron teléfonos para reportar cualquier incidente o consultar dudas en cualquier momento del proyecto.

De ninguna manera el paciente pudo ser incluido en el estudio, si no había aceptado voluntariamente participar en el; haciéndolo constatar por escrito a través de la carta de autorización.

Cualquier nuevo hallazgo en el desarrollo del proyecto, que modifique los beneficios o riesgos planteados al paciente al inicio del mismo, debió ser notificado a los participantes; siendo necesario solicitar nueva autorización.

Para proteger la confidencialidad de los datos de los pacientes, fueron referidos con abreviaturas y con número progresivo de acuerdo al ingreso al estudio. Las hojas de recolección de datos fueron solo analizadas y revisadas por el comité. El resto de los investigadores solo conocieron la clave de cada paciente.

El consentimiento informado está basado por lo dispuesto en Título Segundo del Capítulo I, artículos 20, 21 y 22, del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud que estipulan el contenido del consentimiento informado así como las disposiciones relacionadas a los sujetos que lo deberán firmar (H. Congreso de la Unión 1984).<sup>144-45</sup>

Las consideraciones éticas del estudio en torno al Código Penal estan basadas por lo dispuesto en el Capítulo Único del Título Noveno del Código Penal, artículos 210, 211 y 211-bis, en donde se penalizará al que sin justa causa, con perjuicio de alguien y sin consentimiento del que pueda resultar perjudicado, revele algún secreto o comunicación reservada que conoce o ha recibido con motivo de su empleo, cargo o puesto; cuando la revelación punible sea hecha por personas que prestan servicios profesionales o técnicos; y cuando se revelen, divulguen o utilicen indebidamente o en perjuicio de otro, información o imágenes obtenidas en una intervención de comunicación privada (H. Congreso de la Unión 1931)<sup>146-49</sup>



## RESULTADOS.

Iniciamos explorando los resultados con un análisis descriptivo de los porcentajes tanto de compuestos como de minerales estudiados en las muestras a través de la microscopía de barrido para determinar si había desviaciones significativas en las pruebas de normalidad (prueba de Shapiro Wilk) por grupo de estudio y encontramos que el Carbono en el grupo de estudio 1 (controles) tenía una desviación de la normalidad con un valor de  $p = 0.031$ , en el caso del Oxígeno fue en el grupo 2 (experimental) donde encontramos una  $p < 0.001$ , para el Magnesio en el grupo 1 (control) también hubo desviación de la distribución normal al obtener una  $p < 0.001$ , de la misma forma en el Calcio que es uno de los principales compuestos orgánicos del hueso que nos habla de mineralización observamos también una desviación significativa de  $p = 0.038$  en el grupo control y finalmente en el hierro de manera similar en el grupo control hubo una significancia de  $p = 0.30$  (Tabla 1)

**TABLA 1 PRUEBAS DE NORMALIDAD POR GRUPO DE ESTUDIO PARA MINERALES**

Pruebas de normalidad							
MINERAL	Grupo Estudio	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Carbono	0	0.207	5	0.2	0.886	5	0.338
	1	0.196	15	0.122	0.868	15	0.031
	2	0.179	15	0.2	0.931	15	0.286
Oxígeno	0	0.225	5	0.2	0.920	5	0.536
	1	0.147	15	0.2	0.896	15	0.084
	2	0.273	15	0.003	0.684	15	0.000
Sodio	0	0.204	5	0.2	0.927	5	0.578
	1	0.219	15	0.050	0.905	15	0.117
	2	0.148	15	0.2	0.924	15	0.223
Magnesio	0	0.264	5	0.2	0.934	5	0.628
	1	0.240	15	0.019	0.733	15	0.000
	2	0.202	15	0.097	0.943	15	0.428
Fosfato	0	0.231	5	0.2	0.851	5	0.198
	1	0.120	15	0.2	0.930	15	0.279
	2	0.120	15	0.2	0.975	15	0.927
Azufre	0	0.303	5	0.148	0.788	5	0.064
	1	0.146	15	0.2	0.926	15	0.242
	2	0.128	15	0.2	0.952	15	0.563
Calcio	0	0.249	5	0.2	0.840	5	0.166
	1	0.168	15	0.2	0.873	15	0.038

	2	0.130	15	0.2	0.957	15	0.640
<b>Hierro</b>	0	0.254	5	0.2	0.861	5	0.234
	1	0.214	15	0.062	0.867	15	0.030
	2	0.182	15	0.189	0.908	15	0.130
<b>Zinc</b>	0	0.353	5	0.040	0.852	5	0.202
	1	0.186	15	0.171	0.891	15	0.070
	2	0.133	15	0.2	0.959	15	0.688
*	Este es un límite inferior de la significación verdadera.						
A	Corrección de la significación de Lilliefors						

Cuando se llevaron a cabo las pruebas de normalidad (prueba de Shapiro Wilk) para el momento de la toma de la muestra también encontramos desviaciones significativas, específicamente en el Carbono en el momento de la toma de la muestra al mes teniendo una  $p=0.05$ , en el compuesto Hierro en la muestra tomada al mes y a los tres meses hubo también una desviación de la distribución normal con un valor de  $p=0.029$  y  $p=0.044$  respectivamente (Tabla 2)

**TABLA 2 PRUEBAS DE NORMALIDAD POR MOMENTO DE LA TOMA DE MUESTRA PARA MINERALES**

Pruebas de normalidad							
MINERAL	Momento toma muestra	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
<b>Carbono</b>	0	0.207	5	0.2	0.886	5	0.338
	1	0.202	10	0.2	0.846	10	0.053
	2	0.219	10	0.190	0.887	10	0.160
	3	0.157	10	0.2	0.944	10	0.606
<b>Oxigeno</b>	0	0.225	5	0.2	0.920	5	0.536
	1	0.160	10	0.2	0.945	10	0.614
	2	0.369	10	0.000	0.570	10	2.451
	3	0.154	10	0.2	0.923	10	0.384
<b>Sodio</b>	0	0.204	5	0.2	0.927	5	0.578
	1	0.204	10	0.2	0.898	10	0.213
	2	0.253	10	0.067	0.862	10	0.082
	3	0.203	10	0.2	0.927	10	0.422
<b>Magnesio</b>	0	0.264	5	0.2	0.934	5	0.628
	1	0.145	10	0.2	0.935	10	0.506
	2	0.205	10	0.2	0.925	10	0.404
	3	0.183	10	0.2	0.874	10	0.111
<b>Fosfato</b>	0	0.231	5	0.2	0.851	5	0.198
	1	0.203	10	0.2	0.877	10	0.120
	2	0.181	10	0.2	0.907	10	0.266

	3	0.162	10	0.2	0.916	10	0.328
<b>Azufre</b>	0	0.303	5	0.148	0.788	5	0.064
	1	0.291	10	0.015	0.921	10	0.371
	2	0.158	10	0.2	0.940	10	0.560
	3	0.230	10	0.141	0.863	10	0.083
<b>Calcio</b>	0	0.249	5	0.2	0.840	5	0.166
	1	0.169	10	0.2	0.877	10	0.122
	2	0.190	10	0.2	0.882	10	0.137
	3	0.193	10	0.2	0.904	10	0.245
<b>Hierro</b>	0	0.254	5	0.2	0.861	5	0.234
	1	0.239	10	0.108	0.824	10	0.029
	2	0.160	10	0.2	0.962	10	0.809
	3	0.197	10	0.2	0.840	10	0.044
<b>Zinc</b>	0	0.353	5	0.040	0.852	5	0.202
	1	0.192	10	0.2	0.947	10	0.643
	2	0.129	10	0.2	0.952	10	0.693
	3	0.119	10	0.2	0.987	10	0.993
*	Este es un límite inferior de la significación verdadera.						
A	Corrección de la significación de Lilliefors						

Con los resultados anteriores decidimos entonces determinar si existieron diferencias entre los grupos de tratamiento y los momentos de la toma de la muestra en los porcentajes de los compuestos y minerales de las muestras analizadas por microscopía de barrido calculándose las medianas y los rangos para cada uno de los mismos encontrando en general que para el Carbono al mes 1, 2 y 3, en cualquiera de los dos grupos intervenidos ( control o experimental) el valor de la mediana se encontró entre 60 y 76 en promedio sin haber amplias modificaciones, sin embargo si hubo diferencias en el valor de los rangos que fueron desde 2.99 y 17.16, en contraste el valor de la mediana del grupo de Referente de normalidad ( en el momento 0) fue de 44.74 (rango 29.26). El Oxígeno tuvo un comportamiento muy similar en cuanto al valor de la mediana para los 3 grupos y los 3 diferentes momentos de la muestra que osciló entre 14.08 y 18.06 (rangos de entre 2.9 y 6.8). En cuanto al Sodio el valor de la mediana si tuvo variaciones importantes en el grupo control y el experimental en los tres diferentes momentos de la toma de la muestra que fue de 0.38 hasta 0.92 con rangos variables de entre 0.13 y 0.37 llama la atención que para este mismo compuesto el valor de la Referente de normalidad tuvo una mediana de 0.20 con un rango de 0.20. Cuando comparamos el Magnesio también hubo variaciones del valor de la mediana con un patrón ascendente que fue para el grupo control de 0.40 en el primer mes, de 0.50 al segundo y 0.11 al tercero (rangos de 0 .07, 0.12 y 0.32 respectivamente) pero en el grupo experimental el valor de la mediana al primer mes fue de 0.60, al segundo de 0.96 y al tercero 0.148 (rangos de 0.05, 0.10 y 0.11 respectivamente), llama la atención que el valor de este último mes en el grupo experimental tiene un valor de la mediana similar al grupo de Referente de normalidad que fue de 0.18 con rango de 0.11. Uno de los minerales más significativos para la formación de hueso es el Fosfato en donde encontramos un valor de la mediana para el grupo de Referente de normalidad de

11.96 (rango de 8.40). En el mes 1 en el grupo control fue de 0.41 (rango de 1.71) y en experimental era de 3.82 (rango de 6.29). Al mes 2 para el control fue de 1.24 (rango de 4.27) y en el experimental fue de 8.13 (rango de 5.91). En el mes 3 en el control fue de 2.66 (rango de 2.20) y en el experimental el valor reportado fue de 6.70 (rango de 2.79), observamos en el grupo experimental una tendencia ascendente en el momento de la toma de la muestra al mes y a los dos meses con un descenso de la presencia de calcio al tercer mes. Cuando valoramos Azufre observamos que en el grupo control el valor de la mediana va ascendiendo de 0.69 en el primer mes, 0.78 en el segundo y 1.34 en el tercer mes (rangos de 0.29, 0.39 y 0.41 respectivamente), el grupo experimental por el contrario va descendiendo el valor de la mediana de 0.68 mes 1, 0.49 mes 2 y 0.48 al mes 3, presentando este último grupo un valor de la mediana más cercano al valor de este mismo componente en el grupo de Referente de normalidad que tiene una mediana de 0.35 con un rango de 0.27. Otro mineral sumamente importante en la formación de hueso es el Calcio y al analizar éste en el grupo control observamos que hay una tendencia ascendente en los valores de la mediana ya que en el primer mes su valor fue de 0.25, a los dos meses de 1.72 y en el tercer mes de 3.90 con rangos de 3.32, 7.8 y 5.51, de igual forma el grupo experimental tiene esa misma tendencia ascendente conforme pasa el tiempo encontrando que al mes el valor de la mediana es de 6.25 con rango de 9.74, al segundo mes es de 16.12 con rango de 11.35 y al tercer mes la mediana tiene un valor de 12.12 con un rango de 4.94 y al igual que en el caso de otros componentes óseos como el Fosfato o el Azufre el valor del grupo experimental al tercer mes se acerca más al valor del grupo de Referente de normalidad en comparación con el grupo control en el mismo momento de toma de la muestra, ya que la mediana para la Referente de normalidad con respecto al calcio es de 24.77 con rango de 17.12. Por otro al medir la mediana para el Hierro se observa que las variaciones para el grupo control van de 0.34 al primer mes, 0.188 en el segundo mes 0.27 para el tercero con rangos de 0.49, 0.24 y 0.17 respectivamente y en el grupo experimental no hay variaciones importantes en los valores de las medianas en los diferentes momentos de la toma de muestra ya que en primer mes es de 0.13 con rango de 0.90, en el segundo mes de 0.17 con rango de 0.15 y al tercer mes es de 0.14 con rango de 0.05 acercándose más los valores del grupo control al tercer mes con relación al grupo de Referente de normalidad (mediana de 0.21 rango de 0.21) que el grupo experimental. Finalmente cuando se hizo el análisis para el Zinc observamos que para el grupo control hubo una tendencia ascendente de este mineral de 0.070 a 0.19 del primer al tercer mes respectivamente con rangos de 0.12 a 0.28 en los mismos momentos de la toma de la muestra y en el grupo experimental el valor de la mediana osciló de 0.14 en el primer mes a 0.11 en el segundo y tercer mes con rangos de 0.09, 0.20 y 0.14 respectivamente, encontrando en los tres meses un valor similar de la mediana del grupo de Referente de normalidad que fue de 0.14 y rango de 0.12 (Tabla 3)

**TABLA 3 MEDIANAS Y RANGOS ENTRE GRUPOS DE TRATAMIENTO EN LOS DIFERENTES MOMENTOS DE TOMA DE MUESTRA**

Momento de la toma de muestra														
MINERAL	Momento 0		Mes 1				Mes 2				Mes 3			
	Refer. Normalidad		Control		Experimental		Control		Experimental		Control		Experimental	
	Medna	Rango	Medna	Rango	Medna	Rango	Medna	Rango	Medna	Rango	Medna	Rango	Medna	Rango
Carbono	44.740	29.260	78.040	2.910	73.760	9.540	76.950	11.650	60.260	17.166	71.850	5.080	66.700	6.281
Oxigeno	18.060	3.260	19.390	2.940	14.080	4.580	18.240	1.700	16.640	1.7769	18.770	6.820	13.790	2.382
Sodio	.200	.200	.380	.220	.920	.370	.490	.130	.445	.225	.910	.320	.550	.150
Magnesio	.180	.117	.040	.070	.060	.050	.050	.124	.096	.100	.110	.320	.148	.110
Fosfato	11.960	8.400	.410	1.710	3.820	6.298	1.240	4.277	8.130	5.915	2.660	2.200	6.700	2.794
Azufre	.350	.270	.690	.290	.680	.320	.780	.390	.490	.321	1.340	.410	.480	.215
Calcio	24.770	17.120	.250	3.320	6.250	9.740	1.720	7.817	16.120	11.356	3.900	5.510	12.120	4.945
Hierro	.219	.210	.340	.490	.130	.090	.188	.240	.179	.151	.270	.170	.140	.052
Zinc	.140	.120	.070	.120	.140	.090	.060	.092	.117	.200	.190	.280	.110	.140

Una vez realizado el análisis univariado para los porcentajes de los componentes minerales del hueso, procedimos a analizar de forma univariada también, los resultados encontrados en las tinciones específicas y para las inmunohistoquímicas de los marcadores de formación de *hueso de novo*. En el caso de las tinciones se midieron como variables dicotómicas de positivo y negativo y al reportar las Frecuencias y porcentajes de histología positiva por tinción encontramos:

Para la tinción de Hematoxilina y Eosina en el momento de la Referente de normalidad el 100% de los casos (n=5) fueron positivos a esta tinción. Para el grupo control reportado al mes sólo el 20% (n=1) fue positiva, y para el experimental en el mismo momento de la toma de muestra 60% (n=3) se reportó como positiva. Cuando esta misma tinción se valoró en el segundo mes de la intervención en el grupo control hubo 0% positivo y en el grupo experimental se observaron 80% (n=4) positivos. Finalmente al contrastar en el tercer mes con dicha tinción en el grupo control se encontraron 20% (n=1) positivo y para el experimental los reportes positivos fueron de 100% (n=5), prácticamente igual que en el grupo de Referente de normalidad

Al valorarse las laminillas teñidas con Tricrómico de Massón, estos fueron los resultados: El grupo de Referente de normalidad obtuvo un 60% (n=3) valores positivos (por supuesto todas las Referente de normalidades se consideran como tiempo 0). Al analizar en el primer mes esta tinción el grupo control reportó 20% (n=1) positivos y el experimental fue positivo en 4 casos (80%). Al ser valorada esta misma tinción en el segundo mes el grupo control tuvo 20% (n=1) casos positivos, y el grupo experimental tuvo 5 casos (100%) positivos. Así mismo en el tercer mes la tinción de Massón fue positiva para el grupo control en 1 muestra (20%) y para el grupo experimental 4 muestras fueron positivas, lo que representó el 80% de este grupo

Y para la tinción de Von Kossa que nos reporta la presencia de tejido osteoide cuando se observaron las laminillas de la fase de Referente de normalidad el 100% (n=5) fue positiva. Para el grupo control y experimental al primer mes de la

intervención se observaron 0% positiva y 20% positiva (n=1) respectivamente. Para el mes 2 de la toma de muestra la positividad de ese tejido osteoide siguió siendo 0 para el grupo control y en 3 casos (60%) fue positivo para el grupo experimental. En el tercer mes el grupo control siguió sin reportar valores positivos para la tinción de Von Kossa y hubo 80% (n=4) casos positivos para el grupo experimental. (Tabla 4)

**TABLA 4 FRECUENCIAS Y PORCENTAJES DE HISTOLOGÍA POSITIVA POR TINCIÓN**

		Momento de la toma de muestra													
TINCIÓN	Valor	Momento 0		1 mes				2 meses				3 meses			
		Referente de normalidad		control		experimental		control		experimental		Control		experimental	
		N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Tinción HyE	Negativo	0	0%	4	80%	2	40%	5	100%	1	20%	4	80%	0	0%
	Positivo	5	100%	1	20%	3	60%	0	0%	4	80%	1	20%	5	100%
Masson	Negativo	2	40%	4	80%	1	20%	4	80%	0	0%	4	80%	1	20%
	Positivo	3	60%	1	20%	4	80%	1	20%	5	100%	1	20%	4	80%
Von Kossa	Negativo	0	0%	5	100%	4	80%	5	100%	2	40%	5	100%	1	20%
	Positivo	5	100%	0	0%	1	20%	0	0%	3	60%	0	0%	4	80%

Se exploraron los resultados de las inmunohistoquímicas con un análisis descriptivo de las muestras para determinar si había desviaciones significativas en las pruebas de normalidad (prueba de Shapiro Wilk) por grupo de estudio y encontramos que son muy significativas las inmunohistoquímica para Fosfatasa Alcalina en los tres grupos tanto de referencia como control y experimental con una  $p=0.006$ , en el caso de Colágena I, el valor de la  $p = 0.006$ , para Osteocalcina también hubo un valor de  $p<0.005$  excepto en el grupo Referente de normalidad, por otro lado la Osteopontina en todos sus grupos también el valor de  $p<0.05$  y para Runx2 también es muy significativo en todos los grupos  $p<0.005$  (Tabla 5)

**TABLA 5 PRUEBAS DE NORMALIDAD POR GRUPO DE ESTUDIO PARA INMUNOHISTOQUIMICAS**

Pruebas de normalidad							
INMUNOHISTOQUIMICA	Grupo de Estudio	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Inmunohistoquímica para Fosfatasa alcalina	Referente de normalidad	0.473	5	0.001	0.552	5	0
	Control	0.392	13	0	0.628	13	0
	Experimental	0.238	15	0.022	0.817	15	0.006
Inmunohistoquímica para Colágena 1	Referente de normalidad	0.367	5	0.026	0.684	5	0.006
	Control	0.392	13	0	0.628	13	0
	Experimental	0.271	15	0.004	0.815	15	0.006
Inmunohistoquímica para Osteocalcina	Referente de normalidad	0.231	5	0.2	0.881	5	0.314
	Control	0.431	13	0	0.592	13	0
	Experimental	0.333	15	0	0.782	15	0.002

Inmunohistoquímica para Osteopontina	Referente de normalidad	0.349	5	0.046	0.771	5	0.046
	Control	0.47	13	0	0.533	13	0
	Experimental	0.385	15	0	0.63	15	0
Inmunohistoquímica para Runx2	Referente de normalidad	0.473	5	0.001	0.552	5	0
	Control	0.47	13	0	0.533	13	0
	Experimental	0.29	15	0.001	0.771	15	0.002
*							
Este es un límite inferior de la significación verdadera.							
a							
Corrección de la significación de Lilliefors							

Cuando hicimos las pruebas de normalidad por momento de la toma de la muestra encontramos que para la Inmunohistoquímica de Fosfatasa alcalina hubo valores significativos para el momento de la toma de muestra al mes  $p=0.037$  y a los 3 meses  $p=0.34$ , la Inmunohistoquímica de Colágena 1 presenta significancia en todos los momentos de la toma de muestra incluyendo la referente de normalidad una  $p<0.05$ , para la Inmunohistoquímica de Osteocalcina hay significancia en el momento de la toma de la muestra al mes y dos meses con una  $p=0.049$  y  $p=0.012$  respectivamente, al revisar los valores de la Inmunohistoquímica de Osteopontina hubo significancia en todos los momentos de la toma de la muestra con una  $p<0.05$  y en cuanto a Runx2 hubo significancia al mes con una  $p=0.002$ , y a los 3 meses con  $p=0.012$  (Tabla 6)

**TABLA 6 PRUEBAS DE NORMALIDAD POR MOMENTO DE LA TOMA DE MUESTRA PARA INMUNOHISTOQUIMICAS**

Pruebas de normalidad							
INMUNOHISTOQUIMIC A	Momento de la toma de muestra	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Inmunohistoquímica para fosfatasa alcalina	Referente de normalidad	0.472	5	0.4	0.552	5	0.4
	1 mes	0.209	9	0.2	0.823	9	0.037
	2 meses	0.206	9	0.2	0.883	9	0.172
	3 meses	0.250	10	0.075	0.830	10	0.034
Inmunohistoquímica para colágena 1	Referente de normalidad	0.367	5	0.026	0.684	5	0.006
	1 mes	0.269	9	0.059	0.808	9	0.025
	2 meses	0.209	9	0.2	0.823	9	0.037
	3 meses	0.224	10	0.168	0.838	10	0.042
Inmunohistoquímica para Osteocalcina	Referente de normalidad	0.230	5	0.2	0.881	5	0.314
	1 mes	0.277	9	0.044	0.833	9	0.049
	2 meses	0.275	9	0.048	0.779	9	0.012
	3 meses	0.236	10	0.121	0.867	10	0.094
Inmunohistoquímica para Osteopontina	Referente de normalidad	0.348	5	0.046	0.770	5	0.046
	1 mes	0.211	9	0.2	0.826	9	0.041
	2 meses	0.211	9	0.2	0.826	9	0.041
	3 meses	0.250	10	0.076	0.806	10	0.017

Inmunohistoquímica para Runx2	Referente de normalidad	0.472	5	0.04	0.552	5	0.4
	1 mes	0.293	9	0.025	0.718	9	0.002
	2 meses	0.223	9	0.2	0.837	9	0.055
	3 meses	0.324	10	0.004	0.794	10	0.012
<ul style="list-style-type: none"> <li>Este es un límite inferior de la significación verdadera.</li> </ul>							
A Corrección de la significación de Lilliefors							

Quando obtuvimos los resultados del univariado de las pruebas de inmunohistoquímica de los marcadores de hueso *de novo* como Fosfatasa Alcalina, Colágena 1, Osteocalcina, Osteopontina y Runx2, las presentamos como Frecuencias y Porcentajes de presencia de tinción inmunohistoquímica, a cada una de las laminillas teñidas con esta técnica se le dio un valor de acuerdo a la escala establecida en la tabla de variables del 0 al 4 como se reporta en el cuadro 1

### CUADRO 1. ESCALA PARA LECTURA DE LAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

ESCALA	VALOR ESTABLECIDO
0	Ausencia total o nulo
1	Presente débil (25% del campo) Células aisladas
2	Presente franco (50% del campo) Grupos celulares focales
3	Presente difuso (75% del campo) Grupos celulares múltiples
4	Presente generalizado (100% del campo)

Quando reportamos Fosfatasa alcalina para el momento 0 (Referente de normalidad) en el 80% de los casos (n=4) estuvo presente débilmente, y en el 20% (n=1) hubo presencia franca de la fosfatasa. En el momento de toma de muestra a un mes la fosfatasa alcalina en el grupo control estuvo ausente en el 80% de los casos (n=4), en 20% de los casos estuvo presente débilmente (n=1) y en el grupo experimental se encontraron 2 casos con presencia débil (40%), y en 3 casos (60%) estuvo presente francamente. En el mes 2 el grupo control siguió siendo nulo en 80% (n=4) y en el 20% restante hubo presencia débil. Al mes 3 hubo presencia débil en 3 casos del grupo control (60%) y el restante 40% fue nulo el valor, no así en el grupo experimental que reportó 80% presencia difusa (4 casos) y el caso faltante (20%) reportó presencia francamente positiva.

En los cortes teñidos para Colágena 1 encontramos que había positividad franca en 60% de los casos (n=3) y el 40% (n=2) restante se reportó como presente débil, al analizar el grupo de Referente de normalidad. Para el grupo control en el primer mes de estudio la colágena 1 se reportó nula en el 60% de los casos (n=3) y presente débil en el 40% (n=2) restante y para el mismo momento de la toma de muestra pero en el grupo experimental 80% (n=4) se reportaron como positivo franco. A los dos meses siguió reportándose en el grupo control 80% nulo, pero para el grupo experimental 60% (n=3) se encontró francamente positivo y en los casos restantes se observó débilmente positivo. Al medir nuevamente la colágena 1 a los



3 meses de la intervención en el grupo control 60% y 40% se reportaron nulo y presente débil respectivamente.

Otro de los marcadores importantes de la formación de hueso es la Osteocalcina, cuando se midió ésta última en el grupo de Referente de normalidad se observaron 40% (n=2) positivo difuso, otro 40% presente generalizado y un 20% (n=1) para positivo franco. En el primer mes la Osteocalcina en el grupo control 60% fue nulo (n=3) y el restante 40% positivo débil, contrariamente para el grupo experimental al mes 60% (n=3) fue presente débil y 40% presente franco. Ya para el segundo mes el grupo control continuó reportándose 80% nulo, (n=4) contra el experimental 80% positivo franco y 20% presente débil. En el tercer mes de estudio la colágeno 1 se reportó 60% nulo (n=3) en el grupo control, pero para el experimental 60% (n=3) fueron francamente positivos con un caso positivo difuso y un positivo generalizado (20% para cada uno).

También la Osteopontina es un marcador positivo para la formación de hueso *de novo* y al estudiarse en el momento 0 (Referente de normalidad) se vio que estaba presente generalizado en un 60% de los casos y había un caso positivo franco y uno más positivo difuso. Al considerar el momento de la toma de la muestra en el grupo control la Osteopontina estuvo ausente en 80% (n=4) de las laminillas, pero en el grupo experimental 60% (n=3) fue positivo difuso y en los otros 2 casos se encontró presente franco, ambos grupos en el primer mes del estudio. Al avanzar en el segundo mes la Osteopontina continuó ausente en el 80% de los casos en el grupo control y 60% presente difuso en el grupo experimental, los otros dos casos fueron francamente positivos. Del mismo modo a los 3 meses continuo ausente la Osteopontina para el grupo control y para el experimental 60% fue presente difuso y el resto presente franco.

Por último un marcador inicial de transcripción para la formación de hueso denominado Runx2 fue también estudiado reportándonos en el momento de la Referente de normalidad 4 casos presente débil y el caso 1 restante fue francamente positivo. Para el grupo control en el primer mes el Runx2 estuvo totalmente ausente (100%), para este mismo grupo en el mes 2, 75% de los casos fue nulo (n=3) y un caso restante (25%) se observó presente débil, en este grupo hubo la pérdida de un caso en el momento de hacer la inmunohistoquímica, y finalmente para el grupo control pero en el mes 3 60% fue nulo y el resto fue positivo débil. Para los mismos momentos pero en el grupo experimental observamos el mes 1, 80% (n=4) presente difuso, un caso más presente franco para el Runx 2, en este mismo grupo al mes 2 60% fue positivo débil y 40% positivo franco, por ultimo al analizar el grupo experimental en el mes 3 encontramos similitud con el grupo de Referente de normalidad reportando 4 casos positivo débil y 1 caso positivo franco. (Tabla 7)

**TABLA 7 FRECUENCIAS Y PORCENTAJES DE PRESENCIA DE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA**

		Momento de la toma de muestra															
INMUNO HISTOQUIMICA	Estratificación	Momento 0		1 mes				2 meses				3 meses					
		Estandariza.		Control		Experimental		Control		Experimental		Control		Experimental			
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		

<b>Fosfatasa Alcalina</b>	Nulo	0	0%	4	80%	0	0%	4	80%	0	0%	2	40%	0	0%
	Presente débil 25% cel aisladas	4	80%	1	20%	2	40%	1	20%	1	20%	3	60%	0	0%
	Pres franco 50% focales	1	20%	0	0%	3	60%	0	0%	3	60%	0	0%	1	20%
	Pres difuso 75% múltiples	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	20%	0	0%	4	80%
	Pres gralizado 100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
<b>Colágena 1</b>	Nulo	0	0%	3	60%	0	0%	4	80%	0	0%	3	60%	0	0%
	Presente débil 25% cel aisladas	2	40%	2	40%	1	20%	1	20%	2	40%	2	40%	1	20%
	Pres franco 50% focales	3	60%	0	0%	4	80%	0	0%	3	60%	0	0%	1	20%
	Pres difuso 75% múltiples	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	3	60%
	Pres gralizado 100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
<b>Osteocalcina</b>	Nulo	0	0%	3	60%	0	0%	4	80%	0	0%	4	80%	0	0%
	Presente débil 25% cel aisladas	0	0%	2	40%	3	60%	1	20%	1	20%	1	20%	0	0%
	Pres franco 50% focales	1	20%	0	0%	2	40%	0	0%	4	80%	0	0%	3	60%
	Pres difuso 75% múltiples	2	40%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	20%
	Pres gralizado 100%	2	40%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	20%
<b>Osteopontina</b>	Nulo	0	0%	4	80%	0	0%	4	80%	0	0%	4	80%	0	0%
	Presente débil 25% cel aisladas	0	0%	1	20%	0	0%	1	20%	0	0%	1	20%	0	0%
	Pres franco 50% focales	1	20%	0	0%	2	40%	0	0%	2	40%	0	0%	2	40%
	Pres difuso 75% múltiples	1	20%	0	0%	3	60%	0	0%	3	60%	0	0%	3	60%
	Pres gralizado 100%	3	60%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
<b>Runx2</b>	Nulo	0	0%	4	100%	0	0%	3	75%	0	0%	3	60%	0	0%
	Presente débil 25% cel aisladas	4	80%	0	0%	0	0%	1	25%	3	60%	2	40%	4	80%
	Pres franco 50% focales	1	20%	0	0%	1	20%	0	0%	2	40%	0	0%	1	20%
	Pres difuso 75% múltiples	0	0%	0	0%	4	80%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	Pres gralizado 100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%

A continuación procedimos a realizar un análisis Bivariado con una prueba U Mann-Whitney para determinar si había diferencias en los porcentajes de minerales de las muestras en los diferentes momentos de la toma de muestra, obteniendo los siguientes datos:

Para el caso de la prueba U Mann-Whitney para los porcentajes de minerales en los grupos experimental y control en el mes 1 encontramos diferencias significativas entre estos grupos en el Carbono ( $p=0.032$ ), Oxígeno ( $p=0.008$ ), Sodio ( $p=0.008$ ), Calcio ( $p=0.016$ ), Hierro ( $p=0.008$ ) y Zinc ( $p=0.008$ ). (Tabla 8)

**TABLA 8 PRUEBA U DE MANN WHITNEY PARA LOS PORCENTAJES DE MINERALES EN LAS MUESTRAS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTAL Y CONTROL EN EL MES 1.**

MINERAL	Grupo Estudio	Rango promedio	Suma rangos	U Mann-Whitney	W Wilcoxon	Z	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]
Carbono	Control	7.6	38	2	17	-2.2	0.028	0.032
	Experimental	3.4	17					
Oxígeno	Control	8	40	0	15	-2.619	0.009	0.008
	Experimental	3	15					
Sodio	Control	3	15	0	15	-2.619	0.009	0.008
	Experimental	8	40					
Magnesio	Control	4.9	24.5	9.5	24.5	-0.631	0.528	0.548
	Experimental	6.1	30.5					
Fosfato	Control	4	20	5	20	-1.571	0.116	0.151
	Experimental	7	35					
Azufre	Control	6.4	32	8	23	-0.955	0.34	0.421
	Experimental	4.6	23					
Calcio	Control	3.2	16	1	16	-2.41	0.016	0.016
	Experimental	7.8	39					
Hierro	Control	8	40	0	15	-2.619	0.009	0.008
	Experimental	3	15					
Zinc	Control	3.1	15.5	0.5	15.5	-2.522	0.012	0.008
	Experimental	7.9	39.5					

Al realizar esa misma prueba en el mes 2 para los grupos control y experimental, encontramos diferencias significativas para los porcentajes de minerales en Carbono ( $p=0.016$ ), Oxígeno ( $p=0.03$ ), Fosfato ( $p=0.015$ ) y Calcio ( $p=0.015$ ). (Tabla 9)

**TABLA 9 PRUEBA U DE MANN WHITNEY PARA LOS PORCENTAJES DE MINERALES EN LAS MUESTRAS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTAL Y CONTROL EN EL MES 2.**

MINERAL	Grupo Estudio	Rango promedio	Suma rangos	U Mann-Whitney	W Wilcoxon	Z	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]
Carbono	Control	7.8	39	1	16	-2.40	0.016	0.015
	Experimental	3.2	16					
Oxígeno	Control	7.6	38	2	17	-2.193	0.028	0.031
	Experimental	3.4	17					
Sodio	Control	7	35	5	20	-1.566	0.117	0.150

	Experimental	4	20					
<b>Magnesi o</b>	Control	3.6	18	3	18	-1.984	0.047	0.055
	Experimental	7.4	37					
<b>Fosfato</b>	Control	3.2	16	1	16	-2.402	0.016	0.015
	Experimental	7.8	39					
<b>Azufre</b>	Control	7.2	36	4	19	-1.775	0.075	0.095
	Experimental	3.8	19					
<b>Calcio</b>	Control	3.2	16	1	16	-2.402	0.0162	0.015
	Experimental	7.8	39					
<b>Hierro</b>	Control	5.4	27	12	27	-0.104	0.916	1
	Experimental	5.6	28					
<b>Zinc</b>	Control	4.1	20.5	5.5	20.5	-1.466	0.142	0.150
	Experimental	6.9	34.5					

También para el mes 3 aplicamos la misma prueba al contrastar los porcentajes de los minerales en los grupos de estudio experimental y control encontrando diferencias significativas en Carbono ( $p=0.015$ ), Oxígeno ( $p=0.007$ ), Sodio ( $p=0.007$ ), Fosfato ( $p=0.007$ ) y Calcio ( $p=0.007$ ). (Tabla 10)

**TABLA 10 PRUEBA U DE MANN WHITNEY PARA LOS PORCENTAJES DE MINERALES EN LAS MUESTRAS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTAL Y CONTROL EN EL MES 3.**

MINERAL	Grupo Estudio	Rango promedio	Suma rangos	U Mann-Whitney	W Wilcoxon	Z	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]
<b>Carbono</b>	Control	7.8	39	1	16	-2.409	0.015	0.015
	Experimental	3.2	16					
<b>Oxígeno</b>	Control	8	40	0	15	-2.611	0.009	0.007
	Experimental	3	15					
<b>Sodio</b>	Control	8	40	0	15	-2.611	0.009	0.007
	Experimental	3	15					
<b>Magnesi o</b>	Control	5.1	25.5	10.5	25.5	-0.419	0.675	0.690
	Experimental	5.9	29.5					
<b>Fosfato</b>	Control	3	15	0	15	-2.611	0.009	0.007
	Experimental	8	40					
<b>Azufre</b>	Control	8	40	0	15	-2.611	0.009	0.007
	Experimental	3	15					
<b>Calcio</b>	Control	3	15	0	15	-2.611	0.009	0.007
	Experimental	8	40					
<b>Hierro</b>	Control	7.4	37	3	18	-2.008	0.044	0.055
	Experimental	3.6	18					
<b>Zinc</b>	Control	6.2	31	9	24	-0.731	0.464	0.547
	Experimental	4.8	24					

Decidimos hacer un estudio Bivariado para tinciones histológicas y se realizó prueba exacta de Fisher para buscar diferencias significativas en las proporciones de muestras positivas por tinción histológica entre los grupos de control y experimental y de estos con el grupo de Referente de normalidad en los tres momentos de toma de muestra posteriores a la intervención. el grupo control presentó muestras positivas en una proporción significativamente menor al grupo de Referente de normalidad en los tres momentos de toma de muestra por las tinciones H-E y Von Kossa, mientras que no presentó diferencias en ningún momento con respecto al grupo de Referente de normalidad por la tinción de Masson. En cambio, el grupo experimental no mostró diferencias significativas con respecto al grupo de Referente de normalidad en ningún momento excepto por la tinción de Von Kossa al momento 1, cuando resultó con una proporción de positivos significativamente 3 menor. En la comparación del grupo control con el experimental estos no resultaron diferentes en el primer momento de la toma de muestra, pero en el segundo y tercer momento de la toma de muestra el grupo experimental mostró una mayor proporción de muestras positivas por las tres tinciones en comparación con el grupo control, siendo estas diferencias significativas en el caso de las tinciones H-E y Masson al segundo mes y en las de H-E y Von Kossa al tercer mes. (Tabla 11)

**TABLA 11 PRUEBA EXACTA DE FISHER PARA DIFERENCIAS EN LAS PROPORCIONES DE MUESTRAS POSITIVAS POR TINCIÓN**

Momento de toma de muestra	Tinción Histológica	Referente de normalidad vs Control			Referente de normalidad vs Experimental			Experimental vs Referente de normalidad		
		% positivos			% positivos			% positivos		
		Control	Referente de normalidad	P exacta	Experimental	Referente de normalidad	P exacta	Control	Experimental	P exacta
1 mes	H-E	20%	100%	0.047	60%	100%	0.444	20%	60%	0.523
	Massón	20%	60%	0.518	80%	60%	1.000	20%	80%	0.206
	Von Kossa	0%	100%	0.007	20%	100%	0.047	0%	20%	1.000
2 meses	H-E	0%	100%	0.007	80%	100%	1.000	0%	80%	0.047
	Massón	20%	60%	0.523	100%	60%	0.444	20%	100%	0.047
	Von Kossa	0%	100%	0.007	60%	100%	0.444	0%	60%	0.166
3 meses	H-E	20%	100%	0.047	100%	100%	-	20%	100%	0.047
	Massón	20%	60%	0.523	80%	60%	1.000	20%	80%	0.206
	Von Kossa	0%	100%	0.007	80%	100%	1.000	0%	80%	0.047

Debido a que hubo amplia significancia de las pruebas de normalidad en las inmunohistoquímicas procedimos a realizar un análisis Bivariado con una prueba U Mann-Whitney para determinar si había diferencias en los valores de las muestras de inmunohistoquímica en los diferentes momentos de la toma de muestra, obteniendo los siguientes datos:

En el caso de la prueba U Mann-Whitney para las inmunohistoquímicas en los grupos experimental y control en el mes 1 encontramos diferencias significativas entre estos grupos en la Fosfatasa alcalina, Colágena I y Runx2  $p=0.015$  en los tres casos, para Osteopontina el valor fue  $p=0.007$ (Tabla 12)

**TABLA 12 PRUEBA U DE MANN WHITNEY PARA LAS INMUNOHISTOQUIMICAS EN LAS MUESTRAS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTAL Y CONTROL EN EL MES 1.**

U DE MANN WHITNEY							
INMUNOHISTOQUIMICA	Grupo de Estudio	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]
Inmunohistoquímica para fosfatasa alcalina	Control	5	3.2	16	-2.545	0.010	0.015
	Experimental	5	7.8	39			
Inmunohistoquímica para colágena 1	Control	5	3.2	16	-2.545	0.010	0.015
	Experimental	5	7.8	39			
Inmunohistoquímica para Osteocalcina	Control	5	3.6	18	-2.154	0.031	0.055
	Experimental	5	7.4	37			
Inmunohistoquímica para Osteopontina	Control	5	3	15	-2.738	0.006	0.007
	Experimental	5	8	40			
Inmunohistoquímica para Runx2	Control	4	2.5	10	-2.683	0.007	0.015
	Experimental	5	7	35			
a Momento de la toma de muestra = 1 mes							

Cuando analizamos estas mismas inmunohistoquímicas en los grupos experimental y control en el mes 2 encontramos diferencias significativas entre estos grupos en la Fosfatasa alcalina, Osteocalcina y Osteopontina todas con una  $p=0.007$ , para Colágena I el valor de  $p=0.015$  y para Runx2  $p=0.031$  (Tabla 13)

**TABLA 13 PRUEBA U DE MANN WHITNEY PARA LAS INMUNOHISTOQUIMICAS EN LAS MUESTRAS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTAL Y CONTROL EN EL MES 2.**

U DE MANN WHITNEY								
INMUNOHISTOQUIMICA	Grupo de Estudio	Mean Rank	Sum of Ranks	U Mann-Whitney	W Wilcoxon	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]
Inmunohistoquímica para fosfatasa alcalina	Control	3.1	15.5	0.5	15.5	-2.629	0.008	0.007
	Experimental	7.9	39.5					

Inmunohistoquímica para colágena 1	Control	3.2	16	1	16	-	2.545	0.010	0.015
	Experimental	7.8	39						
Inmunohistoquímica para Osteocalcina	Control	3.1	15.5	0.5	15.5	-	2.683	0.007	0.007
	Experimental	7.9	39.5						
Inmunohistoquímica para Osteopontina	Control	3	15	0	15	-	2.738	0.006	0.007
	Experimental	8	40						
Inmunohistoquímica para Runx2	Control	2.875	11.5	1.5	11.5	-	2.225	0.026	0.031
	Experimental	6.7	33.5						

a Momento de la toma de muestra = 2 meses

Finalmente en el mes 3 pudimos observar que sí hubo diferencias significativas entre los grupos de las inmunohistoquímicas (controles y experimentales siguiendo el mismo patrón que en el segundo mes Fosfatasa alcalina, Osteocalcina y Osteopontina todas con una  $p=0.007$ , para Colágena I el valor de  $p=0.015$  excepto en la Inmunohistoquímica para Runx2 ya que el valor de  $p=0.095$ . (Tabla 14)

**TABLA 14 PRUEBA U DE MANN WHITNEY PARA LAS INMUNOHISTOQUIMICAS EN LAS MUESTRAS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTAL Y CONTROL EN EL MES 3.**

U DE MANN WHITNEY									
INMUNOHISTOQUIMICA	Grupo de Estudio	Mean Rank	Sum of Ranks	U Mann Whitney	W Wilcoxon	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	
Inmunohistoquímica para fosfatasa alcalina	Control	3	15	0	15	-	2.738	0.006	0.007
	Experimental	8	40						
Inmunohistoquímica para colágena 1	Control	3.2	16	1	16	-	2.494	0.012	0.015
	Experimental	7.8	39						
Inmunohistoquímica para Osteocalcina	Control	3	15	0	15	-	2.729	0.006	0.007
	Experimental	8	40						
Inmunohistoquímica para Osteopontina	Control	3	15	0	15	-	2.738	0.006	0.007
	Experimental	8	40						
Inmunohistoquímica para Runx2	Control	3.8	19	4	19	-	2.031	0.042	0.095
	Experimental	7.2	36						

a Momento de la toma de muestra = 3 meses

Se realizó una regresión lineal múltiple para ajustar el valor del porcentaje de los minerales por los efectos del grupo de tratamiento y el momento de la toma de la muestra para cada uno de los mismos:

En el caso del Carbono la significancia del modelo fue  $p < 0.001$ , al igual que la significancia del grupo de estudio con un valor de  $p = 0.0005$ , cuando la significancia estaba en relación al tiempo del estudio el valor de  $p = 0.012$ . Cuando se llevó a cabo la interacción entre estos la significancia entonces fue de 0.08. (Tabla 15)

**TABLA 15 REGRESION LINEAL MULTIPLE.  
PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:  
CARBONO**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Carbono						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial
<b>Modelo corregido</b>	3311.864 <sup>a</sup>	6	551.98	16.02	0.0000	0.774
<b>Intersección</b>	135576.456	1	135,576.46	3,934.70	0.0000	0.992
<b>Grupo</b>	528.383	1	528.38	15.33	0.0005	0.353
<b>Tiempo</b>	354.244	2	177.12	5.14	0.0125	0.268
<b>Grupo * Tiempo</b>	192.369	2	96.18	2.79	0.08	0.17
<b>Error</b>	964.784	28	34.456			
<b>Total</b>	163925.979	35				
<b>Total corregida</b>	4276.649	34				

a. R cuadrado = .774 (R cuadrado corregida = .726)

Al buscar las diferencias entre cada uno de los grupos encontramos que la diferencia del porcentaje entre el grupo 0 y 1 fue de 24.45, al comparar el grupo 0 y 2 la diferencia fue de 18.958 y cuando comparamos las diferencias entre el porcentaje entre el tiempo 0 y 1 entonces el valor fue de 6.464, de otro modo cuando comparamos el tiempo 0 y 2 se reportó como -7.391 y la diferencia entre el grupo 0 y 3 en el tiempo también fue de 0. (Tabla 16)



**TABLA 16 REGRESION LINEAL MULTIPLE.  
ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:  
CARBONO**

Estimaciones de los parámetros									
Variable dependiente: Carbono									
Parámetro	B	Error típ.	T	Sig.	Intervalo de confianza 95%			Eta al cuadrado parcial	
					Límite inf.	Límite sup.			
Intersección	66.914	2.625	25.490	0.000	61.537	72.292	0.959		
[Grupo=0]	-18.958	3.712	-5.107	0.000	-26.563	-11.354	0.482	47.956	0.000
[Grupo=1]	5.496	3.712	1.480	0.149	-2.109	13.100	0.073	72.41	0.000
[Grupo=2]	0.000	.	.	.	.	.	.	66.914	0
[Tiempo=0]	0.000	.	.	.	.	.	.		
[Tiempo=1]	6.464	3.712	1.741	0.0926	-1.141	14.068	0.098		
[Tiempo=2]	-7.391	3.712	-1.991	0.0563	-14.996	0.214	0.124		
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.		
[Grupo=0] * [Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.		
[Grupo=1] * [Tiempo=1]	-1.325	5.250	-0.252	0.802	-12.080	9.428	0.002		
[Grupo=1] * [Tiempo=2]	10.019	5.250	1.91	0.07	- 0.735	20.773	0.115		

a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

Para el Carbono la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p= 0.0056$ , debido a su significancia hay desviación del supuesto por lo que la prueba no es valorable (Tabla 17)

**TABLA 17 REGRESION LINEAL MULTIPLE  
CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:  
CARBONO**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error			
Variable dependiente: Carbono			
F	gl1	gl2	Sig.
3.92694412	6	28	0.00568645
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección + Grupo + Tiempo + Grupo * Tiempo			

Cuando llevamos a cabo este modelo de regresión lineal múltiple para el Oxígeno, observamos que la significancia del modelo dio un valor de  $p= 0.0129$ , cuando valoramos la significancia por grupo de estudio encontramos que la  $p = 0.0002$ , y la

significancia por tiempo de estudio fue de  $p = 0.8088$ . Y la significancia de la interacción entre grupo y tiempo la significancia se reportó en  $p = 0.94$  (Tabla 18)

**TABLA 18 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**OXIGENO**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Oxigeno						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial
Modelo corregido		6	33.00	3.35	0.0129	0.4179
Intersección	8937.458	1	8,937.46	907.31	0.000	0.9701
Grupo	174.303	1	174.30	17.69	0.0002	0.3872
Tiempo	4.213	2	2.11	0.21	0.8088	0.0150
Grupo * Tiempo	1.245	2	0.62	0.06	0.94	0.00
Error	275.813	28	9.850			
Total	9992.205	35				
Total corregida	473.829	34				

En el caso del oxígeno en cuanto a los grupos encontramos que la diferencia del porcentaje entre el grupo 0 y 1 fue de 0.822, para esta misma diferencia entre el grupo 0 y 2 el valor fue de -4.442, en los distintos momentos de toma de muestra el reporte fue que la diferencia del porcentaje entre el tiempo 0 y 1 fue de 0.514, pero cuando esta misma diferencia fue comparada entre el grupo 0 y 2 entonces este valor fue negativo de 0.611, también el valor fue cero entre el tiempo 0 y 3 (Tabla 19)

**TABLA 19 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**OXIGENO**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente: Oxigeno							
Parámetro	B	Error típ.	t	Sig.	Intervalo de confianza 95%		Eta al cuadrado parcial
					Límite inf.	Límite sup.	
Intersección	13.818	1.404	9.845	0.000	10.943	16.694	0.776
[Grupo=0]	4.442	1.985	2.238	0.033	0.376	8.508	0.152

[Grupo=1]	5.264	1.985	2.652	0.013	1.198	9.330	0.201	
[Grupo=2]	0.000	.	.	.	.	.	.	
[Tiempo=0]	0.000	.	.	.	.	.	.	
[Tiempo=1]	0.514	1.985	0.259	0.797	-3.552	4.580	0.002	
[Tiempo=2]	-0.611	1.985	-0.308	0.760	-4.678	3.455	0.003	
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.	
[Grupo=0] *								
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.	
[Grupo=1] *								
[Tiempo=1]	-0.983	2.807	-0.350	0.728	-6.733	4.766	0.004	
[Grupo=1] *								
[Tiempo=2]	-0.344	2.807	0.12	0.90	6.095	5.405	0.000	
a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.								

Para el Oxígeno la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p= 0.0099$ , debido a su significancia hay desviación del supuesto por lo que la prueba no es valorable (Tabla 20)

**TABLA 20 REGRESION LINEAL MULTIPLE  
CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:  
OXIGENO**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error			
Variable dependiente: Oxigeno			
F	gl1	gl2	Sig.
3.53287252	6	28	0.00992408
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección + Grupo + Tiempo + Grupo * Tiempo			

Cuando llevamos a cabo ese mismo modelo de regresión lineal múltiple para valorar el sodio observamos que la significancia del modelo fue de  $p<0.001$ , al buscar la significancia de acuerdo al grupo de estudio encontramos que el valor de  $p= 0.568$ , pero cuando la significancia estaba relacionada al momento de la toma de muestra el valor de  $p<0.001$  al igual que la significancia de la interacción entre grupo de estudio y tiempo de la toma de muestra fue  $p<0.001$  (Tabla 21)

**TABLA 21 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**SODIO**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Sodio						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial
<b>Modelo corregido</b>		6	0.39	35.35	0.000	0.883
<b>Intersección</b>	8.177	1	8.18	735.47	0.000	0.963
<b>Grupo</b>	0.003	1	0.00	0.33	0.568	0.011
<b>Tiempo</b>	0.483	2	0.24	21.74	0.000	0.608
<b>Grupo * Tiempo</b>	1.159	2	0.58	52.16	0.000	0.79
<b>Error</b>	0.311	28	0.011			
<b>Total</b>	13.224	35				
<b>Total corregida</b>	2.669	34				

En el modelo también obtuvimos el valor de la diferencia de los porcentajes de sodio inicialmente entre grupos y posteriormente entre el momento de la toma de muestra y los resultados reportados fueron los siguientes: La diferencia porcentual entre el grupo 0 y 1 fue de 0.742, esa misma diferencia al comparar grupo 0 y 2 fue de 0.357. Cuando se trató de las diferencias porcentuales entre los tiempos, ésta al comparar tiempo 0 y 1 fue de 0.351, pero al contrastar el tiempo 0 y 2 observamos un valor negativo de 0.167, pero la diferencia entre el tiempo 0 y 3 también fue 0 (Tabla 22)

**TABLA 22 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**SODIO**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente: Sodio							
Parámetro	B	Error típ.	t	Sig.	Intervalo de confianza 95%		Eta al cuadrado parcial
					Límite inf.	Límite sup.	
<b>Intersección</b>	0.557	0.047	11.818	0.0000	0.461	0.654	0.833
<b>[Grupo=0]</b>	-0.357	0.067	-5.358	0.0000	-0.494	-0.221	0.506
<b>[Grupo=1]</b>	0.385	0.067	5.769	0.0000	0.248	0.521	0.543

[Grupo=2]	0.000	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=0]	0.000	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=1]	0.351	0.067	5.259	0.0000	0.214	0.487	0.497
[Tiempo=2]	-0.167	0.067	-2.507	0.0183	-0.304	-0.031	0.183
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=0] *							
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=1] *							
[Tiempo=1]	-0.938	0.094	-9.953	1.067	-1.131	-0.745	0.779
[Grupo=1] *							
[Tiempo=2]	-0.282	0.094	2.99	0.01	0.4753	0.088	0.242
[Grupo=1] *							
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.

a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

Para el Sodio la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p=0.0378$ , debido a su significancia hay desviación del supuesto por lo que la prueba no es valorable (Tabla 23)

**TABLA 23 REGRESION LINEAL MULTIPLE  
CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:  
SODIO**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error			
Variable dependiente: Sodio			
F	gl1	gl2	Sig.
2.62915803	6	28	0.0378
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección + Grupo + Tiempo + Grupo * Tiempo			

Siguiendo el mismo modelo, observamos que la significancia del mismo al medir el Magnesio es de  $p=0.008$ , cuando hablamos del grupo de estudio  $p=0.411$  y en cuanto a la significancia del tiempo de la toma de muestra el valor de  $p=0.005$ . Al llevarse a cabo la interacción de estos dos últimos parámetros el resultado de la significancia es  $p=0.43$ . (Tabla 24).

**TABLA 24 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**MAGNESIO**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente Magnesio						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial
<b>Modelo corregido</b>		6	0.01	3.62	0.008	0.436
<b>Intersección</b>	0.454	1	0.45	127.39	0.000	0.819
<b>Grupo</b>	0.002	1	0.00	0.69	0.411	0.024
<b>Tiempo</b>	0.045	2	0.02	6.32	0.005	0.310
<b>Grupo * Tiempo</b>	0.006	2	0.00	0.88	0.43	0.06
<b>Error</b>	0.099	28	0.003			
<b>Total</b>	0.610	35				
<b>Total corregida</b>	0.177	34				

Al correr el modelo nos encontramos que la diferencia del porcentaje de Magnesio entre el grupo 0 y 1 fue de -0.19, al medir esta misma diferencia pero entre el grupo 0 y 2 esta es de -0.031, al medir esa misma diferencia pero en cuanto al tiempo de estudio si contrastamos tiempo 0 y 1 obtenemos un valor de -0.84, si contrastamos el tiempo 0 y 2 esta diferencia es de -0.018. Para la diferencia entre el tiempo 0 y 3 el valor fue de 0 (Tabla 25)

**TABLA 25 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**MAGNESIO**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente Magnesio							
Parámetro	B	Error típ.	T	Sig.	Intervalo de confianza 95%		Eta al cuadrado parcial
					Límite inf.	Límite sup.	
<b>Intersección</b>	0.144	0.027	5.373	0.0000	0.089	0.198	0.508
<b>[Grupo=0]</b>	0.031	0.038	0.828	0.4149	-0.046	0.109	0.024
<b>[Grupo=1]</b>	0.012	0.038	0.330	0.7438	-0.065	0.090	0.004

[Grupo=2]	0.000	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=0]	0.000	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=1]	0.084	0.038	-2.211	0.0354	-0.161	-0.006	0.149
[Tiempo=2]	0.018	0.038	-0.472	0.6403	-0.095	0.060	0.008
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=0] *							
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=1] *	-						
[Tiempo=1]	0.022	0.053	-0.420	0.677	-0.131	0.086	0.006
[Grupo=1] *	-						
[Tiempo=2]	0.069	0.053	1.30	0.20	-0.178	0.0400	0.056

a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

Para el Magnesio la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p=0.0338$ , debido a su significancia hay desviación del supuesto por lo que la prueba no es valorable (Tabla 26)

**TABLA 26 REGRESION LINEAL MULTIPLE  
CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:  
MAGNESIO**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error.			
Variable dependiente Magnesio			
F	gl1	gl2	Sig.
2.70107011	6	28	0.03386318
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección + Grupo + Tiempo + Grupo * Tiempo			

Al igual que con el resto de los minerales, hicimos un modelo de regresión lineal múltiple para el Fosfato y observamos una gran significancia del mismo con una  $p<0.001$ , la significancia cuando hablamos del grupo de estudio también tiene una  $p<0.001$ , y con respecto al tiempo también es muy significativo con una  $p=0.0098$ . El valor de la interacción de estos dos parámetros (Grupo vs Tiempo) tiene una  $p=0.17$  (Tabla 27)

**TABLA 27 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**FOSFATO**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Fosfato						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial
<b>Modelo corregido</b>		6	65.45	16.15	0.000	0.775
<b>Intersección</b>	1011.154	1	1,011.15	249.56	0.000	0.899
<b>Grupo</b>	123.937	1	123.94	30.59	0.000	0.522
<b>Tiempo</b>	44.454	2	22.23	5.49	0.0098	0.281
<b>Grupo * Tiempo</b>	15.505	2	7.75	1.91	0.17	0.12
<b>Error</b>	113.447	28	4.051			
<b>Total</b>	1337.391	35				
<b>Total corregida</b>	506.126	34				

Si tomamos en cuenta las diferencias del porcentaje del Fosfato al buscar ésta entre el grupo 0 y 1 el valor obtenido es de -8.278, si comparamos el grupo 0 y el 2 la diferencia tiene un valor expresado como negativo 4.667, pero también es importante para nuestro modelo conocer esa diferencia en el porcentaje del mismo mineral con respecto al tiempo y cuando comparamos el tiempo 0 con el 1 el valor es negativo 2.689, y al comparar el tiempo 0 con el 2 este valor se modifica a 1.878. La diferencia siempre fue 0 al comparar el tiempo 0 vs el 3 (Tabla 28)

**TABLA 28 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**FOSFATO**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente: Fosfato							
Parámetro	B	Error típ.	t	Sig.	Intervalo de confianza 95%		Eta al cuadrado parcial
					Límite inferior	Límite sup.	
<b>Intersección</b>	6.179	0.900	6.864	0.000	4.335	8.023	0.627
<b>[Grupo=0]</b>	4.677	1.273	3.674	0.001	2.069	7.284	0.325
<b>[Grupo=1]</b>	-3.601	1.273	-2.829	0.008	-6.209	-0.994	0.222



[Grupo=2]	0.000	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=0]	0.000	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=1]	-2.689	1.273	-2.112	0.043	-5.297	-0.081	0.137
[Tiempo=2]	1.878	1.273	1.475	0.151	-0.730	4.485	0.072
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=0] *							
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=1] *							
[Tiempo=1]	1.018	1.800	0.565	0.575	-2.669	4.706	0.0113
[Grupo=1] *							
[Tiempo=2]	-2.410	1.800	1.34	0.19	6.098	1.277	0.060

a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

Para el Fosfato la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p=0.1519$ , debido a su significancia no hay desviación del supuesto por lo que la prueba si es valorable (Tabla 29)

**TABLA 29 REGRESION LINEAL MULTIPLE  
CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:  
FOSFATO**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error			
Variable dependiente: Fosfato			
F	gl1	gl2	Sig.
1.72561131	6	28	0.15185419
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección + Grupo + Tiempo + Grupo * Tiempo			

Una vez más hacemos un modelo de regresión lineal múltiple pero en este caso para ajustar el valor del porcentaje de Azufre de acuerdo a sus efectos por grupo y momento de la toma de la muestra y la significancia del modelo para Azufre es  $p<0.001$ , del mismo modo la significancia hablando del grupo de estudio también es  $p<0.001$ , cuando buscamos la significancia del modelo con respecto al tiempo el valor de  $p=0.0005$ , la significancia de la interacción grupo tiempo es  $p<0.001$ . (Tabla 30)

**TABLA 30 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**AZUFRE**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Azufre						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial
<b>Modelo corregido</b>		6	0.40	21.29	0.000	0.820
<b>Intersección</b>	13.463	1	13.46	720.77	0.000	0.962
<b>Grupo</b>	0.875	1	0.88	46.84	0.000	0.625
<b>Tiempo</b>	0.373	2	0.19	10.00	0.0005	0.416
<b>Grupo * Tiempo</b>	0.631	2	0.32	16.91	0.00	0.55
<b>Error</b>	0.523	28	0.018			
<b>Total</b>	19.353	35				
<b>Total corregida</b>	2.909	34				

Siendo más específicos también se midió la diferencia del porcentaje pero con respecto al contraste de un grupo vs otro y también con respecto a los diferentes momentos del estudio. La diferencia del porcentaje de azufre entre el grupo 0 y 1 fue de 0.859, esta misma diferencia pero en el tiempo 0 contra 2 se obtuvo un valor negativo de 0.013. De la misma forma que los demás minerales analizados hasta ahora, la diferencia entre el tiempo 0 y 3 el valor fue 0 (Tabla 31)

**TABLA 31 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**AZUFRE**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente: Azufre							
Parámetro	B	Error típ.	t	Sig.	Intervalo de confianza 95%		Eta al cuadrado parcial
					Límite inf.	Límite sup.	
<b>Intersección</b>	0.509	0.061	8.328	0.000	0.384	0.634	0.712
<b>[Grupo=0]</b>	0.118	0.086	-1.365	0.183	-0.295	0.059	0.062
<b>[Grupo=1]</b>	0.741	0.086	8.572	0.000	0.564	0.918	0.724
<b>[Grupo=2]</b>	0.000	.	.	.	.	.	.
<b>[Tiempo=0]</b>	0.000	.	.	.	.	.	.

[Tiempo=1]	0.177	0.086	2.047	0.050	0.000	0.354	0.130
[Tiempo=2]	0.013	0.086	-0.149	0.883	-0.190	0.164	0.001
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=0] *							
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=1] *	-						
[Tiempo=1]	0.680	0.122	-5.570	5.844	-0.931	-0.430	0.525
[Grupo=1] *	-						
[Tiempo=2]	0.517	0.122	4.23	0.00	0.7677	- 0.2669	0.390
a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.							

Para el Azufre la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p= 0.1778$ , debido a su significancia no hay desviación del supuesto por lo que la prueba si es valorable (Tabla 32)

**TABLA 32 REGRESION LINEAL MULTIPLE  
CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:  
AZUFRE**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error			
Variable dependiente: Azufre			
F	gl1	gl2	Sig.
1.62285346	6	28	0.17783501
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección + Grupo + Tiempo + Grupo * Tiempo			

En el caso del Calcio la significancia del modelo fue  $p<0.001$ , al igual que la significancia del grupo de estudio con un valor de  $p<0.001$ , cuando la significancia estaba en relación al tiempo del estudio el valor de  $p= 0.019$  Cuando se llevó a cabo la interacción entre estos la significancia entonces fue de 0.1862. (Tabla 33)

**TABLA 33 REGRESION LINEAL MULTIPLE.  
PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:  
CALCIO**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Calcio						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial
Modelo corregido		6	289.28	19.06	0.000	0.803
Intersección	3613.290	1	3,613.29	238.10	0.000	0.894
Grupo	538.764	1	538.76	35.50	0.000	0.559
Tiempo	138.977	2	69.49	4.58	0.019	0.246
Grupo * Tiempo	54.199	2	27.10	1.79	0.1862	0.11
Error	424.919	28	15.175			
Total	4987.082	35				
Total corregida	2160.599	34				

Cuando estudiamos el porcentaje de calcio para los grupos encontramos que la diferencia entre el grupo 0 y 1 fue de -18.924, para esta misma diferencia entre el grupo 0 y 2 el valor fue de -10.521, en los distintos momentos de toma de muestra el reporte fue que la diferencia del porcentaje entre el tiempo 0 y 1 fue de -5.051, pero cuando esta misma diferencia fue comparada entre el grupo 0 y 2 entonces este valor fue positivo 3.416, tampoco encontramos diferencia entre el tiempo 0 y el 3 (Tabla 34)

**TABLA 34 REGRESION LINEAL MULTIPLE.  
ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:  
CALCIO**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente: Calcio							
Parámetro	B	Error típ.	t	Sig.	Intervalo de confianza 95%		Eta al cuadrado parcial
					Límite inf.	Límite sup.	
Intersección	11.583	1.742	6.649	0.000	8.014	15.152	0.612
[Grupo=0]	10.521	2.464	4.270	0.000	5.474	15.568	0.394

[Grupo=1]	-8.403	2.464	-3.411	0.002	-13.450	-3.356	0.294
[Grupo=2]	0.000	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=0]	0.000	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=1]	-5.051	2.464	-2.050	0.049	-10.098	-0.004	0.131
[Tiempo=2]	3.416	2.464	1.386	0.176	-1.631	8.463	0.064
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=0] *							
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=1] *							
[Tiempo=1]	3.183	3.484	0.913	0.368	-3.954	10.320	0.028
[Grupo=1] *							
[Tiempo=2]	-3.400	3.484	0.98	0.34	10.5378	3.7368	0.032

a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

Para el Calcio la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p=0.1001$ , debido a su significancia no hay desviación del supuesto por lo que la prueba si es valorable (Tabla 35)

**TABLA 35 REGRESION LINEAL MULTIPLE**  
**CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**CALCIO**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error			
Variable dependiente: Calcio			
F	gl1	gl2	Sig.
1.99521641	6	28	0.10009823
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección + Grupo + Tiempo + Grupo * Tiempo			

Si siguiendo el mismo modelo, observamos que la significancia del éste al medir el Hierro es de  $p=0.019$ , cuando hablamos del grupo de estudio  $p=0.0035$  y en cuanto a la significancia del tiempo de la toma de muestra el valor de  $p=0.0487$ . Al llevarse a cabo la interacción de estos dos últimos parámetros el resultado de la significancia es  $p=0.0110$ . (Tabla 36)

**TABLA 36 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**HIERRO**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Hierro						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial
<b>Modelo corregido</b>		6	0.05	4.73	0.001	0.503
<b>Intersección</b>	1.619	1	1.62	159.00	0.000	0.850
<b>Grupo</b>	0.103	1	0.10	10.20	0.003	0.267
<b>Tiempo</b>	0.068	2	0.03	3.37	0.048	0.194
<b>Grupo * Tiempo</b>	0.108	2	0.05	5.33	0.01	0.28
<b>Error</b>	0.285	28	0.010			
<b>Total</b>	2.274	35				
<b>Total corregida</b>	0.574	34				

Al correr el modelo para el Hierro nos encontramos que la diferencia del porcentaje entre el grupo 0 y 1 fue de -0.015, al medir ésta pero entre el grupo 0 y 2 su valor es de -0.107, al medir la misma diferencia pero en cuanto al tiempo de estudio si contrastamos tiempo 0 y 1 obtenemos un valor de -0.008, por lo tanto si contrastamos el tiempo 0 y 2 esta diferencia es de 0.025, tampoco encontramos diferencia entre el tiempo 0 y 3. (Tabla 37)

**TABLA 37 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**HIERRO**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente: Hierro							
Parámetro	B	Error típ.	t	Sig.	Intervalo de confianza 95%		Eta al cuadrado parcial
					Límite inf.	Límite sup.	
Intersección	0.150	0.045	3.314	0.0026	0.057	0.242	0.282
[Grupo=0]	0.107	0.064	1.680	0.1040	-0.023	0.238	0.092
[Grupo=1]	0.092	0.064	1.448	0.1586	-0.038	0.223	0.070

[Grupo=2]	0.000	.	.	.	.	.	.	
[Tiempo=0]	0.000	.	.	.	.	.	.	
[Tiempo=1]	0.008	0.064	-0.118	0.9067	-0.138	0.123	0.000	
[Tiempo=2]	0.025	0.064	0.398	0.6938	-0.105	0.156	0.006	
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.	
[Grupo=0] *								
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.	
[Grupo=1] *	0.183	0.0902	2.0334	0.0515			0.128670	
[Tiempo=1]	55	6667	1938	86635	-0.0013529	0.3684529	32	
[Grupo=1] *								
[Tiempo=2]	79	6667	1.19	0.24	- 0.2927	0.0771	0.048458 69	
a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.								

Para el Hierro la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p= 0.0007$ , debido a su significancia hay desviación del supuesto por lo que la prueba no es valorable (Tabla 38)

**TABLA 38 REGRESION LINEAL MULTIPLE  
CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:  
HIERRO**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error			
Variable dependiente: Hierro			
F	gl1	gl2	Sig.
5.51087565	6	28	0.00071485
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección + Grupo + Tiempo + Grupo * Tiempo			

En el último mineral estudiado al realizar la regresión lineal múltiple observamos una significancia en el modelo de  $p= 0.0740$ , al medir la significancia de acuerdo al grupo de estudio la  $p= 0.1506$ , cuando medimos esta misma pero tratándose de el tiempo del estudio la  $p= 0.1579$ , y al medir la interacción grupo-tiempo el valor de  $p=0.0848$  (Tabla 39)

**TABLA 39 REGRESION LINEAL MULTIPLE.  
PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:  
ZINC**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Zinc						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial
Modelo corregido		6	0.01	2.19	0.074	0.319
Intersección	0.437	1	0.44	109.42	0.000	0.796
Grupo	0.008	1	0.01	2.18	0.150	0.072
Tiempo	0.015	2	0.01	1.97	0.157	0.123
Grupo * Tiempo	0.0215	2	0.01	2.70	0.0848	0.16
Error	0.111	28	0.003			
Total	0.609	35				
Total corregida	0.164	34				

En este modelo para el Zinc nos encontramos que la diferencia del porcentaje entre el grupo 0 y 1 fue de 0.010, al medir ésta pero entre el grupo 0 y 2 su valor es de -0.030, al medir la misma diferencia pero en cuanto al tiempo de estudio si contrastamos tiempo 0 y 1 obtenemos un valor de 0.032, por lo tanto si contrastamos el tiempo 0 y 2 esta diferencia es de -0.007, tampoco encontramos diferencia entre el tiempo 0 y 3. (Tabla 40)

**TABLA 40 REGRESION LINEAL MULTIPLE.  
ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE: ZINC**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente: Zinc							
Parámetro	B	Error típ.	T	Sig.	Intervalo de confianza 95%		Eta al cuadrado parcial
					Límite inf.	Límite sup.	
Intersección	0.116	0.028	4.093	0.000	0.058	0.174	0.374
[Grupo=0]	0.030	0.040	0.758	0.454	-0.052	0.112	0.020
[Grupo=1]	0.040	0.040	1.008	0.322	-0.042	0.122	0.035



[Grupo=2]	0.000	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=0]	0.000	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=1]	0.032	0.040	0.808	0.426	-0.050	0.114	0.023
[Tiempo=2]	-0.007	0.040	-0.166	0.869	-0.089	0.075	0.001
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=0] *							
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=1] *							
[Tiempo=1]	-0.124	0.056	-2.198	0.036	-0.240	-0.008	0.147
[Grupo=1] *							
[Tiempo=2]	-0.098	0.056	1.75	0.09	0.214	0.0169	0.098

a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

Para el Zinc la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p=0.0505$ , debido a su significancia no hay desviación del supuesto por lo que la prueba si es valorable (Tabla 41)

**TABLA 41 REGRESION LINEAL MULTIPLE**  
**CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**ZINC**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error			
Variable dependiente: Zinc			
F	gl1	gl2	Sig.
2.43903672	6	28	0.05047904
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección + Grupo + Tiempo + Grupo * Tiempo			

Decidimos hacer un análisis multivariado para las tinciones y procedimos a hacer una regresión logística binaria ya que el tipo de variables (dicotómicas) pueden ser analizados de esta forma, al analizar estos resultados en la prueba de Bondad y Ajuste de Hosmer y Lemeshow para la tinción de hematoxilina y eosina resultó no significativa con un valor de  $p=0.872$  lo que nos habla de que en efecto este modelo se ajusta adecuadamente a las variables que estamos modelando (Tabla42)

**TABLA 42 REGRESION LOGISTICA BINARIA PRUEBA DE BONDAD Y AJUSTE DE HOSMER Y LEMESHOW PARA LA TINCION HEMATOXILINA-EOSINA**

Prueba de Hosmer y Lemeshow			
TINCION DE HEMATOXILINA-EOSINA			
Paso	Chi-cuadrado	Gl	Sig.
1	0.706	3	0.872

Cuando analizamos las variables de la ecuación para esta misma tinción encontramos que de acuerdo a este modelo de regresión logística binaria estos valores no son significativos debido a que en el 99% de los casos hablando del estudio por grupos están relacionados con el azar y de esta misma forma, para los diferentes momentos de la toma de muestra el 24% de los casos está también explicado por el azar. (Tabla43)

**TABLA 43 REGRESION LOGISTICA BINARIA VARIABLES DE LA ECUACION PARA TINCION HEMATOXILINA-EOSINA**

Variables en la ecuación									
TINCION DE HEMATOXILINA-EOSINA									
Paso	Grupo	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95.0% para EXP(B)	
								Inferior	Superior
1(a)	Grupo			9.436	2	0.009			
	Grupo(1)	-22.214	17,974.840	0.000	1	0.999	0.000	0.000	.
	Grupo(2)	-18.564	17,974.840	0.000	1	0.999	0.000	0.000	.
	Tiempo			1.718	2	0.424			
	Tiempo(1)	-1.627	1.389	1.373	1	0.241	0.196	0.013	2.990
	Tiempo(2)	-1.627	1.389	1.373	1	0.241	0.196	0.013	2.990
	Constante		21.203	17,974.840	0.000	1	0.999	1,615,474,667.798	

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: Grupo, Tiempo.

Cuando analizamos la tinción de Massón la prueba de Bondad y Ajuste de Hosmer y Lemeshow también fue no significativa con un valor de  $p= 0.831$  lo que nos habla de que este modelo se ajusta adecuadamente a las variables que estamos modelando (Tabla 44)

**TABLA 44 REGRESION LOGISTICA BINARIA PRUEBA DE BONDAD Y AJUSTE DE HOSMER Y LEMESHOW PARA LA TINCION TRICROMICO DE MASSON**

Prueba de Hosmer y Lemeshow			
-----------------------------	--	--	--

Paso	Chi-cuadrado	Gl	Sig.
1	0.876	3	0.831

También para esta tinción analizamos las variables de la ecuación y de acuerdo a este modelo de regresión logística binaria estos valores no son significativos debido a que al analizar esta tinción en el grupo control los resultados estuvieron relacionado con el azar en 12.7% y en el grupo experimental el factor azar se encontró en el 35.3%, y al analizar esos mismos datos relacionados con el momento de la toma de la muestra intervino el azar en 100% y 55% de los casos en la toma de la muestra al primer y segundo mes respectivamente, usando el tiempo 0 de referencia (Tabla 45)

**TABLA 45 REGRESION LOGISTICA BINARIA VARIABLES DE LA ECUACION PARA TINCION TRICROMICO DE MASSON**

Variables en la ecuación									
		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95.0% para EXP(B)	
								Inferior	Superior
Paso 1(a)	Grupo			10.609	2	0.005			
	Grupo(1)	-2.074	1.359	2.328	1	0.127	0.126	0.009	1.804
	Grupo(2)	1.263	1.359	0.863	1	0.353	3.536	0.246	50.755
	Tiempo			0.474	2	0.789			
	Tiempo(1)	0.000	1.224	0.000	1	1.000	1.000	0.091	11.015
	Tiempo(2)	0.737	1.234	0.357	1	0.550	2.091	0.186	23.461
	Constante	0.405	0.913	0.197	1	0.657	1.500		

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: Grupo, Tiempo.

Finalmente para la tinción de Von Kossa la prueba de Bondad y Ajuste de Hosmer y Lemeshow fue no significativa con un valor de  $p= 1.00$  lo que nos habla de que este modelo se ajusta adecuadamente a las variables que estamos modelando (Tabla 46)

**TABLA 46 REGRESION LOGISTICA BINARIA PRUEBA DE BONDAD Y AJUSTE DE HOSMER Y LEMESHOW PARA LA TINCION VON KOSSA**

Prueba de Hosmer y Lemeshow			
Paso	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1	0.000	5	1.000

Sin embargo el azar también jugó un papel sumamente importante en esta tinción porque en el grupo control y experimental el factor azar intervino en el 99.8%, esta cifra disminuyó cuando se analiza cada momento de la toma de la muestra, cuando

la muestra se tomó al mes intervino el azar en los resultados en un 8%, y al segundo mes fue de 49.7% (Tabla 47)

**TABLA 47 REGRESION LOGISTICA BINARIA VARIABLES DE LA ECUACION PARA TINCION VON KOSSA**

		Variables en la ecuación						I.C. 95.0% para EXP(B)	
		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	Inferior	Superior
Paso 1(a)	Grupo			0.000	2	1.000			
	Grupo(1)	-41.547	20,451.790	0.000	1	0.998	0.000	0.000	.
	Grupo(2)	-19.817	17,974.845	0.000	1	0.999	0.000	0.000	.
	Tiempo			3.188	2	0.203			
	Tiempo(1)	-2.773	1.581	3.075	1	0.080	0.063	0.003	1.386
	Tiempo(2)	-0.981	1.443	0.462	1	0.497	0.375	0.022	6.348
	Constante	21.203	17,974.845	0.000	1	0.999	1,615,474,686.783		

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: Grupo, Tiempo.

Se realizó una regresión lineal múltiple para ajustar el valor de las inmunohistoquímicas por los efectos del grupo de tratamiento y el momento de la toma de la muestra para cada uno de los mismos:

En el caso del Fosfatasa alcalina la significancia del modelo fue  $p < 0.001$ , al igual que la significancia del grupo de estudio con un valor de  $p = 0.000$  cuando la significancia estaba en relación al tiempo del estudio el valor de  $p = 0.005$  Cuando se llevó a cabo la interacción entre estos la significancia entonces fue de 0.246 (Tabla 48)

**TABLA 48 REGRESION LINEAL MULTIPLE. PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE: FOSFATASA ALCALINA**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para fosfatasa alcalina						
Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Modelo corregido	28.571(a)	6	4.762	17.544	0.000	0.790
Intersección	48.020	1	48.020	176.916	0.000	0.863
Grupo	24.300	1	24.300	89.526	0.000	0.762
Tiempo	3.467	2	1.733	6.386	0.005	0.313
Grupo * Tiempo	0.800	2	0.400	1.474	0.246	0.095
Error	7.600	28	0.271			
Total	89.000	35				
Total corregida	36.171	34				

a. R cuadrado = .790 (R cuadrado corregida = .745)

Al buscar las diferencias entre cada uno de los grupos encontramos que la diferencia entre el grupo 0 y 1 fue de 3.80, al comparar el grupo 0 y 2 la diferencia fue de -1.60 y cuando comparamos las diferencias entre el tiempo 0 y 1 entonces el valor fue de -1.20, de otro modo cuando comparamos el tiempo 0 y 2 se reportó como -0.080 y la diferencia entre el grupo 0 y 3 en el tiempo también fue de 0. (Tabla 49)

**TABLA 49 REGRESION LINEAL MULTIPLE.  
ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:  
FOSFATASA ALCALINA**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para fosfatasa alcalina							
Parámetro	B	Error típ.	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%.		Eta al cuadrado parcial
					Límite inf.	Límite sup.	
Intersección	2.800	0.233	12.018	0.000	2.323	3.277	0.838
[Grupo=0]	-1.600	0.330	-4.856	0.000	-2.275	-0.925	0.457
[Grupo=1]	-2.200	0.330	-6.677	0.000	-2.875	-1.525	0.614
[Grupo=2]	0	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=1]	-1.200	0.330	-3.642	0.001	-1.875	-0.525	0.321
[Tiempo=2]	-0.800	0.330	-2.428	0.022	-1.475	-0.125	0.174
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=0] * [Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=1] * [Tiempo=1]	0.800	0.466	1.717	0.097	-0.155	1.755	0.095
[Grupo=1] * [Tiempo=2]	0.400	0.466	0.858	0.398	-0.555	1.355	0.026

a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

Para Fosfatasa alcalina la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p=0.915$ , debido a su significancia hay desviación del supuesto por lo que la prueba no es valorable (Tabla 50)

**TABLA 50 REGRESION LINEAL MULTIPLE  
CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:  
FOSFATASA ALCALINA**

Significancia de la homogeneidad de varianzas del error			
Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error(a)			
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para fosfatasa alcalina			
F	gl1	gl2	Significación
0.331	6	28	0.915
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección+Grupo+Tiempo+Grupo * Tiempo			

Cuando llevamos a cabo este modelo de regresión lineal múltiple para Colágena I observamos que la significancia del modelo dio un valor de  $p < 0.001$  cuando valoramos la significancia por grupo de estudio encontramos que la  $p < 0.001$ , y la significancia por tiempo de estudio fue de  $p = 0.176$ . Y en la interacción entre grupo y tiempo la significancia se reportó en  $p = 0.428$  (Tabla 51)

**TABLA 51 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**COLAGENA I**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para colágena 1						
Fuente	Suma de cuadrados tipo III	GI	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Modelo corregido	22.000	6	3.667	10.694	0.000	0.696
Intersección	50.000	1	50.000	145.833	0.000	0.839
Grupo	19.200	1	19.200	56.000	0.000	0.667
Tiempo	1.267	2	0.633	1.847	0.176	0.117
Grupo * Tiempo	0.600	2	0.300	0.875	0.428	0.059
Error	9.600	28	0.343			
Total	82.000	35				
Total corregida	31.600	34				

a. R cuadrado = .696 (R cuadrado corregida = .631)

En el caso de Colágena I en cuanto a los grupos encontramos que la diferencia entre el grupo 0 y 1 fue de -2.80, para esta misma diferencia entre el grupo 0 y 2 el valor fue de -2.00, en los distintos momentos de toma de muestra el reporte fue que la diferencia entre el tiempo 0 y 1 fue de -0.60, pero cuando esta misma diferencia fue comparada entre el grupo 0 y 2 entonces este valor fue negativo de -0.80, también el valor fue cero entre el tiempo 0 y 3 (Tabla 52 )

**TABLA 52 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**COLAGENA I**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para colágena 1							
Parámetro	B	Error típ.	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%.		Eta al cuadrado parcial
					Límite inf.	Límite sup.	
Intersección	2.400	0.262	9.165	0.000	1.864	2.936	0.750
[Grupo=0]	-0.800	0.370	-2.160	0.039	-1.559	-0.041	0.143
[Grupo=1]	-2.000	0.370	-5.401	0.000	-2.759	-1.241	0.510

[Grupo=2]	0	.	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=1]	-0.600	0.370	-1.620	0.116	-1.359	0.159	0.086	
[Tiempo=2]	-0.800	0.370	-2.160	0.039	-1.559	-0.041	0.143	
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.	
[Grupo=0] *	0	.	.	.	.	.	.	
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.	
[Grupo=1] *	0.600	0.524	1.146	0.262	-0.473	1.673	0.045	
[Tiempo=1]	0.600	0.524	1.146	0.262	-0.473	1.673	0.045	
[Grupo=1] *	0.600	0.524	1.146	0.262	-0.473	1.673	0.045	
[Tiempo=2]	0.600	0.524	1.146	0.262	-0.473	1.673	0.045	

a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

Para la Colágena I la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p=0.129$ , debido a su significancia hay desviación del supuesto por lo que la prueba no es valorable (Tabla 53)

**TABLA 53 REGRESION LINEAL MULTIPLE  
CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:  
COLAGENA I**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error(a)			
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para colágena 1			
F	gl1	gl2	Significación
1.829	6	28	0.129
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección+Grupo+Tiempo+Grupo * Tiempo			

Quando llevamos a cabo ese mismo modelo de regresión lineal múltiple para valorar Osteocalcina observamos que la significancia del modelo fue de  $p<0.001$ , al buscar la significancia de acuerdo al grupo de estudio encontramos que el valor de  $p<0.001$ , pero cuando la significancia estaba relacionada al momento de la toma de muestra el valor de  $p<0.182$  al igual que la significancia de la interacción entre grupo de estudio y tiempo de la toma de muestra fue  $p=0.056$  (Tabla 54)

**TABLA 54 REGRESION LINEAL MULTIPLE.  
PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:  
OSTEOCALCINA**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para Osteocalcina						
Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Modelo corregido	43.600	6	7.267	18.840	0.000	0.801
Intersección	84.500	1	84.500	219.074	0.000	0.887
Grupo	20.833	1	20.833	54.012	0.000	0.659

Tiempo	1.400	2	0.700	1.815	0.182	0.115
Grupo * Tiempo	2.467	2	1.233	3.198	0.056	0.186
Error	10.800	28	0.386			
Total	123.000	35				
Total corregida	54.400	34				

a. R cuadrado = .801 (R cuadrado corregida = .759)

En el modelo también obtuvimos el valor de la diferencia de Osteocalcina inicialmente entre grupos y posteriormente entre el momento de la toma de muestra y los resultados reportados fueron los siguientes: La diferencia entre el grupo 0 y 1 fue de -1.8, esa misma diferencia al comparar grupo 0 y 2 fue de -2.40. Cuando se trató de las diferencias porcentuales entre los tiempos, ésta al comparar tiempo 0 y 1 fue de -1.20, pero al contrastar el tiempo 0 y 2 observamos un valor negativo de -0.80, pero la diferencia entre el tiempo 0 y 3 también fue 0 (Tabla 55)

**TABLA 55 REGRESION LINEAL MULTIPLE.  
ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:  
OSTEOCALCINA**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para Osteocalcina							
Parámetro	B	Error típ.	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%.		Eta al cuadrado parcial
					Límite inf.	Límite sup.	
Intersección	2.600	0.278	9.361	0.000	2.031	3.169	0.758
[Grupo=0]	0.600	0.393	1.528	0.138	-0.205	1.405	0.077
[Grupo=1]	-2.400	0.393	-6.110	0.000	-3.205	-1.595	0.571
[Grupo=2]	0	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=1]	-1.200	0.393	-3.055	0.005	-2.005	-0.395	0.250
[Tiempo=2]	-0.800	0.393	-2.037	0.051	-1.605	0.005	0.129
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=0] * [Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=1] * [Tiempo=1]	1.400	0.555	2.520	0.018	0.262	2.538	0.185
[Grupo=1] * [Tiempo=2]	0.800	0.555	1.440	0.161	-0.338	1.938	0.069

a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

Para la Osteocalcina la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p= 0.184$ , debido a su significancia hay desviación del supuesto por lo que la prueba no es valorable (Tabla 56)



**TABLA 56 REGRESION LINEAL MULTIPLE  
CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:  
OSTEOCALCINA**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error(a)			
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para Osteocalcina			
F	gl1	gl2	Significación
1.600	6	28	0.184
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección+Grupo+Tiempo+Grupo * Tiempo			

Siguiendo el mismo modelo, observamos que la significancia del mismo al medir la Osteopontina es de  $p < 0.001$ , cuando hablamos del grupo de estudio  $p < 0.001$  y en cuanto a la significancia del tiempo de la toma de muestra el valor de  $p = 1.00$ . Al llevarse a cabo la interacción de estos dos últimos parámetros el resultado de la significancia es  $p = 1.00$  (Tabla 57)

**TABLA 57 REGRESION LINEAL MULTIPLE.  
PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:  
OSTEOPONTINA**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para Osteopontina						
Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Modelo corregido	60.343(a)	6	10.057	30.609	0.000	0.868
Intersección	115.520	1	115.520	351.583	0.000	0.926
Grupo	43.200	1	43.200	131.478	0.000	0.824
Tiempo	0.000	2	0.000	0.000	1.000	0.000
Grupo * Tiempo	0.000	2	0.000	0.000	1.000	0.000
Error	9.200	28	0.329			
Total	169.000	35				
Total corregida	69.543	34				

a. R cuadrado = .868 (R cuadrado corregida = .839)

Al correr el modelo nos encontramos que la diferencia de Osteopontina entre el grupo 0 y 1 fue de -1.60, al medir esta misma diferencia pero entre el grupo 0 y 2 esta es de -2.40, al medir esa misma diferencia pero en cuanto al tiempo de estudio si contrastamos tiempo 0 y 1 obtenemos un valor de  $p < 0.001$ , si contrastamos el tiempo 0 y 2 esta diferencia es de  $p < 0.001$ . Para la diferencia entre el tiempo 0 y 3 el valor fue de 0 (Tabla 58)

**TABLA 58 REGRESION LINEAL MULTIPLE.  
ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:  
OSTEOPONTINA**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para Osteopontina							
Parámetro	B	Error típ.	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%.		Eta al cuadrado parcial
					Límite inf.	Límite sup.	
Intersección	2.600	0.256	10.142	0.000	2.075	3.125	0.786
[Grupo=0]	0.800	0.363	2.207	0.036	0.057	1.543	0.148
[Grupo=1]	-2.400	0.363	-6.620	0.000	-3.143	-1.657	0.610
[Grupo=2]	0	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=1]	0.000	0.363	0.000	1.000	-0.743	0.743	0.000
[Tiempo=2]	0.000	0.363	0.000	1.000	-0.743	0.743	0.000
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=0] * [Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=1] * [Tiempo=1]	0.000	0.513	0.000	1.000	-1.050	1.050	0.000
[Grupo=1] * [Tiempo=2]	0.000	0.513	0.000	1.000	-1.050	1.050	0.000
[Grupo=2] * [Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.

a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

Para Osteopontina la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p = 0.131$ , debido a su significancia hay desviación del supuesto por lo que la prueba no es valorable (Tabla 59)

**TABLA 59 REGRESION LINEAL MULTIPLE  
CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:  
OSTEOPONTINA**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error(a)			
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para Osteopontina			
F	gl1	gl2	Significación
1.822	6	28	0.131
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección+Grupo+Tiempo+Grupo * Tiempo			

Al igual que con el resto de las inmunohistoquímicas hicimos un modelo de regresión lineal múltiple para Runx2 y observamos una gran significancia del mismo con una  $p < 0.001$ , la significancia cuando hablamos del grupo de estudio también tiene una  $p < 0.001$ , y con respecto al tiempo también es muy significativo con una  $p = 0.016$ . El valor de la interacción de estos dos parámetros (Grupo vs Tiempo) tiene una  $p < 0.001$  (Tabla 60)

**TABLA 60 REGRESION LINEAL MULTIPLE.  
PRUEBA DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS VARIABLE DEPENDIENTE:  
RUNX2**

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para Runx2						
Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
Modelo corregido	25.886(a)	6	4.314	20.133	0.000	0.812
Intersección	36.980	1	36.980	172.573	0.000	0.860
Grupo	17.633	1	17.633	82.289	0.000	0.746
Tiempo	2.067	2	1.033	4.822	0.016	0.256
Grupo * Tiempo	6.067	2	3.033	14.156	0.000	0.503
Error	6.000	28	0.214			
Total	71.000	35				
Total corregida	31.886	34				

a. R cuadrado = .812 (R cuadrado corregida = .772)

Si tomamos en cuenta las diferencias Runx2 al buscar ésta entre el grupo 0 y 1 el valor obtenido es de  $p = -0.80$ , si comparamos el grupo 0 y el 2 la diferencia tiene un valor expresado como  $p < 0.001$ , pero también es importante para nuestro modelo conocer esa diferencia con respecto al tiempo y cuando comparamos el tiempo 0

con el 1 el valor es  $p= 1.60$ , y al comparar el tiempo 0 con el 2 este valor se modifica a  $p= 0.20$ . La diferencia siempre fue 0 al comparar el tiempo 0 vs el 3 (Tabla 61)

**TABLA 61 REGRESION LINEAL MULTIPLE.**  
**ESTIMACIONES DE LOS PARAMETROS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**RUNX2**

Estimaciones de los parámetros							
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para Runx2							
Parámetro	B	Error típ.	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%.		Eta al cuadrado parcial
					Límite inf.	Límite sup.	
Intersección	1.200	0.207	5.797	0.000	0.776	1.624	0.545
[Grupo=0]	0.000	0.293	0.000	1.000	-0.600	0.600	0.000
[Grupo=1]	-0.800	0.293	-2.733	0.011	-1.400	-0.200	0.211
[Grupo=2]	0	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Tiempo=1]	1.600	0.293	5.465	0.000	1.000	2.200	0.516
[Tiempo=2]	0.200	0.293	0.683	0.500	-0.400	0.800	0.016
[Tiempo=3]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=0] * [Tiempo=0]	0	.	.	.	.	.	.
[Grupo=1] * [Tiempo=1]	-2.000	0.414	-4.830	0.000	-2.848	-1.152	0.455
[Grupo=1] * [Tiempo=2]	-0.200	0.414	-0.483	0.633	-1.048	0.648	0.008

a. Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

Para Runx2 la Significancia de la homogeneidad de varianzas del error fue de  $p= 0.005$ , debido a su significancia no hay desviación del supuesto por lo que la prueba si es valorable (Tabla 62)

**TABLA 62 REGRESION LINEAL MULTIPLE**  
**CONTRASTE DE LEVENE SOBRE IGUALDAD DE VARIANZAS VARIABLE DEPENDIENTE:**  
**RUNX2**

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error(a)			
Variable dependiente: Inmunohistoquímica para Runx2			
F	gl1	gl2	Significación
4.063	6	28	0.005
Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.			
a. Diseño: Intersección+Grupo+Tiempo+Grupo * Tiempo			

## DISCUSION DE RESULTADOS.

Uno de los campos de la medicina que han generado más expectativas en los últimos años es la terapia celular con células madre. El aislamiento de células embrionarias humanas, la aparente e inesperada potencialidad de las células madre y el desarrollo de la terapia génica nos lleva a imaginar un futuro para el tratamiento de numerosas patologías, al inicio del estudio consideramos que existía la posibilidad de llevar a cabo un protocolo experimental en defectos craneales en los que proporcionar regeneración ósea podría contribuir de manera importante para favorecer la reparación biológica de los mismos con las tres características de osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis que no tiene algún material que hasta ahora exista, incluso con capacidad de crecimiento.

El objetivo general fue generar hueso *de novo* en el cráneo de ratones atímicos, utilizando una unidad osteogénica con hueso desmineralizado en pasta como soporte para la osteoinducción, dermis humana acelular para promover la osteoinducción y células madre de medula ósea para promover la osteogénesis. Lo cual pudimos lograr a través de la unión de estos tres materiales que promovieron la formación de hueso con características muy parecidas al hueso que denominamos “referencia de normalidad”

Nos propusimos varios objetivos:

El primero fue evaluar el tejido de neoformación por microscopia electrónica para describir la presencia de depósitos de compuestos orgánicos como calcio, fosfato, magnesio, etc.

En el reporte de porcentaje de minerales en el caso de detección del carbono y oxígeno el patrón observado en el que el grupo control presentó porcentajes mayores de estos minerales en relación con el experimental en los tres momentos de la toma de la muestra de forma significativa, es compatible con el hecho de una mayor proporción de otros minerales como calcio y fósforo en el grupo experimental que constituyen el principal material de depósito del tejido óseo neoformado. Cuando analizamos el fósforo, en promedio el grupo control tiene menos depósito de fosfato que el grupo experimental (30% menos) observándose que en el segundo mes hay mayor depósito de fosfato en el grupo experimental. Cuando comparamos el grupo Referente de normalidad con el grupo experimental en al tercer mes observamos que no hay diferencia en el valor del fosfato porque este mineral está depositado en una cantidad muy similar en el grupo experimental durante el último mes de tratamiento a la cantidad que está depositada en el hueso sano (Referente de normalidad) contra el que se esta comparando.

Al analizar el calcio en promedio el grupo Referente de normalidad tiene 22% de calcio, el grupo control tiene 3% de calcio, el grupo experimental presenta en promedio 11.6% a lo largo de los diferentes momentos de la toma de muestra, estando el calcio en el grupo experimental por encima del grupo control al primer

mes, en el segundo mes hay un incremento nuevamente de depósito de calcio, que al llegar el tercer mes en el grupo experimental no hay diferencia con el grupo referente de normalidad, apoyando la hipótesis de que el grupo experimental se parece más al hueso normal. Estos patrones se corroboraron en el análisis multivariado (Tablas 15 a 41) donde se estimó un efecto semejante para el grupo y el momento de la toma de la muestra de forma significativa, principalmente en fosfato, magnesio y calcio.

Estos resultados tienen la dirección esperada que apoyan la hipótesis de que las características de osificación en el grupo experimental a los tres meses de tratamiento deberán ser muy similares a las características del hueso que esta sirviendo de referencia

El segundo objetivo propuesto fue describir por histoquímica la morfología del hueso neoformado, mediante técnicas de Hematoxilina y Eosina, Von Kossa y Tricrómico de Masson.

Al comparar con el grupo Referente de normalidad el grupo control se presentaron una proporción de tinciones positivas siempre inferior al grupo de referencia, diferencias que fueron significativas con Hematoxilina-Eosina y Von Kossa en los tres momentos de la toma de la muestra, mientras que con la tinción de Massón si bien se encontró el grupo experimental con tinciones positivas en menor frecuencia, estos no fue significativo manteniéndose igual o por debajo del grupo control en comparación con el grupo de referencia. A su vez el grupo experimental siempre presentó una mayor proporción de tinciones positivas en comparación con el grupo control que aunque no fueron significativas en el primer mes estas diferencias, si fueron significativas para el segundo mes para Hematoxilina-Eosina y Massón y en el tercer mes para Hematoxilina-Eosina y Von Kossa. Por otra parte llama la atención que si bien en el grupo experimental presentó una menor proporción de muestras con tinciones positivas en comparación con el grupo de referencia, estas diferencias solo fueron significativas al primer mes con la tinción de Von Kossa, lo cual era un valor esperado para etapas más tardías y sin embargo pudimos corroborarlo desde etapas muy tempranas, como se observa en la Tabla 11 de los resultados

En los demás casos no hay diferencias significativas entre el valor experimental y el grupo control. Al hacer un análisis de regresión logística binaria para ajustar la positividad de las tinciones histológicas y aunque las pruebas de bondad y ajuste de los datos nos arrojaron que si era factible analizarse estas variables con éste modelo, éstas últimas no fueron significativas al correrse éste modelo y aunque los resultados de estas mediciones no pudieron modelarse en un análisis multivariado si sugieren fuertemente desde una perspectiva cualitativa que en el grupo experimental existe el desarrollo de tejido de características óseas.

Sin embargo no consideramos que sea una de las mejores técnicas para verificar o descartar la presencia de *hueso de novo* porque el análisis por tinción histológica con Hematoxilina-Eosina, Masson y Von Kossa para evaluar tejido osteoide y la presencia de depósitos de calcio respectivamente no tuvo un impacto importante en los resultados porque al hacer una regresión logística binaria pudimos observar que hasta en un 99% de los casos principalmente en el análisis por grupo los resultados estaban relacionados con el azar. (Tablas 42 a 47)

Y uno más de los objetivos fue describir por inmunohistoquímica la presencia de fosfatasa alcalina, colágena tipo I y las proteínas típicas del hueso osteocalcina y osteopontina y el factor de transcripción Runx 2

Por lo que toca a las tinciones de inmunohistoquímica se observó que en el grupo experimental en el primer mes se expresó en forma significativa más abundantemente Fosfatasa alcalina, Colágena I, Osteopontina y Runx2, y aunque la Osteocalcina no fue significativa tiene una tendencia hacia una presencia mayor en el grupo experimental en comparación con el grupo control. Al valorarse el segundo mes de la toma de muestra este patrón de presencia mayor en el grupo experimental contra el control persiste de manera significativa esta vez en todos los marcadores estudiados Fosfatasa Alcalina, Colagena I, Osteocalcina, Osteopontina y Runx2. En el tercer mes de la expresión de los marcadores persiste por encima en el grupo experimental con excepción del marcador Runx2 que como era de esperarse hay pérdida de su significancia en el grupo experimental y en el grupo se Referente de normalidad con ausencia total en el grupo control, debido a que se trata de un marcador de inicio de la transcripción que se hace positivo en fases muy tempranas del desarrollo del hueso de novo y por un período muy corto de aproximadamente 3 semanas<sup>118</sup>. (Tabla 7) Este patrón sigue siendo muy significativo al modelarse por regresión lineal múltiple (Tablas 48 a 62) considerando que lo anterior es una fuerte evidencia de que la unidad osteogénica propuesta con las propiedades osteoconductoras de la Colágena en forma de Dermis Humana Acelular, con una Matriz Ósea Desmineralizada favoreciendo la Osteoinducción y además de células provenientes de Médula Ósea por su potencial osteogénico, tienen la capacidad de formar hueso *de novo*.

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Es muy importante señalar que este estudio aun con el rigor metodológico que presenta tiene muchas limitaciones sabemos que pudimos formar hueso con la unidad osteogénica propuesta, pero es importante continuar con las investigaciones con la finalidad de determinar si las características del hueso formado en el defecto de tamaño crítico en cráneo del modelo tiene las características histomorfométricas, estudiar si tiene el mismo grosor, si rebasa o no más allá del defecto de tamaño crítico que pretendemos rellenar y si infiltra o no otras estructuras como duramadre o encéfalo, pero principalmente nos falta demostrar que si bien tiene características muy similares al hueso sano ¿Tiene la capacidad de crecimiento y remodelación a través de reabsorción y depósito?, deben de continuar las interrogantes porque la finalidad es que pueda ser usado en defectos de cráneo en niños

## CONCLUSIONES

- Podemos formar hueso de novo con características similares a un grupo de referencia sano, cuando unimos las tres características indispensables y que solo tiene el hueso autólogo que son osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción.
- Una de las mejores formas de demostrar la formación de hueso nuevo es por medio de la medición de depósito de minerales en diferentes momentos del estudio a través de la microscopía de barrido
- Es fundamental recordar que para que una investigación se transforme en una realidad terapéutica es imprescindible continuar haciendo investigación rigurosa y estricta que nos permita llegar a conclusiones.

## HACIA DONDE VAMOS

A pesar de todas las controversias existente en este campo no cabe duda que la utilización de las células madre en el futuro ha despertado enormes expectativas, aun falta continuar por este camino, probablemente pensando de manera ambiciosa el siguiente paso sea el proponer un proyecto en un modelo humano en un período de crecimiento y para el que hasta hoy no hay un material que reúna las características del hueso sano (osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis)

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ETAPA DEL ESTUDIO	PRIMER SEMESTRE	SEGUNDO SEMESTRE	TERCER SEMESTRE	CUARTO SEMESTRE
Terminación del protocolo y someter a CE	<b>**1ª Reunión expertos 22-mayo-2009</b>			
Ajuste de procedimientos		<b>**2ª Reunión expertos Noviembre 2009</b>		
Aplicación de unidad osteogénica		<b>Publicación de antecedentes sobre la unidad osteogénica</b>		
Procesar Muestras				



Elaboracion base Datos				
Analisis de Resultados			Publicación de resultados preliminares	
Interpretacion Resultados				Preparación para examen de grado
Elaboracion de Informe Final				

## PRODUCTOS ESPERADOS

1. Referente de normalidad y tipificación de la unidad osteogénica.

Esto nos permite poder plantear la posibilidad de implantar esta unidad en un paciente pediátrico a mediano-largo plazo

2. Se obtendrán 3 publicaciones con este trabajo.
  - La primera proyectada para ser enviada a la editorial en Marzo 2011 que abarca todo el protocolo completo
  - La segunda proyectada para mayo del 2011 para publicar las características del grupo de referencia
  - La tercera planeada a finales del 2011 que son los manuales de procedimientos
3. Presentacion del protocolo en un congreso nacional
4. Presentacion de protocolo en un congreso internacional (Orlando USA Diciembre 2010)

## BIBLIOGRAFIA

1. Gillies H, and Harrison SH. Operative correction by osteotomy of recessed malar maxilar compound in a case of oxycephaly. *Br J Plast Surg* 1950;3:123–127.
2. Converse IM, and Telsey D. Tripartite osteotomy of the midface for orbital expansion and correction of tue deformity in craniostenosis. *Br J Plast Surg* 1971; 24:365–374.
3. Van der Meulen JC. Medial fasciotomy. *Br J Plast Surg* 1979; 32:339–42. 4.
4. Apert E. De l'acrocéphalosyndactylie. *Bull. et mém. Soco Méd hopo Paris*, 1906; 23:1310.
5. Crouzon O. Dysostose cranio–faciale héréditaire. *Bull. et mém. Soco Méd hopo Paris*, 1912; 33:545.
6. Delaire J. La croissance des os de la voute du crane. *Principies généraux. Rev. Stomat.*1961; 62:518–526.
7. Tessier P, Delaire J, Billet J, and Lnadais H. Considerations sur le développement de l' orbite; ses incidences sur la croissance faciale. *Rev. Stomat.* 1965; 63:27–39.
8. Vacarro AR, Patel TC, Fischgrund J, Anderson DG, Truumees E, Herkowitz HN. A pilot study evaluating the safety and efficacy of OP-1 putty (shBMxP-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondylolisthesis. *Spine* 2004;29:1885-1892
9. Khan S, Hidaka C, Sandhu HS, Girardi F, Cammisa F, Diwan AD. Gene therapy for spine fusion. *Orthop Clin North Am* 2000; 31:473-484
10. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications *J Am Acad Orthoped Surg*1995;3:1-8.
11. Whang PG, Wang JC. Bone graft substitutes for spinal fusion. *Spine J* 2003;3:155-165.
12. Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999; 30:543-552.
13. Boden SD. The biology of posterolateral lumbar spinal fusion. *Orthop Clin North Am* 1998;29:603-619.
14. Greenwald S, Boden S, Goldberg V, Khan Y, Laurencin C. Bone graft substitutes: facts, fictions and applications. *J Bone Joint Surg* 2001; 83:S98-103.
15. Garza CP, Mendoza OF, Galván RM, Álvarez EL. Banco de hueso y tejidos: alta tecnología disponible para los ortopedistas mexicanos. *Acta Ortoped Mex* 2004;18:261-265
16. Safdar N, Khan F, Cammisa H Jr, Sandhu S, Ashish D, et al. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13:77-86.
17. Cornell CN. Osteoconductive materials as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999;30:591-598.
18. Boden S. Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute. *Spine* 2002;27:26-31.
19. Bucholz RW, Carlton A, Holmes R. Interporous hydroxyapatite as bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clin Orthop* 1989; 240:53-62.
20. Cho DY, Lee WY, Sheu PC, Chen CC. Cage containing a biphasic calcium phosphate ceramic (Triosite) for the treatment of cervical spondylosis. *Surg Neurol* 2005;63:497-504.
21. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.

22. Ludwig SC, Boden SD. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion. *Orthop Clin North Am* 1999;30:635-645.
23. Chapman MW, Bucholz R, Cornell C. Treatment of acute fractures with collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:495-502.
24. Sandhu HS et al. Bone grafting for spinal fusion. *Orthop Clin North Am* 1999;30:685-698.
25. Sassard WR, Eidman DK, Gray PM. Analysis of spine fusion utilizing demineralized bone matrix. *Orthop Trans* 1994;18:886-887.
26. Nade S, Armstrong L, McCartney E, Baggaley B. Osteogenesis after bone marrow transplantation: the ability of ceramic materials to sustain osteogenesis from transplanted bone marrow cells: preliminary studies. *Clin Orthop* 1983;181:255-263.
27. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1998;242:1528-1534.
28. Sonobe J, Okubo Y, Kaihara S, Miyatake S, Bessho K. Osteoinduction by bone morphogenetic protein 2-expressing adenoviral vector: application of biomaterial to mask the host immune response. *Hum Gene Ther* 2004;15:659-668.
29. Boden SD, Adeblick TA, Sandhu HS. The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. *Spine* 2000;25:376-381.
30. Vacarro AR, Patel TC, Fischgrund J, Anderson DG, Truumees E,
31. Herkowitz HN, et al. A pilot study evaluating the safety and efficacy of OP-1 putty (shBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondylolisthesis. *Spine* 2004;29:1885-1892.
32. Widemann B, Bamdad P, Holmer C, et al. Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone* 2004;34:862-868.
33. De Biase P, Capanna R. Clinical applications of BMPs. *Injury* 2005; 36:43S-46S.
34. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop* 1994;301:302-312.
35. Boden Boer FC, Bramer JA, Blokhuis TJ, et al. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on the healing of a freshly closed diaphyseal fracture. *Bone* 2002;31:158-164.
36. Mizumoto Y, Moseley T, Drews M, et al. Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85A:124-130.
37. Boden S. Bone graft and fusion-enhancing substances: practical applications of gene therapy. In: Vaccaro, ed. *Principles and Practice of Spine Surgery*. 1st ed. Philadelphia: Mosby; 2003. pp. 127-139.
38. Paley D, Young MC, Wiley AM, Fornasieer VL, Jackson RW. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bone defects: an experimental study in rabbits. *Clin Orthop* 1986;208:300-311.
39. Conolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone marrow preparation. *J Bone Joint Surg Am* 1989;71:684- 91.

40. Muschler GF, Boehm C, Easley KA. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:1699-1709.
41. Muschler GF, Nitto H, Boehm C, Easley KA. Age and gender related changes to cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 2001;19:117-125.
42. Inoue K, Ohgushi H, Yoshikawa T, et al. The effects of aging on bone formation in porous hydroxyapatite: biochemical and histologic analysis. *J Bone Miner Res* 1997;12:989-994.
43. Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, et al. Influence of platelet-rich plasma PRP on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells: an *in vitro* study. *Int J Maxillofac Surg* 2004;33:60-70.
44. Dietmar W, Hutmacher R, García A. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. *Gene* 2005;347:1-10.
45. Doblare M, García JM, Gómez MJ. Modelling bone tissue fracture and healing. *Eng Fract Mec* 2004;71:1809-1840.
46. Mayer U, Joos U, Wiesmann P. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. I. *Int J Maxillofac Surg* 2004;33:325-332.
47. Sun JS, Yueh-Hsiu S, Lin FH. The role of muscle-derived stem cells in bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26:3953-3960.
48. Orban J, Marra K, Hollinger J. Composition options for tissueengineered bone. *Tissue Eng* 2002;8:529-539.
49. Tessier P. Ostéotomies totales de la face; syndrome de Crouzon, syndrome d'Apert; Oxcéphalies caphocéphalies, turricephalies. *Ann Chir Plast* 1967; 1:269-285.
50. Tessier P, Guiot G, Rougerie J, Delbet JP, and Pastoriza J. Ostéotomies cranio-naso-orbito-faciales pour hypertelorisme. *Ann Chir Plast* 1967; 12:103-118.
51. Tessier P. Traitement chirurgicale des malformations orbito-faciales rares, *Compot. Rend. De P<sup>2</sup>emiere Congrès Intemat. Neuro-gen. et Neuro-ophthalm.*, Basle, 1968. Karger.
52. Tessier P. Expansion chirurgicale de l' orbite. *Ann Chir Plast* 1969; 14:208-214.
53. Tessier P. The scope and principles dangers and limitations, and the need for special training in orbitocranial surgery. In: *Transactions of the Fifth International Congress of Plastic and Reconstructive Surgery*. Melbourne: Butterworth's Ltd., 1971:903-930.
54. Ortiz Monasterio F, Fuente del Campo A, Limon Brown E. Mechanism and correction of the V syndrome in craniofacial dysostosis. *Symposium in Plastic Surgery of the Orbital Region*. Vol. XII Mosby, St. Louis, Mo. 1976:246-254.
55. Ortiz Monasterio F, Fuente del Campo, and Carrillo A. Advancement of the orbits and the midface in one piece, combined with frontal repositioning, for the correction of Crouzon's deformities. *Plast Reconstr Surg* 1978; 61:507-516.
56. Ortiz Monasterio F, Medina O, and Musolas A. Geometrical planning for the correction of orbital hypertelorism. *Plast Reconstr Surg* 1990; 86:650-657.
57. Whitaker, L.A., Bartlett, S.P., Schut, L, and Yu J. Craniosynostosis: An Analysis of the Timing, Treatment and Complications in 164 Consecutive Patients. *Plast Reconstr Surg* 80: 195,1987.

58. Fearon, J.A, Yu J, Bartlett SP, Munro IR, Chir B, and Whitaker L. Infections in Craniofacial Surgery: A Combined Report of 567 Procedures from Two Centers *Plast Reconstr Surg* 1997; 100:862.
59. Estadísticas Vitales, México: INEGI SSA/DGEI 2006.
60. Vital statistics of the United States. Washington DC: Government Printing office 1981, y Lazar-Menandino 1995.
61. Max JE, Roberts MA, Koele SL, et al. Cognitive outcome in children and adolescents following severe traumatic brain injury: Influence of psychosocial, psychiatric and injury-related variables. *J Int Neuropsychol Soc* 1999;5:56-68.
62. Klonoff H, Clark C, Klonoff PS, Outcome of head injuries from childhood to adulthood: a twenty-three-year follow-up study. In: Broman SH, Michel ME, eds, *Traumatic Head injury in children*. New York: Oxford University Press, 1995:219-34.
63. Mierez R, Guillen A, Brell M, et al. Fractura evolutiva de cráneo en la infancia. Presentacion de 12 casos. *Neurocirugía* 2003; 14:228-234
64. Morgalla M, Krasznai L, Buchholz R, Bitzer M, Deusch H, Walz GU, Grote EH. Repeated Decompressive Craniectomy after Head Injury in Children : Two Successful cases as result of improved Neuromonitoring, *Surg Neurol*, 1995, 43, 583-590
65. Kondziolka D, Fazl M, Functional Recovery after Decompressive Craniectomy for Cerebral Infarction, *Neurosurgery*, 1998, 23, 143-147
66. Polin RS, Shaffrey ME, Bogaev CA, Tisdale N, Germanson T, Bocchicchio B, Jane JA, Decompressive Bifrontal Craniectomy in the Treatment of Severe Refractory Posttraumatic Cerebral Edema, *Neurosurgery*, 1997, 41, 84-94
67. Rieke K, Schwab S, Krieger D, von Kummer R, Aschoff A, Schuchardt V, Kacke W, Decompressive Surgery in space-occupying hemispheric infarction : Results of an open, prospective trial, *Crit Care Med*, 1995, 23, 1576-1587
68. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniomaxillofac Surg*. 1990;1:60-68.
69. Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat (Basel)*. 1990;138:185-192.
70. Springer, Acil, Kuchenbecker, Bolte, Warnke, Abbound Bone graft vs. BMP-7 in a critical size defect -Cranioplasty in a growing infant model *J.Bone* 2005 vol, 37 no 5
71. Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med* 2002; 48: 142-8.
72. Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamaru T, Kato M, et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morpho-genetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone* 1998; 22:605-12.
73. Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: Preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:630-5
74. Sweeney TM, Opperman LA, Persing JA, Ogle RC. Transplanted osteoblasts in type I collagen gels repair of critical size rat calvarial defects. *Orthop Trans*. 1993;16:785.
75. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150:893-8.

76. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop* 1995; 313:8-18.
77. Spector, Greenwald, Warren, Bouletreau, Crisera Co-culture of Osteoblast with Immature Dural Cells causes an Increased Rate and Degree of Osteoblast Differentiation *Plastic and Reconstructive Surgery* 2002 vol 109 no 2
78. Martín Ardila Carlos M. Proteínas morfogenéticas óseas *Periodontology* 2000; 24: 253-269.
79. Solchaga L A, Cassiède P. Apatita carbonatadalan A. Different response to osteo-inductive agente in bone marrow-and periosteum-derived cell preparations. *Acta Orthop Scan* 1998;69(4):426-32.
80. Dragoo J L, Lieberman J R, Lee R, Deugarte D A., Lee Y, Zuk P A, et al. Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2005;115(62):1665-73.
81. Diefenderfer D L, Osyczka A M, Garino J P, Leboy P S. Regulation of BMP-induced transcription in cultured human bone marrow stromal cells. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 2003;85(3):19-28.
82. Glowacki J. A review of osteoinductive testing methods and sterilization processes for demineralized bone. *Cell and Tissue Banking* 2005;6:3-12.
83. Gendler E. Perforated demineralized bone matrix: a new form of osteoinductive biomaterial. *J Biomed Mater Res* 1986;20:687-97.
84. Salyer KE, Bardach J, Squier CA, Gendler E, Kelly KM. Cranioplasty in the growing canine skull using demineralized perforated bone. *Plast Reconstr Surg* 1995;96:770-9.
85. Chen TM, Wang HJ. Cranioplasty using allogeneic perforated demineralized bone matrix with autogenous bone paste. *Ann Plast Surg* 2002;49:272-9
86. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 1983;220:680-6.
87. Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 2002;27:S2-S8.
88. Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhari A, Turek T, Schaub RG, Ron E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed Mater Res* 1994;28:1127-38.
89. Sheehan JP, Sheehan JM, Seeherman H, Quigg M, Helm GA. The safety and utility of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for cranial procedures in a nonhuman primate model. *J Neurosurg* 2003;98:125-30.
90. McKay B, Sandhu HS. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spinal fusion applications. *Spine* 2002;27:S66-S85.
91. Boyan BD, Lohmann CH, Somers A, Niederauer GG, Wozney JM, Dean DD, et al. Potential of porous poly-D,L-lactide-co-glycolide particles as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2 during osteoinduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 1999;46:51-9.
92. Miki T, Imai Y. Osteoinductive potential of freeze-dried, biodegradable, poly (glycolic acid-co-lactic acid) disks incorporated with bone morphogenetic protein in skull defects of rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996;25:402-6
93. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998; 22: 591-603.
94. Tuli SM, Slingh AD. The osteoinductive property of decalcified bone matrix: An experimental study. *J. Bone Joint Surg Br* 1978; 60: 116-23.

95. Nakamichi Y, Shukumani CH, Yanada T. Chondromodulin I is a bone remodeling factor. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 636-44.
96. Joyce ME, Jinguishi S, Bolander ME. Transforming Growth factor- $\beta$  In the regulation of fracture repair. *Othop Clin North Am* 199-209.
97. Asland, Sims, Dayi Guide Bone Regeneration (GBR) on Healing Bone Defects: A Histological Study in Rabbits *J-Contemporary Dental Practice* vol 5 no 2 2004
98. Lorenz(21), Marc, Hedrick, Chang, Babak, Mehrara, Longaker The impact of Biomolecular Medicine and Tissue Engineering on Plastic Surgery en el siglo XXI *Plastic and Reconstructive surgery* june 2000 vol 5 no 7
99. Eppley, Morales, Wood, Pensler, Goldstein, Havlik, Habal, Losken, Williams, Burstein, Rozzelle, Sadove Resorbable PLLA-PGA Plate and Screw Fixation in Pediatric Craniofacial Surgery: Clinical experience in 1883 Patients *Plastic and reconstructive surgery* 2004 vol 114 No 4
100. Sweeney TM, Chabra A, Brooke B, Opperman LA, Ogle RC. Type I collagen gels mediate total repair of bone defects through intramembranous ossification. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76:922.
101. Livesey, S.A., Herndon, D.N., Hollyoak, M.A., Atkinson, Y.H., and Nag, A. Transplanted acellular allograft dermal matrix: Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. *Transplantation* 1965; 60:1,9.
102. Eppley B. Experimental assessment of the revascularization of acellular human dermis for soft-tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107: 757-62
103. Cohen SR, Holmes RE, Meltzer HS. Craniofacial reconstructions with a fast resorbing polymer: a 6 to 12 – month clinical follow-up review. *Neurosurg focus* 2004; 16: 1-6.
104. Chen, N.T., Glowacki, J., E., and Whitaker, L.A. revascularization of membranous bone *Plast. Surg.* 76. 510, 1985.
105. Manson, P.N. Facial bone healing and bone grafts: A review of clinical physiology. *Clin. Plast. Surg.* 21:331, 1994.
106. White E, Shors EC. Biomaterial aspects of interporous-200 porous hydroxyapatite. *Dent Clin North Am* 1986; 30:49-67.
107. Ozaki, W., Buchman, S.R., Goldstein, S.A., and Fyhrie, ture or cortical membranous and cortical endochondral onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Plast. Reconstr. Surg.* 104: 139, 1999.
108. Hing K. In vitro performance of porous hydroxyapatite for bone replacement. University of Cambridge. Massachusetts, United States. 1996; Chapter 6 p.
109. Roy, D.M., and Linnehan, S. K. Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature* 247:220, 1974.
110. Holmes, R.E., and Hagler, H. K. Porous hydroxyapatite as bone graft substitute in cranial reconstruction: A histometric study. *Plast. Reconstr. Surg.* 81:662, 1988.
111. Yuan YJ, Weng YL, Cao YL [Research advances and applications of the methods to repair mandible defect] PMID: 15133561
112. Kneser, Schaefer, Polykandritis, Horch Tissue engineering of Bone: The Reconstructive Surgeon's Point of View *J. Cell Mol Med* vol 10 no 1, 2006
113. Becerra Ratia José. Terapia Celular e Ingeniería Tisular para la regeneración esquelética, Laboratorio de Bioingeniería y Regeneración Tisular (LABRET)

- Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus Universitario de Teatinos. 29071 Málaga
114. Yu, McClintock, Gannon, Gao, Mobasser, Sharawy Regional Differences of Dura Osteinduction: squamous dura Induces Osteogénesis, Sutural Dura Induces Condrogénesis and Osteogénesis Plastic and Reconstructive Surgery 1997 vol 100 no 1.
  115. Greenwald, J.A., Mehrara, B.J., Spector, J.A., et al. Biomolecular mechanisms of calvarial bone induction: Immature versus mature dura mater. *Plast. Reconstr. Surg* 2000; 1382: 105 -11.
  116. Greenwald, J.A., Mehrara, B.J., Spector, J.A., et al. Immature versus mature dura mater: II Differential expression of genes important to calvarial reossification. *Plast. Reconstr. Surg* 200; 106: 630
  117. Spector, Greeneald, Warren, Bouletreau Duramater Biology: Autocrine and Paracrine Effects of Fibroblast Grow Factor 2 Plastic and Reconstructive Surgery 2002 vol 109 no 2
  118. Hobar, P.C., Schreiber, I.S., McCarthy, J. C. Thomas, P.A. The role of the dura in cranial regeneration in the immature animal. *Plast. Surg.* 92: 405, 1993
  119. Solchaga L A, Cassiède P. Apatita carbonatadalan A. Different response to osteo-inductive agente in bone marrow-and periosteum-derived cell preparations. *Acta Orthop Scan* 1998;69(4):426-32.
  120. Gilbert S. *Developmental Biology*. Fifth edition. Sunderland, Massachusetts. USA. Sinauer Associates Inc;1997. Chapter 9. p. 918.
  121. Tisdell CL, Goldberg VM, Parr JA, Bensusan JS, Staikoff LS, Stevenson S. The influence of a hydroxyapatite and tricalcium phosphatae coating on bone growth into titanium fiber-metal implants. *J. Bone Joint Surg Am* 1994; 76:159-71.
  122. Ferraro JW. Experimental evaluation of ceramic calcium phosphate as a substitute for bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 1979; 63: 634-40.
  123. Robinson D, Alk D, Sandbank J, Farber R, Halperin N. Inflammatory reactions associated with a calcium sulphate bone substitute. *Ann Transplant* 1999; 4: 91-7
  124. Blake GB, MacFarlene MR, Hamton JW. Titanium in reconstructive surgery of the skull and face. *Br. J Plast Surg* 1990; 43: 528-35.
  125. Eppley, Sadove, Havlik Resorbable Plate Fixation in Pediatric Craniofacial Surgery *Plastic and Reconstructive Surgery* 1997 vol 100 no 1
  126. Gosain, A.K., Song, L., Yu, P., et al. Osteogenesis in cranial defects : Reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast. Reconstr. Surg.* 106:360, 2000.
  127. Gosain *Biomaterials for Reconstruction of the Cranial Vault Plastic and Reconstructive Surgery* 2005 vol 116 no 32
  128. Gosain, Santoro, Song, Capel, Osteogenesis in Calvarian Defects: Contribution of the Dura, the pericranium and the Surrounding Bone in Adult vs. Infant Animals *Plastic and Reconstructive Surgery* 2003 vol 12 no 2
  129. Gosain AK. The current status of tissue glues: I. For bone fixation. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109: 258-83.
  130. Chiroff RT, White EW, Weber KN Roy DM. Tissue ingrowth of replamineform implants. *J Bio Med Mater Res* 1975; 6: 29-45.
  131. Scaduto AA, Lieberman JR. Gene therapy for osteoinduction. *Orthop Clin North Am* 1999; 30:625-33.



132. Ito A, Mase A, Takizawa Y. Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. *J Biosc Bioeng* 2003; 95: 196-9.
133. Cornell CN, Lane JM, Chapman M, Merkow R, Seligson D, Henry S, et al. multicenter trial of Collagraft as bone graft substitute. *J. Orthop Trauma* 1991; 5: 1-8
134. Lee, C., Antonyshyn, O.M. and Forrester, C.R. Cranioplasty Indications, technique and early results of autogenous split skull cranial vault reconstruction. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 23: 133, 1995
135. Wilkes, G. H., Kernahan, D.A., and Christenson, comparative study in mature and immature animals. *Ann. Plast. Surg.* 15:374, 1985.
136. Nakamichi Y, Shukumani CH, Yanada T. Chondromodulin I is a bone remodeling factor. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 636-44.
137. Encina N R, Brillotte W G, Hofmann M C. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma. *Laboratory Investigation* 1999;79(4):449-64
138. JB, Stein GS. Runx2/Cbfa1: Un regulador multifuncional de la formación ósea. *Current Pharmaceutical Design* 2003; vol. 9, 32: 2677- 2685
139. Gronthos S, Zannettino A, Graves S, Ohta S, Hay S, Simmons P. Differential cell surface expression of the STOR-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete-developmental stages in primary cultures of human bone cells. *Journal of Bone & Mineral Research* 1999;(1):47-56
140. Sweeney TM, Chabra A, Brooke B, Opperman LA, Ogle RC. Type I collagen gels mediate total repair of bone defects through intramembranous ossification. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:922
141. Gronthos S, Shaoqiong C, Wang C, Robey P, Songtao S. Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem by upregulation of CBFA1, osterix and osteocalcin. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003;18(4): 716-22
142. Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, Sabatini M, Dallas S, Feng JQ, et al. Effects transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type collagen mRNA in long term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1994;9:855-6
143. Schenk R, Buser D, Hardwick R, Dahlin C. Healing Pattern of Bone Regeneration in Membrane-Protected Defects: A Histologic Study in the Canine Mandible
144. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 1998;139:663-70.
145. RN Basurto, LS Arrieta, HV Castrejón Estudio de la consolidación ósea en rata por microscopía electrónica de barrido ambiental *Vet. Méx*, 2008; 39(2): 1-12
146. Ip W.Y. Polylactide membranes and sponges in the treatment of segmental defects in rabbit radii. *Injury*. 2002; 33 S-B: 66-70
147. Álvarez Cáseres R. Estadística multivariante y no paramétrica SPSS: Díaz De Santos. Madrid, 1995. pp 306-40.



148. Yoon ST, Boden SD Osteoinductive molecules in orthopaedics:basic science and clinical studies. *Clin Orthop.* 2002; 395: 33-43.



## ANEXOS RELACIONADOS

### ANEXO 1

Búsqueda de la literatura

Estrategia de búsqueda de literatura

Iniciamos una revisión de la literatura sobre el tema REGENERACION Y/O REMODELACION OSEA CRANEAL los límites de este estudio fueron los últimos 20 años en publicación sobre el mismo y:

- 1.- Regeneración ósea
- 2.- Remodelación ósea
- 3.- Todos los grupos de edad ya que al agregar la limitante grupo de edad en menores de 18 años no obtuvimos resultados
- 4.- Todos los países
- 5.- Bibliografía publicada en los idiomas Español e Inglés (Por encontrarse la mayoría de las publicaciones editadas en este último)
- 6.- Todos los tipos de estudios desde reporte de casos hasta experimentales
- 7.- Publicaciones de estudios en humanos y animales
- 8.- Cualquier revista científica

Con los límites anteriores obtuvimos un total de 108 publicaciones de las cuales pudimos obtener-67 para revisarlas, luego del análisis de estos, fueron 48 publicaciones las que abordaban el tema específicamente, y al realizar el desglose minucioso de los datos que a continuación se presentan los autores del presente artículo coincidimos en que únicamente 35 bibliografías se apegaban a la inducción de regeneración y remodelación ósea craneal

**AUTORES:** Los principales autores de estas publicaciones fueron: Bidic, Carvalho, Kneser, Aslan, Okii, Tuan, Hernández, Barbos, Sclafani, Eppley, Taub, Groeneveld, Eppley, Gosain, Soto, Needleman Springer, Algenstaedt, Gurevitch, Murphy, Lorenz, Robert, Yu, Hobart, Spector, Concannon, Gosain, Sherman, Spector, Breitbart, Vargel, Rosenthal

Entre los principales autores hay 3 grupos de investigadores que se destacan :

a) Eppley<sup>10,13</sup> (Eppley, Morales, Wood, Pensler, Goldstein, Havlik, Habal, Losken, Williams, Burstein, Rozzelle, Sadove ) Investigadores originarios de Estados Unidos que han dirigido sus investigaciones principalmente al comportamiento de las placas de materiales absorbibles en cirugía pediátrica craneofacial.

b) Gosain<sup>14, 27</sup> (Gosain, Santoro, Song, Capel) Han puesto sus esfuerzos para explicar el papel de los biomateriales en reconstrucción de cráneo, pero la dirección de sus últimos estudios es explicar cual es el papel tanto de la duramadre como del periostio y tejido circundante en la Osteogénesis.



c) Spector<sup>25,29</sup> (Spector, Greenwald, Warren, Bouletreau, Crisera) Buscan explicar la Biología de la Duramadre sobre el factor de crecimiento de Fibroblastos, así como el cultivo de osteoblastos y su diferenciación que se encuentran en un área de investigación sumamente importante para este tema la Ingeniería Tisular

## OBJETIVO

Determinar cuales son los principales avances en la remodelación y regeneración ósea en la bibliografía publicada durante los últimos 20 años sobre el tema que nos pueda proporcionar información para analizar en que condiciones y bajo que circunstancias están haciéndose estudios con respecto a lo anterior para que la información recavada sea en un futuro la base bibliografica de un protocolo experimental

## AÑOS DE PUBLICACION

De todos los artículos revisados el de Barbos<sup>8</sup> se publicó en 1988 y fue uno de los primeros estudios en mencionar el comportamiento del tejido óseo que se forma de novo en un implante colocado para intentar llenar un defecto para cirugía craneofacial con Eppley<sup>10,13</sup> y el papel de la duramadre para la osteoinducción Yu<sup>23</sup> si se trata de la sutura escamosa o para la condrogénesis si se trata de la sutural y finalmente Concannon<sup>26</sup> en ese mismo año habla de la inducción ósea usando hueso desmineralizado. Ya para el año 2000 se habla del uso de proteína morfogenética para la regeneración ósea en humanos Groeneveld<sup>12</sup> y Lorenz<sup>21</sup> habla del impacto de la Ingeniería Tisular y Medicina Biomolecular en el siglo XXI y principalmente en Cirugía Plástica. En el año 2001 Okii es de los primeros en mencionar los cambios histológicos en la reconstrucción craneal con hidroxapatita, uno de los biomateriales más importantes para la reconstrucción craneofacial que hasta hoy ha sido objeto de múltiples estudios, en el 2002 continúan las publicaciones sobre el tema e interesantemente Carvalho<sup>2</sup> en Brasil habla del tratamiento no farmacológico de la estimulación de osteogénesis y Tuan<sup>6</sup> continúa con el estudio de la ingeniería tisular pero en este caso en células adultas, también Robert<sup>22</sup> estudió la seguridad y eficacia de la hidroxapatita en el mismo año, pero la mayor información sobre el tema de regeneración y remodelación ósea se han publicado desde el 2003 Taub<sup>11</sup> es uno de los primeros en mencionar la función de los implantes aloplásticos prefabricados y la evolución de los mismos para la reconstrucción craneofacial, pero la ingeniería genética va más allá en este año y Gurevitch<sup>19</sup> en su publicación habla del estudio del micro ambiente hematopoyético en una combinación que hace de hueso desmineralizado y células de médula ósea para reconstrucción de hueso y cartílago, en este mismo año Hobart<sup>24</sup> inicia lo que hasta entonces no se había estudiado ¿como afecta todo lo usamos para la reconstrucción craneal en animales en desarrollo? y lo hace buscando con un biomaterial ampliamente usado, la hidroxapatita y continúa Gosain<sup>27</sup> en el mismo lapso explicando como contribuye la dura, el pericráneo y el tejido circundante en la osteogénesis de un defecto craneal; hacia el 2004 Aslan<sup>4</sup> en Turquía



va más allá estudiando lo que llama regeneración ósea guiada en defectos óseos, en ese mismo lapso Hernández en México usa la regeneración ósea guiada simultáneamente a la colocación de implantes dentales, y es Soto<sup>15</sup> quien nos recuerda que aun en el 2004 los autoinjertos óseos son la mejor alternativa a pesar de todos los adelantos e ingeniería tisular para la reconstrucción craneofacial Vargel<sup>31</sup> inicia un protocolo con injerto óseo deshidratado soluble para reconstrucción craneofacial; en 2005 Sclafani<sup>9</sup> compara el comportamiento de los injertos sintéticos y los alo injertos para la reconstrucción craneal, y es en este año también cuando Springer<sup>17</sup> compara injertos óseos contra proteína morfogenética-7 para la regeneración ósea de un defecto de tamaño crítico en un modelo en desarrollo, Algenstaedt<sup>18</sup> retoma la función micro vascular y los cambios secuenciales de la formación vascular en la regeneración ósea, un dato que es sumamente fundamental para la osteoinducción; finalmente Kneser<sup>3</sup> en el 2006 hace un resumen de lo que representa hoy en día la ingeniería genética para diferentes campos de la cirugía hablándonos de los puntos de vista de los cirujanos, especialmente en materia de cirugía reconstructiva craneofacial

#### LUGAR DE REALIZACION

Podemos dividir a los trabajos revisados en aquellos que fueron publicados en países desarrollados y países en vías de desarrollo.

Países en vía de desarrollo: México (2), Turquía(2), Israel(1), Brasil(1)

Países desarrollados: Estados unidos(19), Suiza(2), Japón(1), Italia(1), Alemania(3), Inglaterra(1)

#### DISEÑO DE LOS ESTUDIOS

De los artículos incluidos 16 fueron experimentales lo que le dio a esta revisión una validez importante ya que contiene información de alto gradiente científico, 1 meta-análisis publicado por la biblioteca Cochrane, 2 revisiones sistemáticas sobre el tema, 8 revisiones narrativas, 1 estudio de cohorte y 4 reportes de casos clínicos

#### CARACTERISTICAS DE LA POBLACION

Por supuesto en los trabajos experimentales la población en que se trabajó fueron animales de laboratorio, principalmente Conejos New Zealand, Ratas Lewis, Mini cerdos, Hámsteres, en los reportes de casos fueron pacientes principalmente niños menores de 5 años que requieren reconstrucción craneofacial por malformaciones, en los casos de adultos la reconstrucción craneofacial era secundaria postrauma o resección por cáncer, en los casos de revisión sistemática o meta-análisis el material en el que se basó fue la literatura publicada sobre el tema

#### INSTRUMENTOS DE MEDICION

Los instrumentos de medición fueron utilizados principalmente en los estudios experimentales y como todos estaban relacionados con la regeneración y



remodelación ósea los principales estudios fueron estudios de imagen como Ortopantomografía, Cefalometría, TAC tridimensional, Tomografía micro computada , Técnicas histopatológicas e Inmunohistoquímicas, Bioquímica y en los reportes de Casos los datos clínicos relacionados a la patología y el tratamiento.

#### INTERVENCION (VARIABLE DEL ESTUDIO)

Hubo múltiples variables relacionadas con los trabajos incluidos

Uso de una placa de ac.polilactico y glicolico  
Tratamiento no farmacológico para promover la osteogénesis  
Regeneración tisular de hueso  
Regeneración ósea guiada por TUTOPLAST (Pericardio de bovino) Placa absorbible  
Cambios ocurridos durante la permanencia de la placa de hidroxiapatita para reconstrucción de cráneo  
Células multipotenciales mesenquimatosas e ingeniería tisular  
Membrana de Teflón no absorbible  
Resorción y formación de tejido óseo alrededor de una prótesis de medpore  
Modulación de la respuesta de heridas  
Placa reabsorbible (Lactosorb)  
Implantes aloplásticos prefabricados  
Proteína morfogenética Placas de ácido Poliglicólico y ácido poliláctico  
Biomateriales  
Injertos Óseos  
Regeneración Tisular  
Proteína Morfogenética 7  
Angiogénesis  
Reconstrucción de cartílago y hueso  
Regeneración ósea  
Medicina Biomolecular e Ingeniería Tisular  
Diferentes clases de hidroxiapatita  
Osteinducción de la duramadre por regiones  
Efectos de la hidroxiapatita en el crecimiento craneofacial inmaduro  
Cultivo de osteoblastos  
Hueso desmineralizado  
Osteogénesis de defectos craneales  
Cianoacrilato  
Duramadre  
Ingeniería Tisular  
Aloinjerto deshidratado  
Injertos óseos



## VARIABLES INDEPENDIENTES

Principales variables independientes

Defecto en la calota de conejo de 8mm<sup>2</sup>  
Defecto en la tibia derecha de conejo de 3 mm<sup>2</sup>  
Cerámica de hidroxiapatita en cráneo humano  
Formación hueso Nuevo en cráneo humano  
Placa de medpore colocada en defectos óseos.  
Concentrado plaquetario  
Cirugía craneofacial en 1883 niños  
Defectos de cráneo por cáncer y trauma en 3 pacientes adultos  
Regeneración ósea  
Deformidades en cráneo en 85 pacientes con placas absorbibles  
Regeneración tisular guiada  
Injerto óseo para regeneración ósea en 17 minicerdos  
Función microvascular  
Hueso desmineralizado y células de la medula ósea  
Substrato mineral en hueso  
Osteogénesis de la duramadre escamosa y condrogénesis y Osteogénesis de la duramadre sutural  
Hidroxiapatita  
Diferenciación de osteoblastos  
Formación Hueso Nuevo en cráneo de conejos  
Efectos de histotoxicidad de Cianoacrilato  
Factor 2 de crecimiento de fibroblastos  
Células de periostio  
Mantenimiento de volumen óseo

## VARIABLES DEPENDIENTES

Las principales variables dependientes fueron:

Tejido autólogo, Caprotite, Células de la medula ósea  
Solución salina, ampicilina sulbactam  
Cambios histológicos después del uso de la placa y formación de hueso  
Regeneración ósea guiada  
Formación de hueso muy cerca de la superficie de medpore  
Tejidos blandos en cicatrización  
Evolución de los pacientes con malformaciones craneales con placa reabsorbible y fijada con tornillos  
  
Reabsorción de la placa  
RTG sola y RTG con sustituto óseo



Inducción de hueso en cantidad, calidad y interrupción del desarrollo craneal  
Reparación ósea  
Hematopoyesis  
Angiogénesis  
Inducción de hueso y cartílago  
Periostio, hueso parietal y duramadre  
Células de duramadre inmadura  
Inducción ósea  
Dura, Pericráneo y tejidos adyacentes  
Fijación del esqueleto facial  
Efectos autocrinos y paracrinos  
Reparación ósea  
Malformaciones craneofaciales  
Hueso esponjoso o cortical

#### PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Los resultados de los estudios experimentales fueron sometidos a pruebas estadísticas para saber si estos eran estadísticamente significativos:

ANOVA Y SPSSPC v10

Prueba de Mann-Whitney

$\chi^2$  cuadrado para heterogeneidad

Prueba de Fisher

Prueba de Student-Newman-Keuls

T de Students (Esta fue la más usada)

SPSS Chicago III, Prueba de T pareada con corrección de Bonferroni

#### RESULTADOS PRINCIPALES

#### AUTOINJERTOS Y ALOINJERTOS OSEOS

El uso clínico de injerto óseo es ampliamente conocido en cirugía craneofacial, pero la dinámica de la integración del injerto de hueso en el esqueleto craneofacial nunca ha sido bien caracterizado. Trabajos previos demostraron que el mantenimiento de volumen de los injertos óseos en la integración y posición es una consecuencia de sus características de la microarquitectura, y su origen embriológico. Nathanson examinó el uso de injerto en modelos de conejo sin embargo sus observaciones estaban limitadas debido a que no estuvieron dirigidos hacia las características de volumen o diferenciación de acuerdo al tipo de injerto, Whitaker en 1989 introdujo el concepto de características biológicas ya que el cuerpo está genéticamente predeterminado con esas características a repetirse constantemente, basándose en forma empírica de que el origen embriológico era el principal determinante de la integración ósea, en el mismo año La Trenta pudo demostrar el mantenimiento de grandes volúmenes y el peso de injertos basándose en la fijación rígida para la sobrevivencia de los injertos, finalmente los injertos usados eran compuestos (cortical y esponjosa). Ozaki y Buchmann examinaron el mantenimiento del volumen del injerto óseo por separado según si era cortical o esponjoso, los resultados apoyaron la



hipótesis de que el patrón de reabsorción del injerto esta determinada por las características de microarquitectura, pero podría ser modificada por las diferencias del ambiente local del sitio receptor del injerto. El propósito del estudio de Rosenthal<sup>32</sup> fue investigar cuales eran las propiedades determinantes del mantenimiento de volumen del injerto óseo colocado en el esqueleto craneofacial, pero puede colocarse en cualquier lugar, la hipótesis fue que el mantenimiento del volumen de un injerto podría ser mejor explicado en base a sus características micro arquitectónicas del injerto (cortical vs. esponjoso) mas que su origen embriológico (membranoso vs. endocondral) y que el determinante primario del desarrollo del injerto óseo es la interacción entre las características micro arquitectónicas del injerto y el ambiente mecánico local en el cual el injerto óseo es colocado. Injertos de hueso cortical y esponjoso fueron colocados de cresta iliaca (origen endocondral) en 25 conejos y hueso cortical fue colocado de la mandíbula (origen membranoso) en cada conejo, 4 orificios por trepanación de 7 mm. de diámetro se hicieron en el cráneo de cada conejo cada defecto fue llenado con hueso cortical endocondral, hueso esponjoso endocondral hueso cortical membranoso o nada como un sitio control en cada espécimen, Se les hizo eutanasia a los animales a las 3, 8 o 16 semanas, Los cráneos fueron sujetos a microtomografía y características histológicas. El análisis micrótopo gráfico demostró significativo incremento en el volumen del hueso actual desde el día 0 hasta el día de la muerte en todos los animales en todos los tipos de injertos, El hueso cortical demostró significativo incremento en el volumen ocupando el espacio en todos los puntos. a las 16 semanas no había diferencias estadísticamente significativas, para el volumen o el espacio ocupado de acuerdo al tipo de injerto no hubo reabsorción en ningún injerto, al contrario todos los tipos de hueso mostraron aumento de volumen, las células de la esponjosa demostraron la mayor capacidad para incrementar el volumen óseo, todos los tipos de injerto tuvieron in cierto estado de volumen óseo como si estuvieran controlados por algún tipo de regulador local. El regulador es el ambiente mecánico local en el cual el injerto fue colocado. Esto fue corroborado por los hallazgos de que el hueso injertado incorporaba las características de donde fue colocado más que mantener sus características nativas.

La cirugía craneofacial frecuentemente requiere el uso de injertos óseos, por lo tanto los autoinjertos son el procedimiento estándar para injertos óseos, algunas veces no es posible obtener el injerto por los riesgos que esto conlleva. El uso de aloinjertos provee una alternativa razonable a la necesidad de material, el aloinjerto deshidratado soluble es un proceso múltiple por el que se obtiene este, en el cual el hueso de cadáver humano es procesado por baños con cambios osmóticos y esterilización gamma, este proceso elimina los riesgos de transmisión de infecciones, disminuye la antigenicidad sin alterar las propiedades mecánicas del hueso.. Este aloinjerto deshidratado fue usado para la reconstrucción de deformidades craneofaciales en 24 pacientes entre 1988 y 2002 Vargel<sup>31</sup>. La resorción de los aloinjertos y el resultado de la intervención quirúrgica fueron evaluados con placas radiográficas y TAC tridimensional 12 meses después de la cirugía, en 21 pacientes. Las pruebas serológicas para anticuerpos de VIH, hepatitis B y Hepatitis C fueron realizadas. Las biopsias fueron tomadas de donde se tomó el injerto. El seguimiento a largo plazo en este grupo fue de 30 meses (rango de 8 a 60 meses), los resultados de pruebas serológicas fueron negativas en todos los pacientes 71% de los pacientes (15 de 21) no mostraron reabsorción con fusión total o parcial del

aloinjerto, un paciente mostró pérdida total del injerto, y los restantes 5 pacientes tuvieron 10 a 25% de reabsorción. La fijación rígida del aloinjerto, el contacto del aloinjerto con la duramadre y el periostio y la prevención de espacios muertos alrededor del aloinjerto son los factores más importantes para tener resultados satisfactorios, por lo tanto este método puede utilizarse con buenos resultados en casos seleccionados

Concannon<sup>26</sup> En 55 conejos New Zealand 1 cm de longitud en el fémur fue resecado, aproximadamente 20% de la longitud total. El fémur fue reconstruido con una placa mandibular de titanio, cubriéndolo completamente. En 38 animales esta cobertura fue llenada con hueso desmineralizado para inducir que se forme hueso en el defecto. En el grupo 1 (n=23) la placa se dejó en su sitio durante todo el estudio (12 meses), en el grupo 2 (n=15) la placa fue retirada a las 8 semanas de colocado el hueso desmineralizado y se siguió también por 12 meses, en el grupo 3 (n=10) no se colocó algo en el defecto, en el grupo 4 (n=7) el defecto fue reparado con injerto autólogo. En todos los animales que recibieron hueso desmineralizado la osteotomía se encontraba completamente reparada con hueso nuevo en 6 a 8 semanas, ninguno del grupo 3 de control formó hueso ( $p < 0.001$ ) 86% del grupo control 4 (injerto autólogo) formaron hueso en el sitio de la osteotomía. Además 90% del grupo control 3 no había hueso a las 8 semanas en comparación con el grupo en el que se colocó el hueso desmineralizado ( $p < 0.001$ ). En el grupo 1 el análisis después de 12 meses demostró que era fácilmente fracturable por lo que se considera que la placa mandibular debe permanecer para soportar el estrés. En contraste en el grupo 2 (en la cual la placa fue removida a las 8 semanas) el hueso remodelado e hipertrofiado en respuesta al stress fisiológico del peso del animal al final de los 12 meses fue esencialmente idéntico al fémur normal.

Soto<sup>15</sup>, El empleo de injertos óseos como alternativa de reconstrucción de defectos óseos, ya sean congénitos u ocasionados como traumatismos, secuelas oncológicas e infecciosas, tienen como finalidad restablecer la integridad anatómica y funcional de una estructura alterada. Durante décadas, los investigadores se han dado a la tarea de encontrar en los injertos ciertas características que respondan a cada una de las necesidades de reconstrucción. Este hecho ha llevado a estudiar y comparar algunas características de las estructuras óseas potencialmente donadoras, que incrementen las probabilidades de éxito del tratamiento y disminuyan considerablemente los posibles riesgos del tratamiento durante la toma de injerto. De igual manera se han estudiado diversos materiales implantológicos, sin embargo, estos no poseen la capacidad natural de inducir el proceso de regeneración ósea, haciendo de ellos materiales inertes biocompatibles de relleno que no substituyen las características de los injertos, pero utilizados conjuntamente, si así se requiere, pueden mejorar los resultados.

## IMPLANTES

Barbos<sup>8</sup> En el implante que estuvo 40 días la superficie de medpore no muestra crecimiento óseo, observando una amplia zona de interfase donde el hueso trabecular está completamente ausente, la porción media e inferior estaba rodeado por hueso cortical y evidencia macroscópica y un gran área de contacto con el

hueso, pero no había signos de aposición ósea, tampoco resorción ósea del fémur. En el implante de 11 meses en la superficie del medpore de la prótesis de fémur hay aposición y crecimiento óseo y finalmente el hueso cortical se ve mas osteoporotico que la pieza de 40 días. El implante de 2.5 años se encontraba completamente cubierto en el tercio inferior de la superficie de medpore

Sherman 28 Las placas y los tornillos proveen una estabilidad convencional para la fijación craneofacial, proporcionando la flexibilidad necesaria y resultados cosméticos aceptables para procedimientos de reconstrucción, se ha documentado bien que algunas de las técnicas mas modernas de fijación dan un retraso en el crecimiento del cráneo principalmente en pacientes pediátricos. Los sistemas de microplacas son complicados, requieren experiencia para su aplicación adecuada y tiempo extra en el quirófano, por lo tanto se intenta buscar un nuevo método de fijación, el butil-2 Cianoacrilato es fácilmente aplicable, biocompatible, resistente, bioreabsorbible que provee una alternativa de fijación , el objetivo de este estudio es determinar si la fijación con cianoacrilato de un colgajo óseo en una craneotomía en conejos es un método seguro para fijación en cirugía craneofacial, también investigando la respuesta inflamatoria al tejido adyacente incluyendo la piel cabelluda cráneo y cerebro. En 33 conejos adultos se elevo un colgajo óseo, el hueso fue fijado en el grupo 1 con cianoacrilato (n=3), en el grupo 2 con microplaca y tornillos(n=14) y otro fue colocado sin fijación en el grupo 3 (n=6). La cicatriz fue normal y no hubo cianoacrilato residual con inflamación perifolicular, linfocitos y fibrosis dérmica. En el cerebro había 2 de los 13 conejos que demostraron polímetro residual en la superficie del cerebro con una moderada presencia de astrocitosis a las 8 semanas del postoperatorio, no hubo evidencia de meningitis o necrosis cortical asociada con el polímetro, los animales en donde se fijo con placa y tornillo o sin fijar tuvieron reportes histológicamente normales, la posibilidad de efectos tóxicos directos con el cianoacrilato fue estudiado mas en un segundo estudio donde el polímetro fue colocado directamente sobre la superficie del cerebro, y este fue bien tolerado sin evidencia significativa de respuesta inflamatoria o necrosis. Hueso: el análisis histológico fue realizado por análisis cuantitativo de hueso sano, en el grupo control el hueso se encontraba con pérdida de estroma fibroadiposo entre el periostio y el hueso, 2 de los 6 animales no mostraron formación de puentes óseos a lo largo de la osteotomía, en los conejos fijados con placa y tornillos, todos los especímenes tuvieron conectividad ósea a lo largo de la osteotomía con actividad oseteoblastica, en los conejos que se hizo la fijación con cianoacrilato había células parecidas a osteoclastos en el defecto óseo, la degradación del polímetro fue directamente adyacente a la isla de actividad ósea similar a la que se encontró en el grupo que se fijo con la placa. El análisis microdensometrico revelo ser equivalente la densidad ósea en el grupo del cianoacrilato y la placa tendiendo a una menor densidad en el último grupo (p=0.11 y 0.09 respectivamente)

Taub 11 El paciente 1 se encuentra bien y no ha mostrado complicaciones luego de 2 años de seguimiento; el paciente 2 tuvo un seguimiento de 1.5 años sin complicaciones y murió por enfermedad metastásica; el paciente 3 ha tenido un seguimiento de 3 años sin complicaciones con un adecuado contorno cefálico.

## PLACAS ABSORBIBLES

Asland 4 Se dividieron los conejos en forma aleatoria y se estudiaron histológicamente los casos a los 10, 20 y 30 días. En el grupo de 10 días los defectos cubiertos con la membrana esponjosa reabsorbible, la formación ósea se vio en el suelo del defecto no había medula ósea activa; se observó hueso nuevo en la base y a los lados del defecto en el grupo control el delgado hueso estaba compuesto por tejido conectivo y que contenía células con nucleolo y estructuras vasculares, también se observó en algunos casos que el defecto se encontraba lleno de tejido conectivo fibroso. Día 20 del PO La regeneración ósea guiada se vio en 6 casos y en otros 4 casos hubo evidencia de unión fibrosa, tejido esponjoso se observó en 6 casos uno de ellos con hueso activo y uno de los 10 casos mostró actividad de medula ósea; en el grupo control había 6 casos de tejido osteocondral y en el resto de los casos la fibrosis había progresado, en un caso no había formación de hueso ni actividad celular. Al día 30 en el grupo de la membrana, unión osteocondral se observó en todos los casos 6 de ellos mostraron formación activa de hueso y 4 tenían hueso nuevo maduro. En el grupo control la formación osteocondral fue observada en 6 casos y en 4 casos se encontró tejido de unión fibroso, en 6 casos se formó tejido esponjoso y en 1 caso se observó hueso activo nuevo.

Eppley 10 Las infecciones postoperatorias fueron reportadas en 8 pacientes 0.4%, de esos 8 pacientes 5 tuvieron infección en la herida y fue tratada con antibióticos orales hasta la resolución de la infección. En 2 pacientes la infección fue tratada hospitalizándolos y manejo antibiótico IV sin cirugía y un paciente requirió reoperación para drenaje e irrigación seguido de antibiótico IV, Una infección importante se definió como aquella que requirió rehospitalización con antibiótico IV o cirugía que fue de 0.2% (4 pacientes). Todas estas infecciones se detectaron dentro de las 6 semanas posquirúrgicas con una media de tiempo de 16 días, ninguna infección a largo plazo se presentó (meses o años). Resorción y pérdida de hueso ocurrió en el postoperatorio inmediato en 5 pacientes (0.3%) requiriendo reoperación en el postoperatorio inmediato (las 6 semanas). La mayoría de esos casos (4) estuvo relacionada con un trauma 3 por caída y uno por golpe directo, resultando en ruptura o fractura de una placa. La reacción a cuerpo extraño fue (> 3 meses de la operación inicial) fue en 12 pacientes (0.7%) observándose como un área de escalpe o formación de quiste (se presentaron entre los 4 y 10 meses posop). Todas esas se resolvieron sin necesidad de antibiótico solo uno tuvo que ser resuelto con drenaje percutáneo (0.06%) La reoperación resultó un problema relativo que se requirió en 4 pacientes (0.23%).

13 Eppley El seguimiento a largo plazo incluyó 24 pacientes de 24 meses de posop, 29 pacientes con 18 meses, 32 pacientes con 12 meses y 23 pacientes con 6 meses de posoperados. No encontramos complicaciones incluyendo infecciones en el sitio del implante, colapso o reabsorción ósea y alteración cerebral. Pero el primer año de posoperados. No hubo evidencia de reabsorción ósea alrededor de la placa al año del postoperatorio comprobada en las Rx, No hubo diferencias en el hueso. En las radiografías seriadas se demostró que el hueso había crecido alrededor de la placa. 4 pacientes requirieron una revisión postoperatoria debido a que se habían movido los tornillos, 2 con escalpe y 1 requirió revisión de la cicatriz por desplazamiento del tornillo y retiro en 1 caso por una nueva craneoplastia por hidrocefalia. Se realizó una revisión directa de la placa en 22 casos, con un tiempo adecuado al esperado para la reabsorción de las mismas, en el sitio no se observaron trazos residuales de



polímetro, a la exploración visual, todos los sitios estaban completamente libres de osteolisis.

## BIOMATERIALES

**Gosain 14 HUESO AUTOLOGO:** En una serie de 73 craneoplastías con hueso autólogo sin subsecuente infección los autores citan la seguridad y eficacia del mismo, estos autores notaron que la reabsorción de hueso autólogo puede ser problemático en ciertas situaciones, principalmente en reconstrucción malar, en pacientes con Tricher C. Sin embargo con materiales aloplásticos se encontraron muchas dificultades en las situaciones de reconstrucción debido a la erosión sobre el hueso receptor. **METILMETACRILATO:** Tiene un gran uso en la reconstrucción traumática, en craneoplastía se ha dicho que hay una reabsorción variable del 25 y 45% pero esto no es verdad ya que en un meta-análisis de 45 estudios de craneoplastías de rutina con MMC mostró una tasa de infección de 5%, además Manson et al realizaron 42 craneoplastías usando metil metacrilato sin un solo caso de infección. Sin embargo los pacientes con reconstrucción de la bóveda craneana, pared orbitaria y nariz tienen un rango de infección de 23%. Todos estos pacientes han mostrado una historia de infección previa, indicando esto una historia de infección en la región como un factor significativo de riesgo para infecciones subsecuentes. El MMC fue usado por unirse fuertemente al hueso, además de ser de bajo costo El MMC es el material de elección en adultos con tejidos blandos de buena calidad sin antecedente de infección, sin embargo el MMC es una sustancia inerte y fija que no se adapta a los cambios del esqueleto craneofacial, esto es una importante particularidad en casos de esqueletos en crecimiento, y una adicional desventaja de metil-metacrilato es que no hay incorporación al hueso en crecimiento. **HIDROXIAPATITA:** Es un material que permanece un gran tiempo sin reabsorber con mínimo hueso en el centro del material implantado, la experiencia clínica indica que la hidroxiapatita es un excelente biomaterial para la reconstrucción de bóveda craneana y no hay evidencia histológica significativa de incorporación de hueso o reabsorción de este biomaterial en humanos después de un período mayor a 3 años. **MEDPORE:** Es usado comúnmente para el aumento facial y la restauración de los defectos craneofaciales, la porosidad de este biomaterial permite al hueso y tejido blando incorporarse bien a los defectos, en un estudio comparativo de medpore vs. silicón para reconstrucción del piso de la órbita en conejos demostraron que los implantes de medpore eran mas fuertes en su adhesión al hueso y tejidos blandos, los implantes de silicón demostraron una cápsula de tejido fibroso sin fijación al esqueleto. El medpore mostró aumento de vascularidad en tejidos blandos en 1 semana y crecimiento óseo en 3 semanas. **HUESO DESMINERALIZADO:** En un estudio de hueso desmineralizado para defectos de cráneo hubo desarrollo de hueso nuevo a las 8 semanas postimplantación, el crecimiento de nuevo hueso fue mayor en el sitio donde el implante se encontraba cerca de la dura formando continuidad con el hueso y el implante, en 4 años de seguimiento de hueso desmineralizado para reconstrucción craneal Salyer et al, fundamentaron la persistencia de hueso desmineralizado no vital en la mayoría de los implantes. Un avance de estos biomateriales está en los poros y en su facilidad

de moldeamiento a los defectos, este material no es duro pero intenta servir como una matriz para hueso en crecimiento.

## HIDROXIAPATITA

Hobart<sup>24</sup> realizó un estudio de los efectos de los gránulos de hidroxiapatita sobre el crecimiento del cráneo en mini cerdos. En 40 animales se estudiaron 20 inmaduros de menos de 4 semanas y 20 maduros de más 6.5 meses como control, se hicieron 4 grupos cada uno tenía 5 animales inmaduros y 5 maduros se hicieron gránulos de hidroxiapatita mezclada con sangre y colágeno de fibrina, en el grupo I solo se levanto y retiro el periostio parietal, el grupo II se colocó hidroxiapatita entre el periostio elevado y el hueso parietal, el grupo III se hizo una craniectomía de 1x1 cm. posterior a la sutura coronal sin cruzar la línea media el grupo IV se hizo una craniectomía de 1x1 cm. posterior a la sutura coronal sin cruzar la línea media y se reconstruyó el defecto con gránulos de hidroxiapatita entre la dura y el periostio. Todos los animales sobrevivieron al estudio no hubo complicaciones intraoperatorias ningún animal mostró anomalías en el grosor o contorno en el cráneo, no hubo diferencias estadísticamente significativas  $p < 0.05$  en las medidas entre los animales inmaduros y en la mayoría de los animales maduros del grupo control, no hubo diferencias estadísticamente significativas  $p < 0.05$  intra o intergrupales entre el lado derecho e izquierdo al medir la distancia entre el canal auricular externo y el foramen infraorbitario. macroscópicamente todos los sitios se encontraban totalmente incorporados al cráneo, los animales con implante de hidroxiapatita (grupo II y IV) el examen macroscópico no mostró evidencia de migración del implante y todos los implantes aparecen incorporados. Histológicamente de la sección quirúrgica reveló que no había migración de la hidroxiapatita entre el hueso craneal y la dura alrededor del hueso en crecimiento y los gránulos de hidroxiapatita había gran cantidad de material fibroso en animales maduros e inmaduros, ninguno de los animales mostró completo hueso en la totalidad de la craniectomía. No hubo proceso inflamatorio o reacción a cuerpo extraño.

En los cambios histológicos en vivo en reconstrucción craneal con hidroxiapatita en pacientes humanos reportados por Okii<sup>5</sup> la placa de hidroxiapatita se encontraba adherida a la piel de manera irregular, ligeramente adherida a la duramadre, excepto a la duramadre artificial, la formación de hueso nuevo se observó en los gránulos de la hidroxiapatita a través de puentes entre el cráneo y la placa de hidroxiapatita. Histológicamente se encontró que había formación de hueso en forma tridimensional, la formación de hueso fue mayor en la placa del lado de la duramadre que del lado de la piel y de la misma forma sobre la duramadre normal que sobre la artificial. Se encontraron osteones en los poros de la placa de hidroxiapatita.

La búsqueda de un sustituto apropiado para hueso ha existido por tanto tiempo casi como la cirugía misma desde metales con sus grandes limitantes hasta la actualidad los llamados biomateriales, desde los años 20's se ha investigado la hidroxiapatita que es el principal componente mineral de los dientes y los huesos. En las pasadas décadas se ha visto un remarcado avance en el desarrollo y uso clínico de la hidroxiapatita, hay dos formas una forma con macroporos de tipo cerámico y otra de tipo no cerámico y ambas se utilizan para la cirugía reconstructiva. La hidroxiapatita junto con hueso autólogo, aloinjerto de hueso y hueso desmineralizado se ha usado para la reconstrucción esquelética del cuerpo y para aumento. En ciertas

situaciones se le confiere claro avance sobre otras opciones. Sin embargo la hidroxiapatita no es osteoconductiva y esto puede ser ciertamente restrictivo en algunas reconstrucciones. Además la durabilidad a largo plazo de esos componentes en relación a aumento o reconstrucción aun requieren más estudios. Robert22

## ANGIOGENESIS

Hay cambios secuenciales en la función vascular y función micro vascular durante la reparación ósea Algenstaedt<sup>18</sup> Se reporta la función y dinámica morfológica y proceso multifacético de la angiogénesis y los parámetros microcirculatorios durante el proceso de reparación ósea trasplantados en fémur. Simultáneamente con el desarrollo de un hematoma se incrementa la permeabilidad que primero se detecta con la alteración funcional la cual da una adaptación estructural incrementando la densidad vascular, consecuentemente la demanda en incremento del flujo sanguíneo fue inicialmente aumentada por un incremento en la tasa del flujo mediada por la velocidad y el diámetro de adaptación. Con el incremento de la densidad vascular la tasa de perfusión tisular aumenta y actualmente estimula la tasa de flujo sanguíneo en 1 solo vaso disminuido, un grupo control con fémur inactivo fue usado para excluir la posibilidad de que la actividad mecánica alterara la microcirculación. En el grupo control no encontramos adaptaciones funcionales o estructurales, también la recalcificación de un defecto en una férula en elongación o crecimiento se observó en el grupo no inactivo, esto no ocurrió en el grupo control. Las propiedades de la microcirculación gobiernan no solo la eficacia de la liberación de sustratos sino también microcrecimiento metabólico el cual es esencial para la regulación de la expresión génica. La dinámica de alteración de la microcirculación luego de la destrucción de la integridad ósea son esenciales para la angiogénesis y osteogénesis, aquí se demostró la alteración secuencial: Incremento en la permeabilidad microvascular es el paso esencial e inicial de la angiogénesis, la expresión de la permeabilidad induce citocinas como factor de crecimiento vascular endotelial que se eleva en el hueso y en los tejidos circundantes durante la reparación ósea. Consecuentemente los parámetros microvasculares pueden ser alterados primero después de la destrucción ósea con un incremento significativo en P, porque el incremento de la densidad de los lagos vasculares representa la alteración de la vascularidad pre existente. El incremento significativo de la región de vasos en el sitio de reparación ósea es lo que se observa aproximadamente al día 16 ya que al día 8 hay aumento solo de la permeabilidad, hay disminución de la concentración de citocinas angiogénicas a través de la absorción del hematoma. La posibilidad de que el estrés mecánico induzca lagunas de plasma es desconocido. El incremento en la permeabilidad (causa de las lagunas de plasma) es el incremento del tamaño de los poros los cuales sirven para la liberación también de sustancias. La nueva formación de vasos se caracteriza por vasos de pequeño diámetro con una alta velocidad de flujo y no hay alguna alteración en la reparación ósea por el diámetro de los vasos en el día 4 o el 16. Predicativamente hay una correlación entre el tamaño inicial del defecto y la extensión del defecto descalcificado remanente en el día 16, también la dimensión del defecto inicial correlaciona positivamente con la permeabilidad efectiva de la microvasculatura. Un efecto significativo de los parámetros de microcirculación en un fémur en crecimiento no se

observó aunque la elongación es por si mismo hasta ahora un fenómeno no muy bien conocido. El análisis en vivo del proceso de calcificación durante la reparación ósea sugiere una completa calcificación a los 16 días, la histología reveló que la osificación endocondral dan una completa regeneración al día 16 la completa regeneración puede llevar un largo proceso de osificación.

**Inducción de Angiogénesis:** Al determinar el efecto del factor de crecimiento endotelial vascular liberado en los vasos sanguíneos en crecimiento en un modelo de defecto de hueso, Murphy<sup>20</sup> implantó algunos andamios en los defectos de tamaño crítico en el cráneo de ratas. La densidad de los vasos sanguíneos presentes en los andamios de polilactocoglicólido (PLG)-1 andamios mineralizados de PLG-2 y andamos mineralizados con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-3 fueron medidos luego de 2 semanas postimplantación. Los cortes histológicos señalaron relativamente poco flujo sanguíneo en el grupo 1 y 2, al contrario en el grupo 3 los andamios mostraron una gran densidad de vasos sanguíneos colocados entre los andamios. La cuantificación de vasos sanguíneos a través de la superficie total de los andamios confirma que los andamios mineralizados y con factor de crecimiento endotelial vascular tienen una mayor densidad de vasos sanguíneos que los mineralizados o con VEGF. Pero además la región central del implante del grupo 3 contiene mas vasos que el grupo 1 y 2.

**Regeneración Ósea:** El efecto de la presencia biomineral y la inducción de la angiogénesis en la regeneración de tejido óseo dentro de los defectos de tamaño crítico luego de 14semanas fueron analizadas, en contraste en un defecto no tratado el cual mostró solo mínima regeneración aposicional con una delgada capa de tejido fibroso, los defectos tratados con andamios mineralizados y factor de crecimiento endotelial estaban completamente puenteados con tejido. Los puentes del defecto del área con tejido parecen similares a baja magnificación para los 3 grupos experimentales, sin embargo la interfase entre el hueso nativo y el implante fue inicialmente tejido fibroso en el grupo control, había tejido óseo en la misma región en los siguientes 2 grupos. Subsecuentemente ese tejido fue mas específico para la presencia de matriz osteoide y tejido mineralizado para la confirmación del tejido óseo en crecimiento dentro de los andamios. Histológicamente el análisis indicó que fueron pequeñas regiones de matriz osteoide dentro del interior de los andamios control, y una gran cantidad de tejido osteoide en cada condición experimental. Hubo un incremento estadísticamente significativo en tejido mineral funcional en el grupo 3 en comparación con el 1 y 2 indicando que la angiogénesis permite una mineralización más completa para regenerar el tejido en el área afectada

La inducción de vascularización en matrices de polímero y la generación de largos volúmenes de tejido vascular son conceptos de gran interés para la generación ósea, por lo tanto la prevascularización de los poros de tejidos óseos por medio de un canal arteriovenoso aumenta significativamente el numero de osteoblastos injertados en estudios preliminares Kneser<sup>3</sup>

Un gel con concentrado plaquetario, es 5.8 veces mayor en su contenido que en sangre periférica, por lo tanto los implantes, injerto dérmico acelular que se habían irrigado con el concentrado en comparación con los implantes e injerto control en el estudio realizado por Sclafani<sup>9</sup> se encontró diferencia estadísticamente significativa en fibroblastos y conteo de células endoteliales a los 7 días de el tratamiento (fibroblastos 61%  $P < 0.001$  en los implantes de polietileno y 52%  $p < 0.001$  en los



injertos; capilares 95%  $p < 0.05$  en polietileno y 97% en los injertos) El conteo linfocitario se incrementó 71%  $p < 0.001$  y 100%  $p < 0.05$  en los implantes e injertos respectivamente y las células endoteliales son sumamente importantes para la osteogénesis, como lo demuestra la ingeniería tisular donde el factor de crecimiento endotelial que se libera de las plaquetas acelera el crecimiento de osteoblastos

## REGENERACION TISULAR GUIADA

Gosain<sup>27</sup> \*La reconstrucción de defectos óseos para anomalías congénitas o luego de pérdida ósea traumática o neoplásica representa un gran problema en cirugía craneofacial. La habilidad de la calota para regenerar esos sitios se limita con el paso de los años, el método ideal para facilitar la regeneración ósea no existe, algunas investigaciones han señalado el uso de autoinjertos o aloinjertos con hueso desmineralizado como una buena opción. Algunos materiales se han usado con las desventajas asociadas de la aplicación de un cuerpo extraño, La remodelación y resorción de hueso injertado puede ocurrir debido a una inadecuada cobertura de tejido muscular periférico, los materiales aloplásticos no son predecibles en proveer la formación completa de hueso y su uso en reparaciones craneofaciales son limitadas. El uso de matriz ósea desmineralizada y los factores de crecimiento derivados de la matriz ósea en la regeneración de la calota es promisorio, El prolapso de los tejidos blandos adyacentes y la rápida migración de fibroblastos dentro de los defectos óseos ha sido descrito como un obstáculo para la regeneración ósea. La base de la regeneración ósea guiada es el uso de membranas de barrera para prevenir que los tejidos blandos adyacentes y los fibroblastos entren en el defecto y facilitar la repoblación de células productoras de hueso y se ha visto aumento de la Osteogénesis en experimentos con este método, hay múltiples factores que afectan la reparación ósea incluyendo las propiedades osteogénicas del pericráneo y de la dura, el periostio provee flujo sanguíneo al hueso cortical y células osteoprogenitoras para la regeneración ósea, la dura también ha mostrado contribución para la reosificación pero este potencial varía con la edad animal. Un orificio en forma bilateral en la región parietal de la calota de 100mm<sup>2</sup> fueron realizados en 16 animales inmaduros y 16 maduros, los defectos parietales fueron aleatorizados en 1 de 4 grupo dependiendo del sitio donde se colocó una membrana de politetrafluoroetileno en la dura o/y el pericráneo, los animales fueron sometidos a eutanasia a las 12 semanas, el análisis histológico fue realizado para cuantificar el área del defecto original del hueso, la nueva formación ósea y la densidad del nuevo hueso, la formación ósea fue cuantificada separadamente tanto en la periferia como en el centro del defecto, la formación del hueso externo fue también cuantificado en el lado de la dura y el pericráneo, la regeneración ósea fue incompleta en todos los grupos a las 12 semanas de estudio. La dura fue más Osteogénica que el pericráneo en animales maduros e inmaduros, hubo más hueso alrededor del defecto en el lado dural en el grupo donde se colocó la placa de PTFE y el crecimiento fue significativamente mayor en los animales inmaduros que en los maduros, la dura parece ser una base importante para el nuevo hueso central debido a que en los grupos donde se bloqueó la dura y el grupo de la placa de PTFE resultó en una disminución significativa en la densidad del hueso central del defecto tanto en animales maduros e inmaduros. Paradójicamente al aislar el pericráneo en animales maduros resultó en una significativa reducción de nuevo hueso en el área,

mientras en el sitio donde si hay pericráneo hay formación de nuevo hueso, en el grupo control hubo la mayor área total de hueso nuevo.

Needleman<sup>16</sup> Los tratamientos actuales para la enfermedad periodontal destructiva (de las encías) no son capaces de restaurar el hueso y el tejido conectivo dañados que sirven de apoyo para los dientes. Por lo tanto hay limitaciones en el tratamiento de los pacientes con enfermedad avanzada. La técnica quirúrgica (regeneración tisular guiada) quizá puede lograr regeneración y en consecuencia mejora los resultados quirúrgicos convencionales. Los resultados de esta revisión han demostrado determinada ventaja en el uso de RTG en los defectos intraóseos, pero con amplias variaciones en los beneficios que pueden lograrse en comparación con la cirugía convencional. No se pudieron identificar de una manera concluyente los factores determinantes de esta variabilidad. Por consiguiente los pacientes y los profesionales de salud deben considerar la previsibilidad de la técnica en comparación con otros métodos de tratamiento, antes de tomar decisiones finales sobre el uso. Por lo general los efectos adversos del tratamiento fueron menores y similares entre los grupos, aunque con un tiempo de tratamiento mayor para la RTG. Se recomienda investigación adicional para abordar el tema de la variabilidad y para identificar las características de la enfermedad o el paciente que estén más claramente asociadas con un resultado beneficioso.

Bidic <sup>1</sup> Los resultados sugieren que el uso de la placa de Caprotite para defectos de cráneo de conejos no tiene diferencia significativa con los otros grupos

Hernández <sup>7</sup> Después de 5 meses de la primera fase quirúrgica, se procedió al descubrimiento del implante <sup>22</sup> y retiro de las membranas encontrándose clínicamente tejido óseo neoformado, pero en el diente <sup>11</sup> había una menor cantidad de hueso y una ligera fenestración por una eliminación prematura de la membrana de teflón, se dejó cicatrizar <sup>2</sup> semanas luego de la colocación de tornillos de cicatrización e inicia la rehabilitación protésica

## INGENIERIA TISULAR

Tuan<sup>6</sup> Esta revisión se enfocó a las células multipotenciales mesenquimatosas (MSC) las cuales tienen un potencial de diferenciación a condrocitos, osteoblastos, adipocitos, fibroblastos, estroma de medula ósea y otros tejidos de origen mesenquimatoso, interesantemente estas células son huéspedes de diversos sitios en el organismo adulto y poseen la habilidad de "regeneración" para el tipo específico de células de ese tejido incluyendo tejido adiposo, periostio, membrana sinovial, músculo, dermis, sangre, medula ósea y más recientemente hueso trabecular. Actualmente el aspirado de medula ósea es considerado como el método más accesible para obtener células multipotenciales, también el hueso trabecular puede ser considerado como una alternativa. El uso de biomateriales sintéticos y naturales para la diferenciación de MCS ha mostrado un incremento promisorio para aplicaciones ortopédicas, especialmente formación de hueso, recientes avances en la producción de biomateriales han permitido la transición de material no poroso biológicamente inerte, a material poroso, material osteoconductor y en particular a compuestos de matriz celular, para obtenerlo se requieren de ciertas propiedades fisicoquímicas como un área de superficie, porosidad, acidificación local, material químico, dimensional, arquitectura, integridad mecánica, características de degradación y propiedades biológicas para dar soporte celular y permitir la

proliferación, diferenciación, depósito de matriz, angiogénesis, prevención de diferenciación y enriquecimiento para permitir una cantidad adecuada de células. Una gran cantidad de materiales se han usado para depósito de matriz celular con el objetivo de cerrar un defecto óseo de tamaño crítico como la hidroxiapatita, ácido Poliláctico, acidoplilactoglicolico, etc, pero no hay un "tejido de soporte ideal". Debemos considerar seriamente la aplicación de CMS para la regeneración tisular pero 2 preguntas fundamentales que debemos hacernos son: A) Que son exactamente esas células? B) Cual es su función endógena en su tejido de origen?

Groeneveld 12 La regeneración ósea con proteína morfogenética en animales, ha sido actualmente estudiada en humanos y ha mostrado una gran variabilidad en respuesta individual. La concentración de PMG (proteína morfogenética), algunas propiedades activas, factores de crecimiento, hormonas y la presencia de algunas células han mostrado efectos en la actividad de PMG en estudios animales y en experimentos in Vitro. Esta revisión discute estos factores en relación a la aplicación en humanos. Los resultados clínicos sugieren que la concentración necesaria de PMG en humanos depende de las condiciones del sitio del injerto, de los factores de crecimiento locales y sistémicos, la presencia de algunas hormonas y células. Por ejemplo, la tibia esta rodeada por tejido muscular con un buen flujo sanguíneo y un defecto en la tibia tratada con PMG 2 (con 2.5mg/g colágeno) mostró excesiva formación de hueso en 5 de 6 pacientes. El seno maxilar es un área rodeada por hueso maxilar atrófico y mucosa oral, pero el tejido muscular esta ausente, y en estas condiciones el desarrollo anatómico es posible aunque en forma más crítica para la inducción ósea y en este sitio con PMG 2 induce poco o nada de hueso en 2 de 3 pacientes tratados. Los efectos de las PMG han mostrado ser concentración dependiente. La concentración local de PMG pueden ser aumentadas idénticamente de forma externa. El colágeno agregado ha sido usado en estudios clínicos, pero puede resultar en una formación excesiva de hueso en sitios con favorables condiciones y un injerto con sus propiedades puede reducir la dosis total que se requiere para la inducción ósea.

Gurevitch 19 Demostramos que el transplante de células de medula ósea que contiene tanto células Hematopoyéticas como progenitoras junto con matriz ósea desmineralizada resulta en el desarrollo de hueso y microambiente estromal dando hematopoyesis. La distribución de las partículas de matriz ósea desmineralizada están alrededor del nuevo tejido óseo y este es eventualmente remodelado. La nueva forma del microambiente estromal esta muy poblado de células progenitoras hematopoyéticas también contienen en las células de medula ósea o del injerto compuesto resultando en un órgano osteohematopoyético consistiendo de hueso y microambiente estromal que soporta diferenciación normal de células innohematopoyéticas todas originadas del sitio donador derivados de células de médula ósea. Nosotros predijimos en base a nuestros datos que células de medula ósea y matriz ósea desmineralizada compuestos pueden ser usadas para reemplazar un microambiente estromal anormal para la reparación de tejido hematopoyético en cavidades de medula ósea en un solo procedimiento .

Springer 17 Inicialmente los animales pesaban 4 a 6 Kg. y ganaron en promedio 25 Kg. en el tiempo del estudio, el diámetro del cráneo se incrementó en 16.4% y el diámetro transversal 4.3%, al final del estudio no hubo asimetría en el crecimiento del cráneo en algún animal. Cuando comparamos el lado experimental del grupo 2 y 3 no hubo diferencias estadísticamente significativas en la formación vertical del hueso en algún punto durante el experimento  $p > 0.1$ . La TAC visualizó en el grupo 1 regeneración ósea espontánea resultando en una disminución del tamaño del defecto de menos del 50%, las islas de hueso formadas se originaron de la duramadre. La continuidad del hueso fue observada en el sitio donde se formó el defecto en los animales del grupo 2, sin embargo en este grupo pequeñas perforaciones de 1 o 2 mm quedaron residuales, el tamaño de la bóveda craneal quedó asimétrica en comparación con el lado control. En todos los animales del grupo 3 la forma del defecto no fue identificable en la curva y el tamaño de la bóveda craneana apareciendo completamente simétrica, no hubo exceso de crecimiento óseo en el grupo 2 o 3. La microscopia fluorescente mostró expansión craneal centrífuga indistribuida con absorción de hueso en el lado experimental y aposición de hueso en el lado control en el grupo 1 y en ambos lados en el grupo 2 y 3.

Lorenz 21 La medicina Biomolecular es definida como el estudio de la regulación genética de los mecanismos biológicos, favorecido en parte por los proyectos en genoma humano que prometen genoma humano entero en poco tiempo, el impacto de los avances biomoleculares en cirugía plástica en el siglo 21 la era postgenómica será enorme. En la cicatrización de heridas numerosos factores de crecimiento tienen un papel predominante (Tabla 1 página 2468).

## EL PAPEL DE LA DURAMADRE EN LA OSTEOGENESIS

Spector 25 Por décadas los cirujanos han explorado la habilidad de los infantes de reosificar grandes defectos en cráneo, se ha demostrado el rol de la duramadre en comunicación con los osteoblastos durante el proceso de reosificación craneal, los autores usan un novedoso sistema in vitro que recapitula in vivo la relación anatómica de esa población celular, el cultivo primario de osteoblastos de ratas de 2 días de edad se realiza en 6 placas cultivando células de la duramadre inmadura no asociada a la sutura, este sistema de co-cultivo permite que 2 poblaciones celulares en crecimiento permanezcan en contacto. Los autores determinan por primera vez los signos paracrinos de la duramadre inmadura y como influyen en la actividad biológica de los osteoblastos, estos últimos proliferaron significativamente rápido en 2 días en co-cultivo ( $p < 0.05$ ) y en 4 días en cultivo de osteoblastos solo ( $p < 0.01$ ), luego de 20 días el co-cultivo expresó grandes cantidades de mRNA con varios marcadores de diferenciación osteoblastica incluyendo colágeno alfa-1, (4 veces) fosfatasa alcalina (2.5) veces, osteopontín (3 veces) y osteocalcina (4 veces) que el cultivo de osteoblastos solo. Luego de 30 días, el co-cultivo de osteoblastos produjo nódulos óseos que fueron significativamente mayores en número ( $p < 0.04$ ) y un área total mayor ( $p < 0.003$ ) que los osteoblastos solos. Para entender el principio del efecto de las células durales en la expresión genética de los osteoblastos los autores compararon la expresión de los genes candidatos, transformando factor de crecimiento B-1 y factor de crecimiento de fibroblastos 2 en células durales y

osteoblastos antes de 5 días de cultivo, interesantemente la duramadre produjo marcadores de esas citocinas osteogénicas comparadas con osteoblastos

Spector<sup>29</sup> La duramadre es la cobertura de las meninges y es esencial para la morfogénesis de la calota, en la fusión postnatal de las suturas y la reparación ósea de los defectos de cráneo, Numerosos estudios han mencionado el papel fundamental de la duramadre, hay poca información acerca de los mecanismos de regulación de la biología celular de la duramadre durante la osificación de la calota, trabajos hechos previamente por los autores los llevaron a demostrar en el laboratorio que las células de la duramadre no asociada a suturas en ratas de 6 días de edad expresaban altos niveles de factor de crecimiento 2 de fibroblastos cuando se comparaban estos mismos parámetros en ratas de 60 días de edad en donde el nivel de este factor es menor. Debido a que los mamíferos tienen la capacidad de regenerar ciertos defectos en calota, ahora en este estudio se estudia los factores autocrinos y paracrinos del factor 2 de crecimiento de fibroblastos en la proliferación, expresión genética y la producción de fosfatasa de células durales. El cultivo de células durales no asociadas a la sutura fueron establecidas para ratas de 6 días de edad y fueron estimuladas con FGF-2. Las células durales fueron estimuladas con FGF-2 proliferaron significativamente más rápido que células no tratadas a las 24 hrs vs. 48 hrs respectivamente. Sin embargo, las células durales estimuladas con FGF-2 con el marcaje de expresión 7 el antígeno nuclear proliferó mas que el cultivo control.

Yu<sup>23</sup> La esqueletogénesis embrionica requieren íntima interacción entre la superficie epitelial y mesodermo. Observaciones clínicas durante la cirugía de craneosinostosis sugieren que la dura tiene una influencia directa sobre la formación de hueso craneal. Operman demostró que la dura podía inhibir la formación de hueso en la sutura coronal al producir una sustancia soluble similar a la heparina. Sin dura la dura juega un papel central en la morfogénesis del cráneo pero es difícil aislarla ya que en vivo también tiene otros efectos sobre los componentes del sistema nervioso central como líquido cerebroespinal, cerebro y leptomeninges, la dificultad in Vitro es que la duplicación auténtica requiere un microambiente extremadamente complejo. Nosotros buscamos respuesta a 3 preguntas 1) Puede la dura inducir osteogénesis sin la influencia del cerebro 2) Si es así la duramadre heterotópica puede inducir Osteogénesis requiriendo interacción mesenquimal durante la ontogenia 3) Tiene la duramadre alguna diferencia regional, la tercera pregunta es importante ya que da una luz en el reciente descubrimiento de la subpoblación condrogenica dentro de las membranas embrionicas en aves. 30 ratas adultas fueron divididas en 2 grupos en el grupo 1 la dura neonatal fue transplanteda en un orificio epitelio mesenquimatoso al resear todo el panículo subcutáneo y dejar expuesto solo los folículos pilosos (n=20), en el grupo 2 la dura neonatal fe transplanteda en 2 orificios mesenquimatosos (en el espacio entre el tejido adiposo y el músculos latísimo dorsal del colgajo (n=10), 2 tipos de injerto de dura fueron usados dura sutural y de hueso parietal de ratas de 24 hrs de nacidas los orificios se hicieron en la porción caudal de la escápula un orificio en cada lado derecho e izquierdo. La dura sutural se coloco del lado izquierdo y la parietal del lado derecho. Se observo formación ósea en 15 de 18 ratas en el grupo 1 (2 animales murieron por la anestesia) Ninguna de los 10 animales en el grupo 2 tuvieron formación ósea

encontrando una gran cantidad de fibrosis en el área estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) 4 de los 18 injertos de la dura sutural en el orificio epitelio mesenquimatoso mostraron formación de cartílago la dura parietal no indujo condrogénesis aunque no es estadísticamente significativa.

#### .EL PAPEL DEL PERIOSTIO

Breitbart<sup>30</sup> Se ha demostrado que el periostio tiene una población celular, incluyendo condroprogenitoras y osteoprogenitoras, que pueden formar cartílago y hueso en condiciones apropiadas, en el presente estudio el periostio fue retirado y se cultivaron sus células usándose para cultivar defectos de tamaño crítico en calota en un modelo en conejos, el periostio fue aislado de conejos blancos New Zealand y se permitió el desarrollo de cultivos celulares con los análogos de timidina (bromodeoxiuridina) para su localización posterior y se colocaron después en una matriz de ácido poliglicólico absorbible. 30 conejos adultos fueron divididos en 3 grupos, un solo defecto de 15 mm de diámetro de espesor total en cráneo de cada conejo. En el grupo I los defectos fueron reparados usando una placa reabsorbible de ac. poliglicólico implantado con células de periostio. En el grupo II el defecto fue reparado con un implante de ácido poliglicólico no tratado, en el grupo III el defecto no fue tratado. Se les realizó eutanasia a todos los conejos a los 4 y 12 semanas de postoperatorio. El sitio del defecto fue estudiado histológicamente, biológicamente, y radiológicamente. En el análisis in Vitro del cultivo de las células de periostio indicando un fenotipo osteoblástico, con producción de osteocalcina por encima de 1,25, vitamina D, inducción. In vivo los resultados a las 4 semanas mostró islas de hueso en la reparación de defectos con el implante de ácido poliglicólico tratados con células de periostio (grupo 1), los defectos reparados con implantes de ácido poliglicólico no tratados (grupo 2) se encontró tejido fibroso. El contenido de colágeno fue significativamente mayor en el grupo 1 comparado con el grupo 2  $p < 0.006$  fue de mayor peso, después de 12 semanas había largos trechos de hueso en el grupo 1 sin embargo había algunas islas de hueso en el grupo 2 y 3 incluso. La radiodensitometría demostró un incremento significativo de la radiodensidad de los sitios de defectos en el grupo 1 comparados con el grupo II y III. El nivel de bromodeoxyuridine se detectó por inmunofluorescencia, fue identificado en una nueva formación de hueso en el grupo I tanto en la semana 4 y 12, confirmando la contribución de las células cultivadas de periostio en esta formación de hueso

#### OTROS FACTORES

Carvalho<sup>2</sup> En cuanto a ejercicio físico se encontró que los atletas que tienen valores altos de tensión y fuerza tienen un aumento en la formación ósea. Una dieta rica en calcio es importante para mantener una adecuada masa ósea que contiene el 99% de nuestra reserva en calcio. La estimulación eléctrica promueve la permeabilidad vascular local de la médula ósea aumentando el flujo sanguíneo y provoca la osificación. El ultrasonido pulsado de baja intensidad 30mW/cm<sup>2</sup> por 20 minutos diarios provoca el aumento en la regeneración ósea. Algunos estudios de láser helio-neón mostraron efectos benéficos para la Osteogénesis con aumento de la vascularización y acelerando la formación ósea

## CONCLUSIONES

### AUTOINJERTOS Y ALOINJERTOS OSEOS

Vargel 31 El factor más importante en el uso aloinjerto de hueso deshidratado soluble es el contacto del aloinjerto con la duramadre, el periostio y los bordes del hueso nativo, esto permite una cobertura con flujo sanguíneo y actividad Osteogénica, luego de la revascularización, la reabsorción y reemplazo del aloinjerto por osteoblastos son las características típicas de osteoconductividad. En nuestro paciente con reabsorción extensa del aloinjerto, el avance esquelético fue mucho mayor que la expansión del cerebro y el contacto del aloinjerto con la dura no se estableció, esta falla resultó en la pérdida del injerto, 2 pacientes con pérdida de 25% del aloinjerto tenían defectos congénitos craneofaciales severos asociados con extensos defectos de calota. Al disminuir el área de contacto del aloinjerto con el hueso nativo y la dura puede tener un efecto negativo en la migración osteoblastica.

Rosenthal 32 Estos hallazgos indican la importancia de los efectos del ambiente local en los injertos

Concannon 26 En ciertas circunstancias la reconstrucción de los defectos óseos usando técnicas de inducción puede ser tan buena como el injerto autologo con la ventaja de evitar el limitante de la morbilidad del sitio donador.

Soto 15 Indudablemente los injertos óseos y de estos principalmente los auto injertos ofrecen grandes y mayores beneficios comparados con materiales implantológicos (aloplásticos biocerámicos, polímeros) empleados para la reconstrucción de defectos óseos del complejo craneofacial. Las regiones potencialmente donadoras (costilla, cresta iliaca, calota craneal, radio, diáfisis tibial, mandíbula, maxilar, entre otros) proporcionan al cirujano un tipo de injerto idóneo para cada necesidad de reconstrucción por lo que se deja criterio de este su elección y utilización

### IMPLANTES

Barbos 8 Los hallazgos sugieren que existe adaptación y remodelación ósea en las placas de medpore, que la relación de reabsorción y formación ósea está relacionada con el tiempo después de colocado el implante y la formación de nuevo hueso pudo encontrarse cerca de la superficie del medpore.

Sherman 28 El estudio se enfoco a la neurotoxicidad de 20 conejos adultos a las 3 semanas y a las 11 semanas de postoperatorio, encontrando similarmente una ausencia de respuesta inflamatoria al primero, en conclusión el hueso sano y el tejido inflamatorio fue comparado entre el grupo fijado con la laca y el cianoacrilato, encontrando que el cianoacrilato es una forma de fijación que provee una razonable alternativa para una adecuada fijación, sin embargo es necesario continuar con la investigación para identificar su utilización ideal.

Taub 11 Nuestra experiencia con placas para cubierta prefabricadas de polimetil metacrilato para reconstrucción craneal ha sido promisoría, la técnica reduce el

tiempo quirúrgico con adecuados resultados estéticos, la fijación del implante permite una disminución en el espacio muerto, impidiendo el cambio de migración y mal posición con reducción del riesgo de infección.

Gosain 27 El presente reporte posee varias líneas de estudio futuras para optimizar la regeneración ósea en cráneo, 1)El estudio de los animales en base a su edad ya que en los animales infantiles es mas acelerado el crecimiento en relación a los adultos 2)El problema de la regeneración ósea guiada para los defectos de cráneo esta lejos de resolverse 3) El hueso de la periferia y el central deben de ser estudiados separadamente porque el mecanismo de formación de hueso parece ser diferente. Para la reparación de un defecto craneal en un animal adulto puede ser acelerado por la colocación de una membrana tanto de dura como de pericráneo para bloquear el prolapso de los tejidos adyacentes además del beneficio de las propiedades biológicas que la dura y el pericráneo han demostrado

Bidic 1 Los resultados revelan que los defectos reparados con Caprotite no muestran significativa diferencia en la regeneración ósea comparada con los otros grupos sin embargo los defectos reparados con la placa muestran pequeñas islas de hueso y no uniones fibrosas que si se encuentran en los defectos no reparados y en aquellos en donde hubo factores de crecimiento, esto sugiere que la placa promueve la osteogénesis en los defectos pero de una manera muy lenta.

Hernández 7En este caso la técnica de ROG mostró resultados favorables en la formación ósea sobre la dehiscencia y fenestración encontrada sobre los implantes -La cobertura completa de la membrana durante el periodo de cicatrización es crítica para el éxito de la regeneración ósea guiada -Debido a la exposición de la membrana fue necesaria su eliminación prematura, lo cual disminuyó la cantidad y calidad de la formación ósea -Es necesario tener un grosor adecuado de tejido blando para poder llevar a cabo la cobertura completa de la membrana durante el periodo de cicatrización

## PLACAS ABSORBIBLES

Asland 4En un sitio de osteotomía y en defectos óseos, la invasión de tejido fibroso maduro puede resultar en una situación indeseable, incluso mal unión o encapsulamiento por lo tanto el concepto de regeneración ósea guiada puede prevenir estos problemas

Eppley 10La experiencia a largo plazo en múltiples pacientes demostró que las placas de ac. Poliglicólico Poliláctico y los tornillos reabsorbibles de fijación son seguros y efectivos como el metal sin los riesgos adicionales de infección o inestabilidad. Esto elimina la necesidad de un procedimiento secundario y permite un mayor avance, teniendo una baja incidencia de reacción a cuerpo extraño ya que el material es metabolizado y reabsorbido por el cuerpo sin requerir mas tratamiento

Eppley 13Los resultados clínicos, con estas placas de polímero, demostraron seguridad y eficacia para el uso de aplicaciones craneofaciales pediátricas, no se observaron algún efecto adverso a largo plazo en cuanto a reacciones de tejidos blandos o reabsorciones completas del polímero, en los sitios de implantación humana, estudios en animales y otras diversas experiencias en tejidos. Las placas de copolimero parecen ofrecer estabilidad biomecánica similar a los sistemas de micro fijación metálico, determinado por estabilidad operatoria y el mantenimiento



del contorno esquelético. Hay evidencia radiográfica de separación de los segmentos de hueso fijados los cuales indican crecimiento regional de hueso imperceptible. El desarrollo de micro tornillos reabsorbibles que reemplazan a los de metal proveen un completo sistema de fijación craneofacial que puede ser el estándar para la fijación rígida de hueso en hueso craneofacial inmaduro

## BIOMATERIALES

Gosain Esta revisión estudia el desarrollo de los biomateriales mas recientemente usados para la reconstrucción del esqueleto craneofacial, algunos no son biomateriales ideales, hay numerosas alternativas para los injertos autólogos, estos biomateriales particularmente bien situados en el aumento esquelético pueden ser igualmente impredecibles en la reabsorción que el injerto autólogo, todos estos biomateriales la porosidad puede ser un factor significativo para el crecimiento óseo dentro del implante, el MMC no es poroso y no tiene capacidad para formar hueso en crecimiento, Hidroxiapatita tiende a contener microporos, tanto experimental como clínicamente se indica que hay a largo plazo hueso en crecimiento dentro de estos materiales igual en aquellos con macroporos. Los biomateriales de la presente revisión tienen limitaciones incluyendo MMC, HAPT, Medpore. En teoría formas granulares de hidroxiapatita, el nova bond y hueso desmineralizado en pasta pueden remodelarse en el esqueleto craneofacial PERO NO HAY DATOS A LARGO PLAZO EN LA EVALUACION DE ESTUDIOS CLINICOS QUE ESTOS BIOMATERIALES SE ADAPTEN AL ESQUELETO EN CRECIMIENTO

## HIDROXIAPATITA

Hobart 24 Los resultados de este estudio indican que la forma porosa granular de hidroxiapatita puede ser usada para craneoplastias en animales inmaduros y maduros sin evidencia de proceso inflamatorio, migración de los gránulos o restricción o retardo en el crecimiento.

Okii 5 El estudio histológico de una placa y gránulos de hidroxiapatita removida después de su uso in vivo por 2 años y 9 meses, mostraron fusión de hidroxiapatita al cráneo y formación de hueso nuevo, la hidroxiapatita tiene capacidad osteoconductiva, es biocompatible y es el material ideal no absorbible para reconstrucción de cráneo en adultos

Robert 22 Ciertamente la combinación de hueso con factores de crecimiento e hidroxiapatita sintética provee la posibilidad de un implante totalmente sintético ideal para reconstrucción ósea. La investigación en esta campo requiere intenso trabajo sobre la compatibilidad, degradación y dosis respuesta. El objetivo de la investigación debe se hacia el impacto de la hidroxiapatita en el crecimiento y la manera en como podemos usarlo en la población pediátrica.

## ANGIOGÉNESIS

Algenstaedt 18 Las alteraciones secuenciales primero en la vasculatura pre-existente y luego en la nueva formación de los vasos identifican propiedades de la micro circulación que inician un proceso dinámico, la eficiencia es llevada por terapias de modulación adyuvante al mecanismo de reparación ósea que dependerá no solo de

la eficiencia intrínseca pero también del momento en que la terapia sea iniciada, la terapia depende de la liberación de macromoléculas los cuales son más eficientes al momento en que aumenta el tamaño de los poros de los vasos que aumenta la perfusión tisular con aumento de la reparación ósea

Murphy 20 El estudio apoya el concepto de que la angiogénesis puede aumentar la regeneración ósea. Lo anterior sugiere que la angiogénesis permite la diferenciación y/o la maduración de los osteoblastos que han infiltrado y las células precursoras de osteoblastos durante el desarrollo de hueso nuevo probablemente haya liberación de señales solubles osteoconductoras. Los efectos del factor de crecimiento vascular endotelial observado en este estudio corroboró este estudio que este factor tiene un papel muy importante e induce la angiogénesis en la osificación endocondral. Estudios recientes también indican que el VEGF aumenta la migración y diferenciación de osteoblastos y es esencial para la regeneración de tejido óseo.

Kneser 3 La regeneración de tejidos esta basada en el entendimiento de la formación de tejidos y regeneración con un rango de crecimiento hasta la formación de tejido funcional. La reconstrucción de defectos de pequeño y moderado tamaño usando ingeniería tisular es técnicamente factible y pueden ser una alternativa para el injerto de hueso autólogo para ciertas condiciones clínicas como la reconstrucción de grandes defectos óseos. La formación ósea seguida de la inyección de osteoblastos es ahora evaluada para nuevos modelos, en el entendido de que la vascularidad es un elemento importante para la regeneración ósea

Sclafani 9 El tratamiento con concentrado plaquetario preparado que es 5 veces mas base de plaquetas aumenta significativamente la maduración de las heridas pero únicamente los primeros 14 días. La rápida cicatrización de las heridas fue lo que se esperaba en los modelos quirúrgicos, en los cuales se observan los efectos biológicos de una cicatriz madura. El concentrado puede usarse en escenarios en los cuales requerimos de una cicatrización acelerada.

## REGENERACION TISULAR GUIADA

Gosain 27 El presente reporte posee varias líneas de estudio futuras para optimizar la regeneración ósea en cráneo, 1) El estudio de los animales en base a su edad ya que en los animales infantiles es mas acelerado el crecimiento en relación a los adultos 2) El problema de la regeneración ósea guiada para los defectos de cráneo esta lejos de resolverse 3) El hueso de la periferia y el central deben de ser estudiados separadamente porque el mecanismo de formación de hueso parece ser diferente. Para la reparación de un defecto craneal en un animal adulto puede ser acelerado por la colocación de una membrana tanto de dura como de pericráneo para bloquear el prolapso de los tejidos adyacentes además del beneficio de las propiedades biológicas que la dura y el pericráneo han demostrado

Needleman 16 La RTG tiene un efecto mayor sobre las medidas de sondeo del tratamiento periodontal que la cirugía abierta a colgajo incluida una ganancia de inserción mejorada, menos crecimiento de la recesión gingival y mayor ganancia en el sondeo de tejido duro en la cirugía de reentrada. Sin embargo hay una marcada variabilidad entre los estudios y se desconoce la relevancia clínica e estos cambios. En consecuencia, s difícil establecer conclusiones generales acerca del beneficio

clínico de la RTG. Aunque hay pruebas de que la RTG puede demostrar una mejora significativa sobre la cirugía abierta a colgajo convencional, los factores que afectan los resultados están poco claros a partir de la bibliografía y quizá incluyan problemas de la realización de estudios como el sesgo. Dado que los informes de los ensayos a menudo estaban incompletos, se recomienda que los ensayos futuros se ajusten a la declaración CONSORT en su ejecución y notificación

Bidic1 Los resultados revelan que los defectos reparados con Caprotite no muestran significativa diferencia en la regeneración ósea comparada con los otros grupos sin embargo los defectos reparados con la placa muestran pequeñas islas de hueso y no uniones fibrosas que si se encuentran en los defectos no reparados y en aquellos en donde hubo factores de crecimiento, esto sugiere que la placa promueve la osteogénesis en los defectos pero de una manera muy lenta.

Hernández7 En este caso la técnica de ROG mostró resultados favorables en la formación ósea sobre la dehiscencia y fenestración encontrada sobre los implantes -La cobertura completa de la membrana durante el periodo de cicatrización es crítica para el éxito de la regeneración ósea guiada -Debido a la exposición de la membrana fue necesaria su eliminación prematura, lo cual disminuyó la cantidad y calidad de la formación ósea -Es necesario tener un grosor adecuado de tejido blando para poder llevar a cabo la cobertura completa de la membrana durante el periodo de cicatrización

## INGENIERIA TISULAR

Tuan6 Las CMS derivadas de un tejido adulto presentan unas células progenitoras importantes para la aplicación de ingeniería tisular y medicina regenerativa, las modalidades pueden incluir implantación directa y/o ingeniería tisular ex vivo en combinación con biomateriales biomiméticos y /o derivados biológicos o recombinantes. Estudios futuros podrán dirigirse ciertas características celulares o moleculares para una óptima de identificación, aislamiento, expansión y entendimiento del rol endógeno natural de las CMS en tejido anormal y normal funcional.

Groeneveld12 La capacidad de la proteína morfogenética para inducir formación ósea es bien conocida en animales de experimentación y ha sido recientemente demostrada en humanos. Aun hoy hay cambios y variaciones en las aplicaciones en humanos. Nosotros sugerimos que en estudios futuros necesitaremos ubicarnos en el desarrollo del material aplicado con sus propiedades mecánicas y una práctica quirúrgica apropiada para el desarrollo controlado de la PMG

Gurevitch19 El punto más interesante para consideraciones futuras es la calidad del sistema inmune formada de novo por las células de la médula ósea reconstruyendo una nueva forma de microambiente, hasta este aspecto puede determinar el futuro rol potencial en la médula intraósea transplantada en procedimientos clínicos, estudios preclínicos y preliminares confirman la eficacia de las células de médula ósea y matriz ósea desmineralizada combinados para las indicaciones propuestas como regeneración de cartílago y hueso.

Springer17 Nuestra primera hipótesis fue rechazada, contrariamente a lo que asumimos la inducción ósea por la proteína morfogénica 7 fue superior al trasplante de partículas óseas, en este modelo de crecimiento encontramos volumen, grosor y

tamaño normal de la bóveda, sin embargo solo la cantidad pero no la calidad de hueso fue diferente. Nuestra segunda hipótesis fue confirmada la no hubo disrupción en desarrollo craneal en hueso transplantado o en el uso de proteína morfogenética 7 Kneser 3 La regeneración de tejidos esta basada en el entendimiento de la formación de tejidos y regeneración con un rango de crecimiento hasta la formación de tejido funcional. La reconstrucción de defectos de pequeño y moderado tamaño usando ingeniería tisular es técnicamente factible y pueden ser una alternativa para el injerto de hueso autólogo para ciertas condiciones clínicas como la reconstrucción de grandes defectos óseos. La formación ósea seguida de la inyección de osteoblastos es ahora evaluada para nuevos modelos, en el entendido de que la vascularidad es un elemento importante para la regeneración ósea

Lorenz 21 La nueva tecnología crece rápidamente que permite el nivel de expresión de cientos de genes, con este tipo de bioinformación molecular permite la regulación de los sistema biológicos para iniciar un tratamiento en pacientes. Como cirujanos plásticos este conocimiento podría afectar nuestro tratamiento en defectos de los 3 tipos de tejidos mesodermo, ectodermo y endodermo, específicamente en cicatrización de heridas, cirugía craneofacial, cirugía de mano e ingeniería tisular

#### EL PAPEL DE LA DURAMADRE EN LA OSTEOGENESIS

Spector<sup>25</sup> La descripción del sistema de co-cultivo demostró que los osteoblastos proliferan mas rápidamente con duramadre inmadura así también maduran más rápido que los osteoblastos cultivados solos, se confirmo que a través de factor de crecimiento B-1 y factor de crecimiento 2 de la duramadre inmadura no asociada a suturas pueden influir en la actividad biológica de los osteoblastos Además las citocinas derivadas de la duramadre pueden ser la explicación de porque los animales inmaduros y los infantes (en los primeros 24 meses de nacidos) con duramadre intacta pueden reosificar grandes defectos de calota.

Spector 29 El tratamiento con FGF-2 incrementa la expresión celular dural de genes importantes para reparación esquelética FGF-2 (marcador 7), transformando el factor de crecimiento B1 (marcaje 3), transformando el factor de crecimiento B3 (marcaje 4) y colágeno tipo 1 (marcaje 4), además el FGF-2 incrementa la expresión de osteoponina (marcaje 2) un marcador tardío de la diferenciación osteoblastica. Interesantemente, la actividad de la fosfatasa alcalina un marcador temprano de diferenciación osteoblastica fue significativamente disminuido con el tratamiento de FGF-2 comparado con cultivos a las 24 y 48 hrs. Juntos esos datos proveen datos que señalan los efectos autocrinos y paracrinos de FGF-2 en la biología de la duramadre

Yu 23 Spemann describió los efectos de la inducción tisular al inicio de este siglo, el mesodermo determina reactividad ectodérmica, hasta ahora este concepto clásico se ha llevado para explorar la existencia de tejido central y multicelular, interacción de célula a célula y célula a matriz, los cambios progresivos e irreversibles de una sola célula (cigoto) a mas de 100 tipos de células diferentes (vertebrado adulto) es la definición de diferenciación. Durante este proceso un largo conteo de información coordinada y material de transferencia puede ocurrir, la morfogénesis de la calota incidida es un proceso muy complejo. Este experimento prevé el potencial osteoinductivo de la dura neonatal y requiere de una interacción cerrada entre diferentes niveles embrionicos un proceso conocido como "interacción de tejido

proximal". No solo el mesodermo determina la reactividad ectodérmica sino que el ectodermo influye en la diferenciación mesodérmica. Tal vez el hallazgo más significativo es el estudio de la heterogeneidad estructural de la dura neonatal, aunque el cultivo de células periosticas puedan dar una tasa de células osteoprogenitoras como condroblastos en condiciones apropiadas, la dura neonatal puede segregar esa población de células, la mayor limitante de este estudio es precisar la actividad separada de la dura sutural de las suturas metódica, lambiodea, sagital, etc.

## EL PAPEL DEL PERIOSTEO

Breitbart 30 La aplicación potencial de cultivo de células de periostio incluyen la reconstrucción craneofacial, ortopedia, y defectos dentoalveolares, por lo tanto es posible que pequeños restos de periostio autógeno puedan ser tomados con mínima morbilidad, expandirse en cultivo celular y este ser usado para reparación de defectos óseos. Sin embargo los estudios actualmente incluyen los cultivos de diferentes tejidos (por ejemplo suplementados con factores de crecimiento óseo y otros moduladores de la osteogénesis) que usan los diferentes sitios anatómicos (hueso membranoso o endocondral) de las células de periostio y de los sitios receptores de defecto óseo así como también investigaciones a largo plazo de fuerza biomecánica e ingeniería tisular con cultivo de células de periostio.

## OTROS FACTORES

Carvalho<sup>2</sup> Varios estudios mostraron que existen formas alternativas a los métodos farmacológicos para estimular la osteogénesis, pero mientras tanto estudios adicionales deben ser realizados para un mayor entendimiento de los factores involucrados en los diferentes tratamientos.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio entre los principales autores hay 3 grupos de investigadores que se destacan :

a)Eppley<sup>10,13</sup> (Eppley, Morales, Wood, Pensler, Goldstein, Havlik, Habal, Losken, Williams, Burstein, Rozzelle, Sadove ) Investigadores originarios de ----- Estados unidos que han dirigidos sus investigaciones principalmente al comportamiento de las placas de materiales absorbibles en cirugía pediátrica craneofacial.

b)Gosain<sup>14, 27</sup> (Gosain, Santoro, Song, Capel) Se encuentran trabajando en----- -- y han puesto sus esfuerzos para explicar el papel de los biomateriales en reconstrucción de cráneo, pero la dirección de sus últimos estudios es explicar cual es el papel tanto de la duramadre como del periostio y tejido circundante en la Osteogénesis.

c)Spector<sup>25,29</sup> (Spector , Greenwald, Warren, Bouletreau, Crisera) Del Servicio de----- buscan explicar la Biología de la Duramadre sobre el factor de crecimiento de Fibroblastos, así como el cultivo de osteoblastos y su diferenciación que se

encuentran en un área de investigación sumamente importante para este tema la Ingeniería Tisular

Podemos dividir a los trabajos revisados en aquellos que fueron publicados en países desarrollados y países en vías de desarrollo.

Países en vía de desarrollo: México (2), Turquía(2), Israel(1), Brasil(1)

Países desarrollados: Estados Unidos(19), Suiza(2), Japón(1), Italia(1), Alemania(3), Inglaterra(1)

De los artículos incluidos 16 fueron experimentales lo que le dio a esta revisión una validez importante ya que contiene información de alto gradiente científico, 1 meta-análisis publicado por la biblioteca Cochrane, 2 revisiones sistemáticas sobre el tema, 8 revisiones narrativas, 1 estudio de cohorte y 4 reportes de casos clínicos

De todos los artículos revisados el de Barbos<sup>8</sup> se publicó en 1988 y fue uno de los primeros estudios en mencionar el comportamiento del tejido óseo que se forma de novo en un implante colocado para intentar llenar un defecto para cirugía craneofacial con Eppley<sup>10,13</sup> y el papel de la duramadre para la osteoinducción Yu<sup>23</sup> si se trata de la sutura escamosa o para la condrogénesis si se trata de la sutural y finalmente Concannon<sup>26</sup> en ese mismo año habla de la inducción ósea usando hueso desmineralizado. Ya para el año 2000 se habla del uso de proteína morfogenética para la regeneración ósea en humanos Groeneveld<sup>12</sup> y Lorenz<sup>21</sup> habla del impacto de la Ingeniería Tisular y Medicina Biomolecular en el siglo XXI y principalmente en Cirugía Plástica. En el año 2001 Okii es de los primeros en mencionar los cambios histológicos en la reconstrucción craneal con hidroxapatita, uno de los biomateriales más importantes para la reconstrucción craneofacial que hasta hoy ha sido objeto de múltiples estudios, en el 2002 continúan las publicaciones sobre el tema e interesantemente Carvalho<sup>2</sup> en Brasil habla del tratamiento no farmacológico de la estimulación de osteogénesis y Tuan<sup>6</sup> continúa con el estudio de la ingeniería tisular pero en este caso en células adultas, también Robert<sup>22</sup> estudió la seguridad y eficacia de la hidroxapatita en el mismo año, pero la mayor información sobre el tema de regeneración y remodelación ósea se han publicado desde el 2003 Taub<sup>11</sup> es uno de los primeros en mencionar la función de los implantes aloplásticos prefabricados y la evolución de los mismos para la reconstrucción craneofacial, pero la ingeniería genética va más allá en este año y Gurevitch<sup>19</sup> en su publicación habla del estudio del micro ambiente hematopoyético en una combinación que hace de hueso desmineralizado y células de médula ósea para reconstrucción de hueso y cartílago, en este mismo año Hobart<sup>24</sup> inicia lo que hasta entonces no se había estudiado ¿cómo afecta todo lo usamos para la reconstrucción craneal en animales en desarrollo? y lo hace buscando con un biomaterial ampliamente usado, la hidroxapatita y continúa Gosain<sup>27</sup> en el mismo lapso explicando cómo contribuye la dura, el pericráneo y el tejido circundante en la osteogénesis de un defecto craneal; hacia el 2004 Aslan<sup>4</sup> en Turquía va más allá estudiando lo que llama regeneración ósea guiada en defectos óseos, en ese mismo lapso Hernández en México usa la regeneración ósea guiada simultáneamente a la colocación de implantes dentales, y es Soto<sup>15</sup> quien nos recuerda que aun en el 2004 los autoinjertos óseos son la mejor alternativa a pesar de todos los adelantos e ingeniería tisular para la reconstrucción craneofacial Vargel<sup>31</sup> inicia un protocolo con injerto óseo deshidratado soluble para reconstrucción craneofacial; en 2005 Sclafani<sup>9</sup> compara el comportamiento de los injertos sintéticos y los aloinjertos para la reconstrucción craneal, y es en este año también cuando Springer<sup>17</sup> compara

injertos óseos contra proteína morfogenética-7 para la regeneración ósea de un defecto de tamaño crítico en un modelo en desarrollo, Algenstaedt<sup>18</sup> retoma la función micro vascular y los cambios secuenciales de la formación vascular en la regeneración ósea, un dato que es sumamente fundamental para la osteoinducción; finalmente Kneser<sup>3</sup> en el 2006 hace un resumen de lo que representa hoy en día la ingeniería genética para diferentes campos de la cirugía hablándonos de los puntos de vista de los cirujanos, especialmente en materia de cirugía reconstructiva craneofacial

Por supuesto en los trabajos experimentales la población en que se trabajó fueron animales de laboratorio, principalmente Conejos New Zealand, Ratas Lewis, Mini cerdos, Hámsteres, en los reportes de casos fueron pacientes principalmente niños menores de 5 años que requieren reconstrucción craneofacial por malformaciones, en los casos de adultos la reconstrucción craneofacial era secundaria postrauma o resección por cáncer, en los casos de revisión sistemática o meta-análisis el material en el que se basó fue la literatura publicada sobre el tema

Los instrumentos de medición fueron utilizados principalmente en los estudios experimentales y como todos estaban relacionados con la regeneración y remodelación ósea los principales estudios fueron estudios de imagen como Ortopantomografía, Cefalometría, TAC tridimensional, Tomografía micro computada, Técnicas histopatológicas e Inmunohistoquímicas, Bioquímica y en los reportes de Casos los datos clínicos relacionados a la patología y el tratamiento.

Existe un continuo interés en el desarrollo de materiales sustitutos de injertos óseos para la reparación de defectos craneales de espesor total, especialmente para corrección de defectos congénitos y postrauma, en los cuales la principal limitante del injerto autólogo radica en la cobertura del laminado. De ahí que se justifique el desarrollo de una Unidad Osteogénica en donde se verifiquen de manera simultánea la osteoconducción, la osteoinducción y la osteogénesis para la reparación biológica de dichos defectos. Luego de realizar una revisión extensa de la literatura, podemos concluir que aun no existe un material en el que se conjunten las propiedades de osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis que puedan influir en la actividad biológica de los osteoblastos. Para formar hueso prácticamente normal que tenga la capacidad de crecer junto con el individuo que es lo haría la diferencia entre los materiales que se están utilizando actualmente para la cobertura de defectos óseos en cráneo, pero que su principal limitante es precisamente la incapacidad de crecer o incluso su retraso en el crecimiento de tejido adyacente con una secundaria deformidad, ya se ha mencionado que las citocinas derivadas de la duramadre pueden ser la explicación de porque los animales inmaduros y los infantes (en los primeros 24 meses de nacidos) con duramadre intacta pueden reosificar grandes defectos de calota pero para tener éxito en la cobertura de un defecto óseo craneal con capacidad de crecimiento hace falta un estudio que conjunte las 3 características inigualables hasta ahora del hueso: Osteoinducción, osteoconducción y Osteogénesis así como también investigaciones a largo plazo de fuerza biomecánica e ingeniería tisular.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Bidic ,Calvert, Marra, Kumta, Campbell, Mitchell Rabbit Calvarian Wound Healing by Means of Seeded Caprotite Scaffolds Journal Dental Research 82(2) 131-135, 2003
- 2 Carvalho, Rosim, Gama, Tavares, Tribioli, Santos, Cliquet Jr Tratamiento No Farmacológico de la Estimulación de la Osteogénesis Rev. Saúde Publica Vol. 36 no 5 Sao Paulo Oct 2002
- 3 Kneser, Schaefer, Polykandrintis,Horch Tissue engineering of Bone: The Reconstructive Surgeon's Point of View J.Cell Mol Med vol 10 no 1, 2006
- 4 Asland(4), Sims, Dayi Guide Bone Regeneration (GBR) on Healing Bone Defects: A Histological Study in Rabbits J-Contemporary Dental Practice vol 5 no 2 2004
- 5 Okii(5), Nishimura, Kurisu, Takeshima, Ouzumi In vivo histological changes occurring in Hydroxyapatite Cranial Reconstruction Neurol Med Chir 41 ,100-104,2001
- 6 Tuan(6), Boland, Tuli Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering Arthritis Research and Therapy vol 5 no 1
- 7 Hernández(7), López Regeneración ósea guiada simultánea a la colocación de implantes: Presentación de un caso clínico Revista Oncológica Mexicana 2004 abril vol 2 no 7
- 8 Barbos(8) Bone Ingrow Into Madreporic Prosthesis J.Bone Joint Surg (Br) 1988, 7'-B:85-8
- 9 Sclafani(9), Romo, Ukrainsky, Mc Cormick, Litner, Kevy, Jacobson Modulation of Wound response and soft tissue Ingrow in synthetic and allogenic implants with platelet concentrate Arch Facial Plast Surg 2005 may-jun 7(3) : 163-9
- 10 Eppley(10), Morales, Wood, Pensler, Goldstein, Havlik, Habal, Losken, Williams, Burstein, Rozzelle, Sadove Resorbable PLLA-PGA Plate and Screw Fixation in Pediatric Craniofacial Surgery: Clinical experience in 1883 Patients Plastic and reconstructive surgery 2004 vol 114 No 4
- 11 Taub(11), , Rudkin, Clearihue, Millar Prefabricated Alloplastic Implants for Cranial Defects Plastic and reconstructive surgery 2003 vol 111 No 3
- 12 Groeneveld(12), Berger Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration European Journal of Endocrinology 142 9-21
- 13 Eppley(13), Sadove, Havlik Resorbable Plate Fixation in Pediatric Craniofacial Surgery Plastic and Reconstructive Surgery 1997 vol 100 no 1
- 14 Gosain(14) Biomaterials for Reconstruction of the Cranial Vault Plastic and Reconstructive Surgery 2005 vol 116 no 32
- 15 Soto(15), Taxis Injertos óseos. Una alternativa efectiva y actual para la reconstrucción del complejo cráneo-facial Revista de la FES Zaragoza México 20004
- 16 Needleman(16),Worthington, Giedrys, Tucker Regeneración tisular guiada para los defectos periodontales infraóseos Biblioteca Cochrane Plus 2006 no 3 Oxford



- 17 Springer(17), Acil, Kuchenbecker, Bolte, Warnke, Abbound \*\*\*Bone graft vs. BMP-7 in a critical size defect -CranioPlasty in a growing infant model J.Bone 2005 vol, 37 no 5
- 18 Algenstaedt(18), Joscheck, Wolfram, Schaefer Muller \*\*\*Sequential Changes in vessel formation and microvascular function during bone repair J Dent Res 83(3) 2005
- 19 Gurevitch(19), Gowda, Kurkalli, Prigozina, Kasir \*\*\*Reconstruction of Cartilage Bone and hematopoietic microenvironment with Demineralized bone matrix and bone marrow cells Stem Cells 2003, 21
- 20 Murphy(20), Simmons, Kaigler, Money \*\*\*Bone regeneration via a Mineral Substrate and Induced angiogenesis Am J physiol cell physiol aug 1 2005
- 21 Lorenz(21), Marc, Hedrick, Chang, Babak, Mehrara, Longaker The impact of Biomolecular Medicine and Tissue Engineering on Plastic Surgery en el siglo XXI Plastic and Reconstructive surgery june 2000 vol 5 no 7
- 22 Robert(22), Havlik \*\*\*Safety and Efficacy Report Hydroxyapatite Plastic and Reconstructive Surgery vol 110 no.4 2002
- 23 Yu(23), McClintock, Gannon, Gao, Mobasser, Sharawy \*\*\*Regional Differences of Dura Osteinduction: squamous dura Induces Osteogenesis, Sutural Dura Induces Chondrogenesis and Osteogenesis Plastic and Reconstructive Surgery 1997 vol 100 no 1
- 24 Hobart(24), Hunt, Antrobus \*\*\*Assessment of the Effects on Growth of porous Hydroxyapatite Granule CranioPlasty in the Immature Guinea Pig Craniofacial Skeleton Plastic and Reconstructive surgery 2003 vol 111 No 5
- 25 Spector(25),Greenwald, Warren, Bouletreau, Crisera \*\*\*Co-culture of Osteoblast with Immature Dural Cells causes an Increased Rate and Degree of Osteoblast Differentiation Plastic and Reconstructive Surgery 2002 vol 109 no 2
- 26 Concannon(26), Boschert, Puckett \*\*Bone Induction Using Demineralized Bone in the Rabbit Femur: A long Term Study Plastic and Reconstructive Surgery 1997 vol 99 no 7
- 27 Gosain(27), Santoro, Song, Capel, \*\*\*Osteogenesis in Calvarian Defects: Contribution of the Dura, the pericranium and the Surrounding Bone in Adult vs. Infant Animals Plastic and Reconstructive Surgery 2003 vol 12 no 2
- 28 Sherman(28), Wong, Inoue, Crain, Chao, Manson \*\*\*Fixation of the Craniofacial skeleton with Butyl-2cyanoacrylate and its effects on histotoxicity and healing Plastic and Reconstructive Surgery 1998 vol 102 no 2
- 29 Spector(29), Greeneald, Warren, Bouletreau Duramater Biology: Autocrine and Paracrine Effects of Fibroblast Growth Factor 2 Plastic and Reconstructive Surgery 2002 vol 109 no 2
- 30 Breitbart(30), Grande, Kessler, Ryaby, Fitzsimmons, Grant Tissue Engineered Bone Repair of Calvarial Defects Using Cultured Periosteal Cells Plastic and Reconstructive Surgery 1998 vol 101 no 3
- 31 Vargel(31), Tuncbilek, Mavili, Cila, Ruacan, Benli, Erk Solvent-Dehydrated Calvarial Allografts in Craniofacial Surgery Plastic and Reconstructive Surgery 2004 vol114 no 2
- 32 Rosenthal(32), Buchmann Volumen Maintenance Of Inlay Bone Grafts in the Craniofacial Skeleton Plastic and Reconstructive surgery 2003 vol 112 no3

## ANEXO 2

### Cuadros de síntesis de la literatura de acuerdo a su nivel de evidencia científica

Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
1.- Rabbit Ca	Journal Dent	Bidic(1), calvert,Marra,Kumta		40 conejos New Zealand	TAC 3D E HISTOLOGIA	Uso de una placa de ac.polilactico y g
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel d gradiente
Defecto en la calota de	Tejido autologo, Caprotit	NaCl en la placa, Tiempo	ANOVA Y SPSSPC v	Los resultados s	Los resultados r	V
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
2.- Tratamien	Saúde	Carvalho(2), Rosim, Gama, T		20 pacientes	Densitometro óseo	Tratamiento no farmacologico para pro
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel d gradiente
fisico se encontro que	Una dieta rica en calcio	El ultrasonido pulsado de	T-student	Algunos estudio	Varios estudios r	IV
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
3.- Tissue	J.Cell Mol Me	Kneser(3),Schaefer, Polykar		30 constructos tisulares	HISTOLOGIA	La induccion de vascularización en ma
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel d gradiente
Induccion de vasculariza	Prevascularización y cana	La regeneración de tejido	ANOVA Y SPSSPC v	reconstruccion	osea seguida de	V
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
4.- Guide Bor	J-Contempora	Asland(4), S.ims, Dayi	20	30 conejos albinos adulto	Estudio histologicos	Regeneracion osea guiada por TUTOPI
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel d gradiente
Defecto en la tibia dere	Placa absorbible	solucion salina, ampicilina	Prueba de Mann-Whit	Se dividieron los	En un sitio de os	IV
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
5.- In vivo hist	Neurol Med C	Okii(5),Nishimura,Kurusu,Tal		1 paciente	Histología	Cambios ocurridos durante la perman
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel d gradiente
Hidroxiapatita	Formación de hueso	Hueso circundante, duran	Reporte de un caso	La placa de hidr	El estudio histol	II
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
6.- Adult mes	Arthritis Rese	Tuan(6), Boland, Tuli	2	24 articulos	Histologia, Cultivo celular	Esta revisión se enfocó a las celulas m
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel d gradiente
Actualmente el aspirad	El uso de biometriales sir	Para obtenerlo se requier	Mann Whitney	Una gran cantida	Las CMSderivada	VI
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
7.- Regenerad	Revista Oncol	Hernández(7), López	1998	1 paciente	Ortopantomografía	Membrana de Teflón no absorbible
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel d gradiente
Formación hueso Nuevo	Regeneración ósea guiada	Peri-implantitis, mucositis	Reporte de un caso	Despues de 5 m	En este caso la te	I
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
8.- Bone Ingr	J.Bone Joint S	Barbos(8)	1987/1988	3 placas	Estudio histologicos	Resorción y formación de tejido óseo a
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel d gradiente
Placa de medpore coloc	Formación de hueso mu	Tiempo colocado en el fer	Reporte de un caso	En el implante q	Los hallazgos su	I
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
9.- Modulatio	Arch Facial Pla	Sclafani(9), Romo, Ukrainsky		20 conejos New Zealand	Control macrofagos, fibro	Modulación de la respuesta de heridas
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente
Concentrado plaquetari	Tejidos blandos en cicat	Tiempo y dosis de tratam	Prueba de Mann-Whit	Un gel con conc	El tratamiento cd	IV
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
10.- Resorbab	Plastic and re	Eppley(10), Morales, Wood,		1883 pacientes	Datos clínicos	Placa reabsorbible (Lactosorb)
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente
Girugía craneofacial	craneofacial Evolucion de	Incidencia de infecciones	Prueba de Mann-Whit	Las infecciones	La experiencia a	IV
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
11.- Prefabric	Plastic and re	Taub(11), , Rudkin, Clearihu		3 pacientes	Datos clínicos	Implantes aloplasticos prefabricados
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente
Defectos de craneo	Resultado de los pacien	Complicaciones postquiru	Reporte de un casos	El paciente 1 se	Nuestra experie	I
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
12.- Bone mo	European Jou	Groeneveld(12), Berger	19	Literatura publicada sobre	Estudio histologicos	Proteína Morfogénica
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente
Regeneración osea	Regeneración osea con	PMG (proteína morfogen	T-student	La regeneración	Los efectos de la	IV
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
13.- Resorbab	Plastic and Re	Eppley(13), Sadove, Havlik		85 pacientes	Datos Clínicos	Placas de acido poliglicolico y acido po
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente
Deformidades en cráne	Reabsorción de la placa	Infección, exposición de la	ANOVA	El seguimiento a	Los resultados cl	V
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
14.- Biomater	Plastic and Re	Gosain(14)	2004/2005	Literatura publicada sobre	Estudio histologicos	HUESO AUTOLOGO:En una serie de 73
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente
METILMETACRILATO: TI	HIDROXIAPATITA: Es un r	HUESO DESMINERALIZAD	Prueba de Mann-Whit	Esta revisión est	PERO NO HAY DA	IV
Titulo	Revista	Autores	Año de realizaci	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)
15.- Injertos d	Revista de la	Soto(15), Taxis	2003/2004	Literatura publicada	Datos Clínicos	El empleo de injertos oseos como alte
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente
Durante décadas, los in	De igual manera se han e	Las regiones receptoras	Prueba de Mann-Whit	Indudablemente	Las regiones pot	V

Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
16.- Regenera	Biblioteca Co	Needleman(16), Worthingto		17 articulos	Ensayos controlados alea	Regeneración tisular	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Regeneración tisular gu	RTG sola y RTG con subst	Cirugía abierta o colgajo	Chi cuadrada para het	Los tratamientos	En consecuencia	VI	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
17.- Graft vs E	J.Bone 2005 v	Springer(17), Acil, Kuchenbe		17 minipigs	TAC 3D E HISTOLOGIA	Proteína Morfogenética 7	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Injerto oseo	Inducción de hueso en ca	Formación de hueso espo	Prueba de Mann-Whit	Inicialmente los	La microscopía fl	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
18.- Secuentia	J Dent Res 83	Algenstaedt(18), Joscheck,W		37 hamsters	Técnicas histológicas epif	Angiogenesis	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Funcion microvascular	Reparación ósea	Inmunodepresores	Prueba de Mann-Whit	Se reporta la fun	La posibilidad de	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
19.- Reconstr	Stem Cells 20	Gurevitch(19), Gowda, Kurk		24 ratas Lewis	Histología	Reconstrucción de cartilago y hueso	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Hueso desmineralizado	Hematopoyesis	Angiogénesis	Prueba de Mann-Whit	Demostramos q	Nosotros prediji	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
20.- Bone reg	Am J physiol	Murphy(20), Simmons, Kaig		22 ratas Lewis	Histología	Regeneración ósea	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Substrato mineral	Angiogénesis	Inducción de Angiogénes	Prueba de Fisher	Inducción de An	Hubo un increme	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
21.- The impa	Plastic and Re	Lorenz(21), Marc, Hedrick, C		Literatura publicada sobre	Medicina biomolecular e	La medicina biomolecular	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
La medicina biomolecul	El impacto de los avance	En la cicatrizacion de heri	Revisión de la literatu	La nueva tecnol	Como cirujanos	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
22.- Safety an	Plastic and Re	Robert(22), Havlik	2002/20	Literatura publicada sobre	Diferentes clases de hidr	La búsqueda de un sustituto apropiad	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
La hidroxiapatita junto c	Tipo de hueso a reconstr	Presencia o ausencia de c	Revisión de La literatu	Además la durat	La investigación	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
23.- Regional	Plastic and Re	(23), McClintock, Gannon, G		30 ratas adultas	Inmunohistoquímica indir	Osteoinducción de la duramadre por re	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Osteogenesis de la dura	Inducción de hueso y ca	Colgajos con el panículo n	Prueba de Fisher	La esqueletogé	Este experiment	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
24.- Assesme	Plastic and Re	Hobart(24), Hunt, Antrobus		40 guinea pigs	Histología y Cefalometria	Efectos de la hidroxiapatita en el crec	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Hidroxiapatita Periostio	Pérdida de la dura	Exposición del implante, i	Prueba de T Student-N	40 animales se e	Histológicamente	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
25.-Co-cultur	Plastic and Re	Spector(25), Greenwald, Wa		Diferenciación 40 ratas de	Histología, Western Blot,	Cultivo de osteoblastos	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Diferenciación de osteo	Celulas de duramadre in	Factores de crecimiento	T de Students	Por decadas los	La descripción de	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
26.- Bone Ind	Plastic and Re	Concannon(26), Boschert, P		55 conejos New Zealand	Histopatología	Hueso desmineralizado	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Femur de conejo	Inducción ósea	Placa mandibular circunfe	T de Students	En 55 conejos N	En el grupo 1 el a	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
27.- Osteoge	Plastic and Re	Gosain(27), Santoro, Song,		32 conejos New Zealan	Cefalometria e Histología	Ostegenesis de defectos craneales	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Formación hueso Nuevo	Pericraneal y tejidos adya	Animales infantiles y adult	T de Students	La reconstruccio	El presente repo	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
28.- Fixation	Plastic and Re	Sherman(28), Wong, Inoue,		33 conejos New Zealand	Histopatología	Cianoacrilato	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Efectos de histotoxicida	Fijacion del esqueleto fac	Infección, exposición de la	T de Students	Las placas y los t	El analisis microc	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
29.- Duramat	Plastic and Re	Spector(29), Greeneald, Wa		12 ratas pups	Western Blot, North Blot	Actividad de fosfatasa alcalina Durama	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Factor 2 de crecimiento	Efectos autocrinos y par	Edad de las ratas recién n	T de Students	La duramadre es	El tratamiento co	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
30.- Tissue En	Plastic and Re	Breitbart(30), Grande, Kessl		30 conejos adultos New Z	Histología, bioquímica y r	Ingeniería tisular	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Celulas de periostio	Reparación ósea	Placas de acido poliglicól	T de Students	Se ha demostrad	La aplicación po	IV	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
31.- Solvent-D	Surgery Plasti	Vargel(31), Tuncbilek, Mavi		24 pacientes	TAC 3D E HISTOLOGIA	Aloinjerto deshidratado	
Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente	
Cirugía craneofacial	Malformaciones craneof	Transmisión de infeccione	T de Students	La cirugía craned	El factor más imp	III	
Titulo	Revista	Autores	Año de realizac	Tamaño de la muestra	Instrumento de medición	INTERVENCION (variable del estudio)	
32.- Volumen	Plastic and Re	Rosenthal(32), Buchmann		25 conejos New Zealand	TAC Microcomputada e H	Injertos oseos	

Variable independiente	Variables dependientes	Variables modificadoras	Pruebas estadísticas	Resultados	Conclusiones	Nivel gradiente
Mantenimiento de volu	Hueso esponjoso o corti	Origen membranoso o en	Prueba de T pareada d	El uso clínico de	El análisis micro	IV

## ANEXO 3

### TECNICAS DE HISTOLOGIA

#### TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

Esta técnica de tinción comprende el siguiente proceso:

- Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
- Lavado con agua corriente.
- Diferenciación con alcohol-ácido.
- Lavado con agua corriente.
- Inmersión en agua amoniacal.
- Lavado con agua corriente (10-20 minutos).
- Tinción con eosina a temperatura ambiente.
- Inmersión en alcohol al 95 % para eliminar el exceso de eosina.
- Deshidratación y montaje.

La tinción hematoxilina-eosina permite observar el osteoide de color rosado pálido y el hueso mineralizado de color rosado oscuro.

#### TINCIÓN DE TRICRÓMICO DE GOLDNER

Este método considera la siguiente secuencia:

- Hematoxilina férrica durante 5 minutos.
- Agua corriente durante 10 minutos.
- Ponceau de xilidina durante 45 minutos.
- Lavado rápido en ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Ácido fosfotúngstico-Orange G durante 7 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Verde luz durante 12 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético durante 5 minutos.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Deshidratar y montar.

En este caso se observa el osteoide de color rojo y el hueso mineralizado de color verde.

#### TINCIÓN DE VON KOSSA

Esta técnica comprende los siguientes puntos:

- Nitrato de plata al 3 % durante 5 minutos.
- Dos lavados de 5 minutos con agua destilada.
- Formol-carbonato de sodio durante 5 minutos.
- Agua corriente durante 10 minutos.
- Ponceau de xilidina durante 45 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1 %.

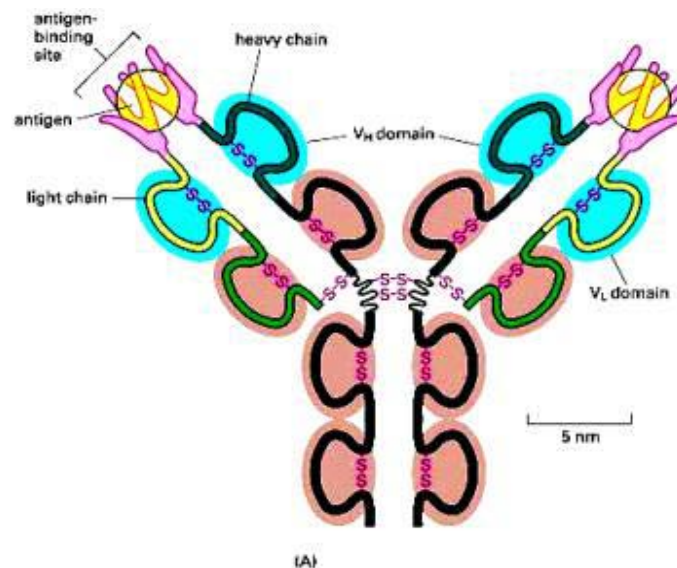
- Lavado rápido con agua destilada.
- Ácido fosfotúngstico-Orange G durante 7 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Deshidratación y montaje.

La tinción de Von Kossa permite ver el ribete de osteoide de color rojo intenso y el hueso mineralizado de color negro. Este gran contraste facilita las lecturas histomorfométricas

#### ANEXO 4.

### TÉCNICA INMUNOHISTOQUIMICA

Conjunto de técnicas que hacen uso de anticuerpos. Los anticuerpos están formados por dos cadenas pesadas y dos ligeras, que se agrupan en una molécula en forma de Y, con dos sitios de unión para antígeno



Existen varios tipos de anticuerpos, de los cuales los IgG son los más abundantes en suero y los que más utilidad tienen en técnicas de laboratorio.

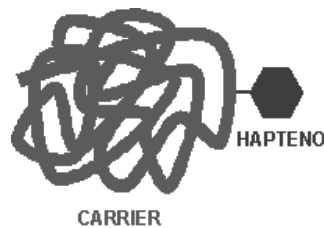
Antígeno es la molécula a la cual se une el anticuerpo. Son de muy distinta naturaleza. Fundamentalmente los Ac reconocen proteínas, pero también se sintetizan Ac contra carbohidratos, lípidos, ac. nucleicos, compuestos orgánicos sintéticos, etc. La región de la molécula a la cual se une el anticuerpo se denomina

epítopo. Los epítopos pueden estar formados por regiones contiguas o no en la secuencia de aminoácidos de una proteína.

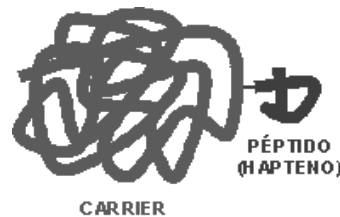
La unión antígeno-anticuerpo es una unión reversible y de alta afinidad. La producción de anticuerpos consiste básicamente en:

- a) Preparación del antígeno,
- b) Inyección de este a un animal y
- c) Obtención del suero del suero del animal.

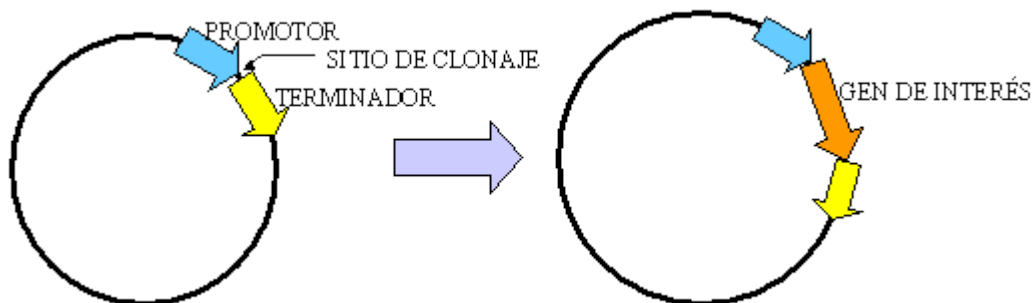
Preparación del antígeno: los antígenos deben tener un tamaño mínimo (3000-5000 dalton), aunque moléculas más pequeñas (haptenos) pueden acoplarse a otras mayores (carriers).

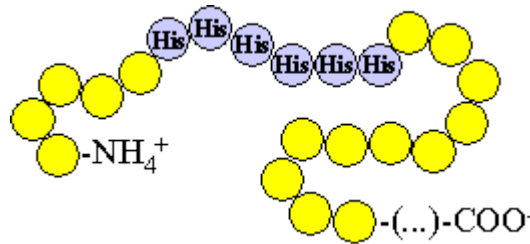


Las proteínas han de purificarse antes de inyectarse al animal. Se pueden preparar anticuerpos contra péptidos sintéticos, usándolos como haptenos.



Es muy común preparar los antígenos mediante el uso de vectores de sobreexpresión en *E. coli*. Ello permite además la inclusión de "sequence tags" (marcas de secuencia) que facilitan la purificación.





## PASOS PARA UN ENSAYO DE INMUNOHISTOQUIMICA:

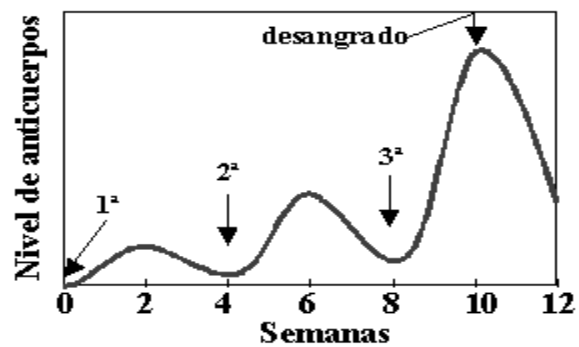
### INYECCIÓN AL ANIMAL :

Elección del animal : conejos (policlonales), ratones o ratas (monoclonales), hamsters (antígeno limitante), gallinas (antígenos muy conservados), etc.

El antígeno se inyecta normalmente mezclado con adyuvante, el cual:

- Protege el antígeno de ser catabolizado rápidamente
- Produce una estimulación de la respuesta inmunitaria inespecíficamente.

Se administran varias inyecciones al animal, separadas por varias semanas. General- se ponen 3 inyecciones xa q la cantidad de Ac fabricada contra nuestra enz sea mayor. Una inyección cada 4 semanas. La memoria inmunológica hace q en la 2º inyección se fabriquen más Ac, así sucesiva- hasta un pto en el q desciende, a la 10º semana se desangra el conejo.

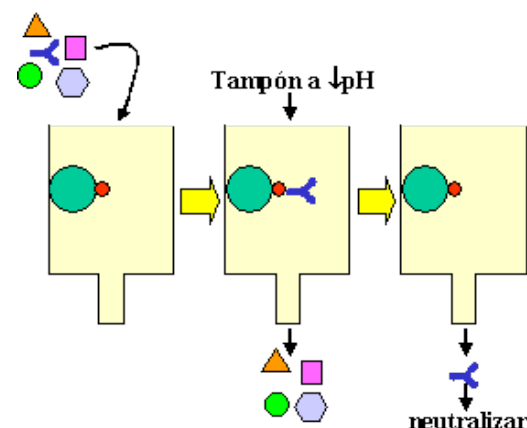


### OBTENCIÓN DEL SUERO:

En el suero hay muchos tipos de proteínas además de los anticuerpos. El suero contiene multitud de anticuerpos diferentes contra diferentes moléculas, incluso en animales superinmunizados contra un antígeno, los anticuerpos circulantes contra ese antígeno no superan la décima parte del total.

Los anticuerpos contra nuestro antígeno presentes en el suero no son de un sólo tipo: hay multitud de ellos, que reconocen diferentes partes del antígeno (anticuerpos policlonales).

Proceso de obtención del suero: Se desangra el animal y se separa el suero de las células sanguíneas, la sangre se coagula en 12 h, se centrifuga y separamos, nos quedamos con el plasma q tiene Ac y otras prot. General- no molestan los demás Ac y xa identificar una prot se usa el suero. Tb se pueden separar los anticuerpos del resto de los componentes del suero (cromatografía de afinidad usando



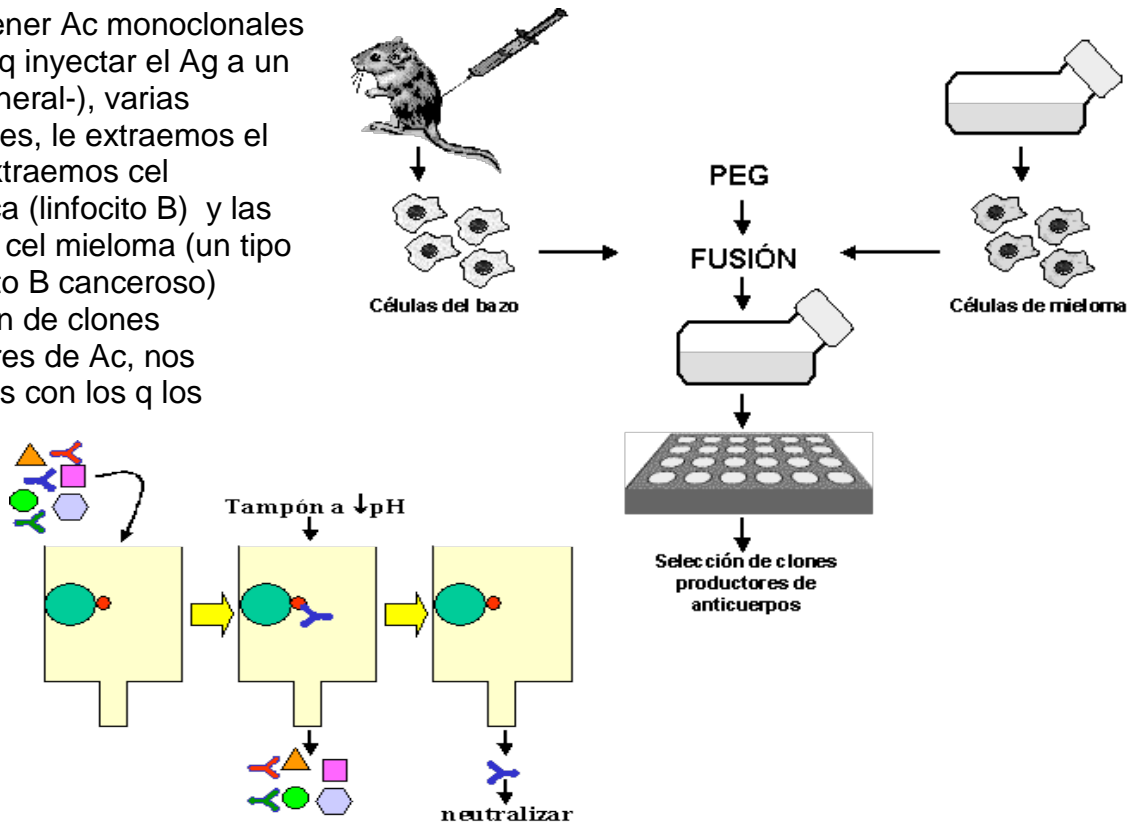
proteína-A). Separo los Ac de las proteínas por precipitación diferencial con sulfato amonico 40-60%, Ac precipitan. Se pueden purificar los anticuerpos dirigidos contra nuestro antígeno x cromatografía de inmunoafinidad, (Sepha y prot A). Pasamos x la columna algo q separe la prot A del Ac, tampones de ph extremos ác, se recoge en un tampón neutro muy [] xa neutralizar, tris ph7-8

Para obtener Ac monoclonales tenemos q inyectar el Ag a un ratón (general-), varias inyecciones, le extraemos el bazo y extraemos cel plasmática (linfocito B) y las unimos a cel mieloma (un tipo de linfocito B canceroso)

.Selección de clones productores de Ac, nos quedamos con los q los produzc

an en abundancia y de alta afinidad. Gran ventaja no hay reac cruzada s, se

puede mantener indefinida- el cultivo.



La cromatografía de inmunoafinidad colocamos el Shepadex y nuestra proteína y así obtenemos Ac monoclonales.

### MARCAJE DE ANTICUERPOS:

Los anticuerpos se pueden marcar para permitir su detección, lo cual implica la unión covalente al dominio Fc de moléculas o átomos fácilmente detectables, tales como:

-  $^{125}\text{I}$  emisor  $\square$  se detecta con contador de centelleo o autoradiografía.

- Enzimas se le pegan enz completas a la región Fc: peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, etc.

Detección con:



\* Sustratos que dan lugar a productos coloreados solubles, que se pueden medir en un espectrofotómetro.

\* Sustratos que dan lugar a productos coloreados insolubles, que forman un precipitado en el lugar en el que se encuentra el anticuerpo, útiles por ejemplo en inmunolocalización y western blots.

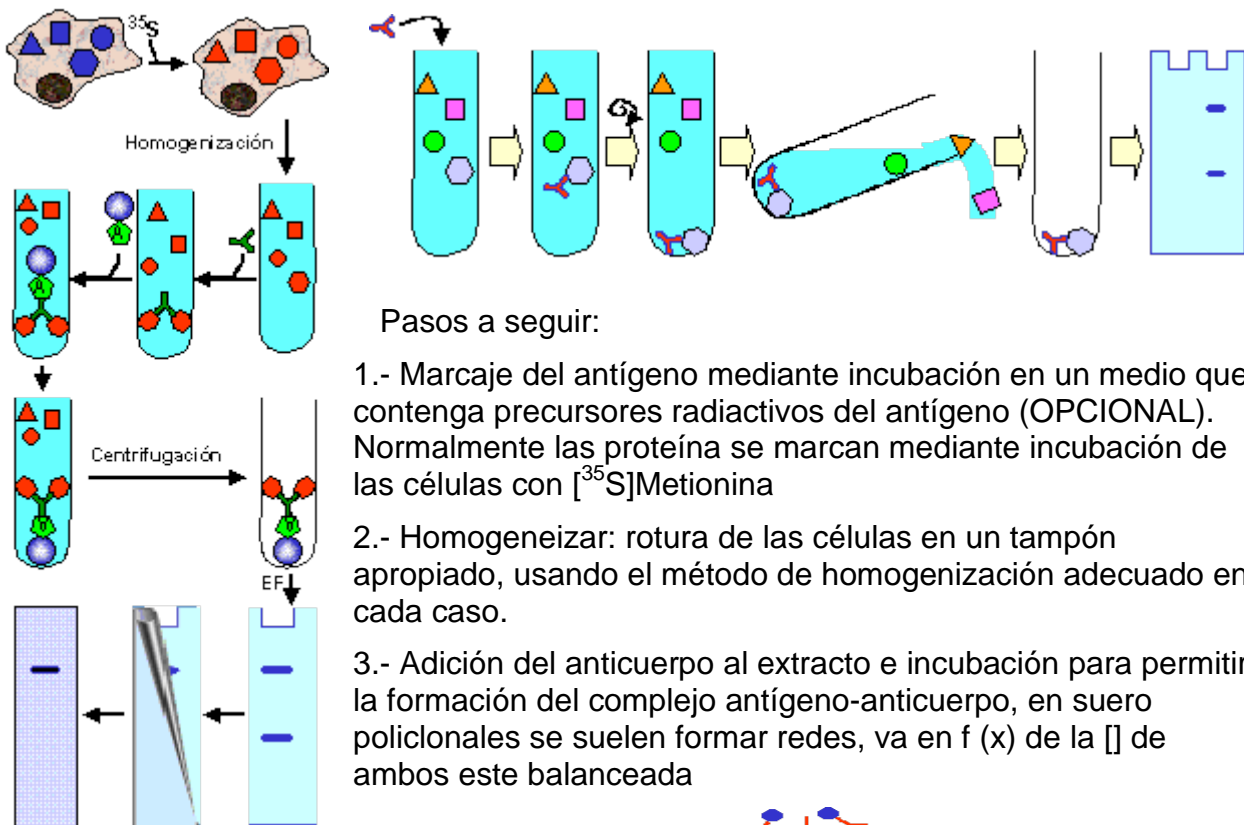
\* Sustratos que producen luz (detectada con luminómetro o película fotográfica).

\* Biotina, luego detectada con avidina/streptavidina (acopladas a algún otro tipo de marcador). La afinidad avidina/streptavidina-biotina es la más alta conocida  $\Rightarrow$  la unión es en la práctica irreversible.

\* Fluorocromos (por ejemplo Fluoresceína y Rhodamina). Detección con microscopio de fluorescencia o espectrofluorímetro.

### INMUNOPRECIPITACIÓN:

Consiste en la separación de un antígeno de una mezcla compleja mediante precipitación con el anticuerpo (por ejemplo una proteína de un extracto celular).



4.- Adición de proteína A (constituyente de la pared de *S. Aureus*, que tiene alta afinidad por las Fc de las IgG) unida a fase sólida (por ejemplo proteína A - Sephadex). Separación y lavado de ésta para eliminar el material no unido.

5.- El complejo antígeno-anticuerpo es normalmente analizado mediante electroforesis en SDS( banda superior Ag, inf Ac, si hay 3<sup>o</sup> sería q la prot tiene

subunidades) seguida de autorradiografía. Pero también puede ser usado para estudios enzimáticos o de unión de ligandos, western- blots, inmunizar de nuevo un animal, etc.

El resultado de la inmunoprecipitación depende de :

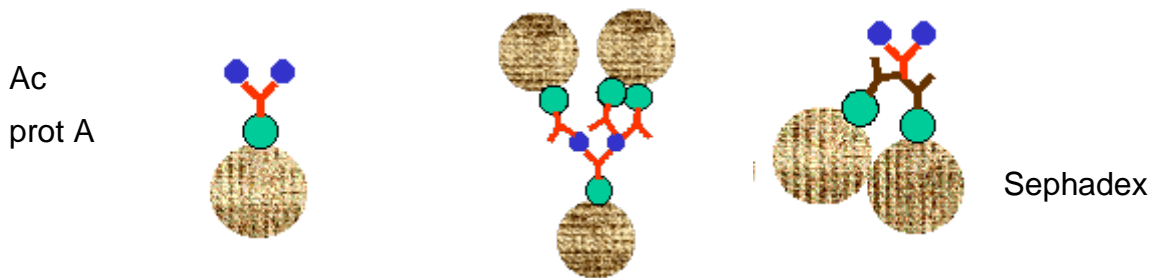
Afinidad del anticuerpo. Para anticuerpos monoclonales se necesitan afinidades del orden de  $10^8 M^{-1}$ .

Abundancia relativa del antígeno: la inmunoprecipitación es más sencilla para proteínas abundantes, pero es posible para abundancias relativas de hasta 1/1.000.000. cuanto + abundante mejor.

Naturaleza del antígeno: Las proteínas insolubles (de membrana) y altamente polimerizadas (citoesqueleto) son difíciles de inmunoprecipitar.

Necesita anticuerpos de alta afinidad y especificidad, en orden de preferencia:

- Mezcla de Ac monoclonales: el complejo se une sólo a un sitio, x eso hay varios Ac monoclonales, así la prot se une al complejo por distintos epitopos
- Ac monoclonal de alta afinidad: sólo se une a nuestro Ag
- Ac policlonales: precipitan otras prot junto con nuestro Ag

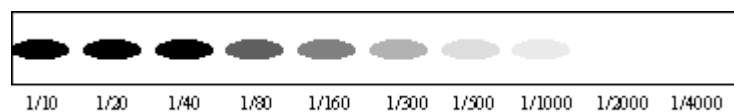


El ruido de fondo (precipitación de antígenos diferentes al que se usó para obtener el anticuerpo) es a menudo un problema, sobre todo en el caso de anticuerpos policlonales. Puede deberse a :

- Ag q reconoce a mi prot ta reconoce a otras, rezc cruzada
- Ag policlonales, mi preparación de Ac está contaminado con Ac q reconocen otras prot pero no la mía.

\*Posibles soluciones ruido de fondo(2) :

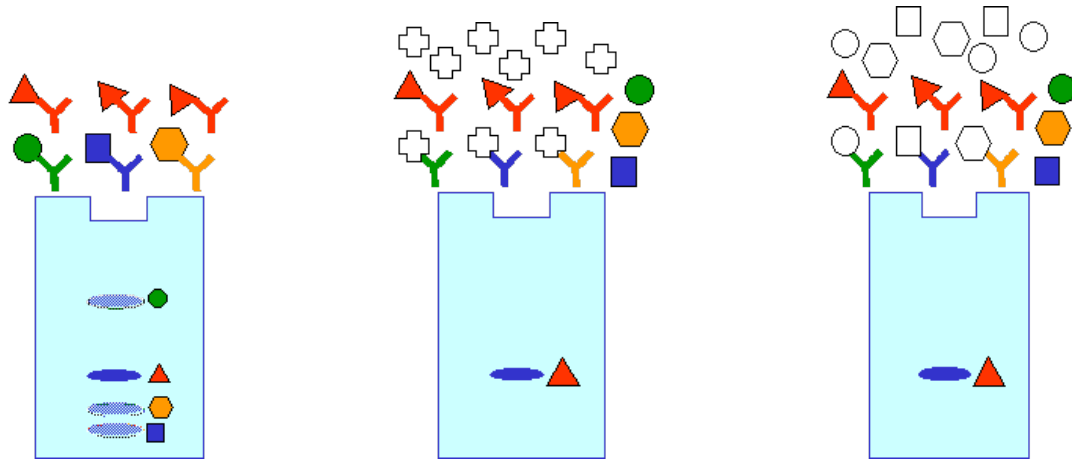
1.- Usar la mínima cantidad de anticuerpo y no más. Más contaminación cuanto + bandas hay, son las más débiles y al ir diluyendo son las q desaparecen antes



2.- Aumentar la dureza de los lavados, lavar con tampón ph 9, de las interacciones Ag-Ac se rompen, las 1º son las del ruido de fondo.

\* Eliminación de los anticuerpos que producen reacción cruzada:

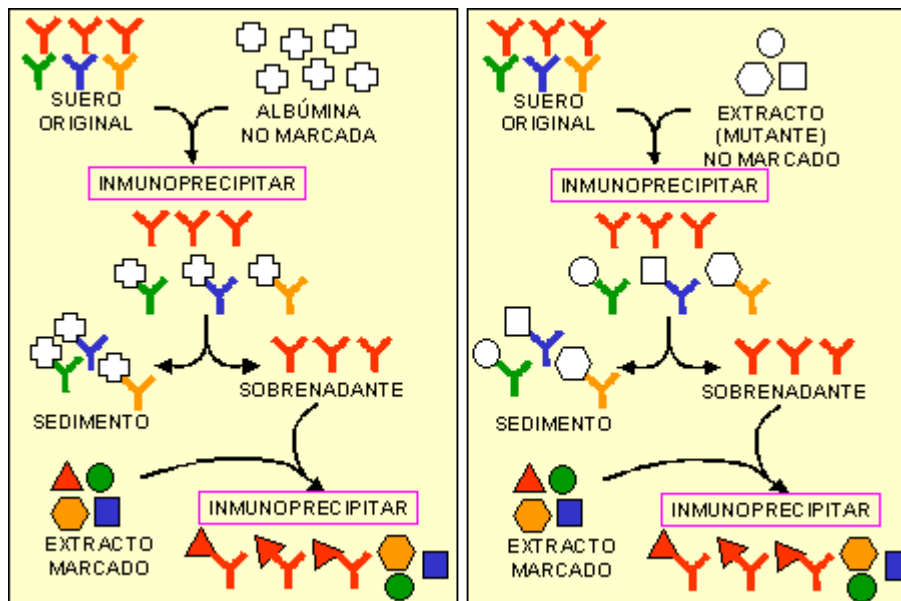
3.- Incluyendo en la reacción de inmunoprecipitación un exceso de proteínas que compitan por estos anticuerpos, por ejemplo albúmina bovina (no marcada) para eliminar las interacciones inespecíficas o un extracto del mismo organismo obtenido en condiciones en las cuales no se expresa el antígeno de interés (por ejemplo a partir de un mutante que no expresa la proteína de interés). Las proteínas no marcadas pueden aparecer en bandas no marcadas muy débiles.



reac cruzada  
marcada

no se obs + bandas pq albumina no está  
marcada

4.- Eliminar del suero los anticuerpos que dan lugar a reacción cruzada mediante una inmunoprecipitación previa con albúmina (1<sup>o</sup>) o con un extracto que no contenga el antígeno de interés (2<sup>o</sup>).

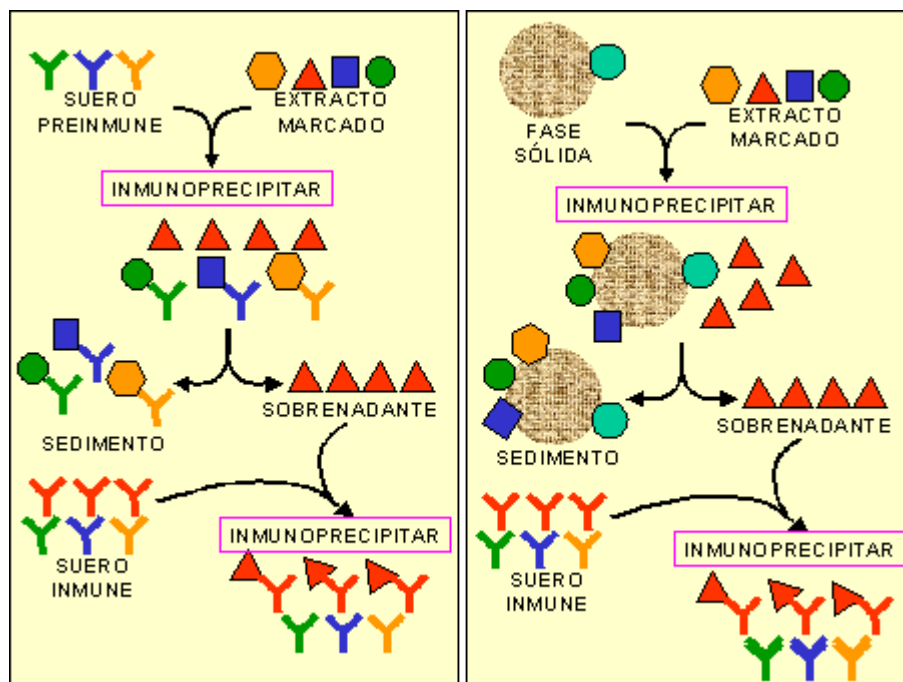


5.- Ambas cosas a la vez: 1º inmunoprecipitación previa mutante y luego añadimos el extracto del mutante en exceso en la prot

\*Eliminación del extracto de las proteína que dan lugar a ruido de fondo (2)

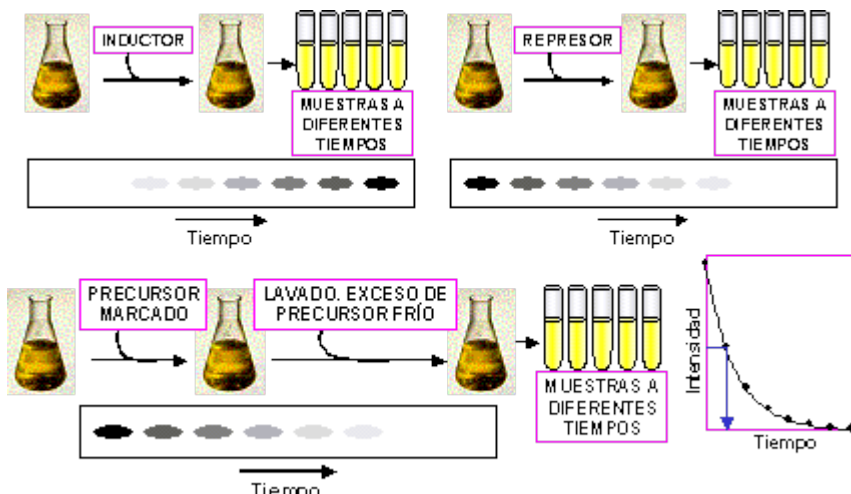
6.- Inmunoprecipitación previa usando suero preinmune (obtenido del mismo animal antes de la inmunización) o suero de una animal de la misma especie no inmunizado(1º dibujo).

7.- Eliminación de los anticuerpos que se unen a la fase sólida, mediante inmunoprecipitación (estrictamente no es una inmunoprecipitación, pq no hay Ac) previa sólo con fase sólida, sin anticuerpo (2º Ac). Las por del extracto con afinidad a la fase sólida o a la prot A precipitan 1º



Aplicaciones inmunoprecipitación:

Seguimiento de la evolución de la cantidad de antígeno: inducción, represión, cálculo de la vida media (cantidad de una prot pase a se la 1/2 ) imp saberlo pq ahí influye la regulación, vida media = estabilidad.



Autoradiografía tras electroforesis Inhibidor de la sint de prot, no sirve xa medir la vida media

Cultivo de bac le añadimos Metionina marcada, cambio

medio por el aas sin marcar en exceso

Autoradiografía se obs como se degrada la prot , intensidad de la banda con el tiempo

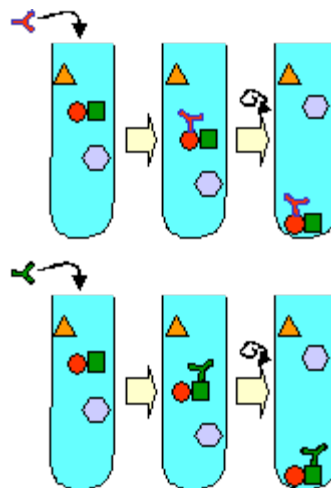
Estudio de modificaciones postraduccionales de proteínas (por ejemplo fosforilación)

Estudio de interacciones proteína-proteína (uniones) pueden confundirse con el ruido de fondo

-Al inmunoprecipitar la proteína A con anticuerpos anti-A, una proteína B que estuviese unida a ella también precipitaría, ej circulo cuadrado

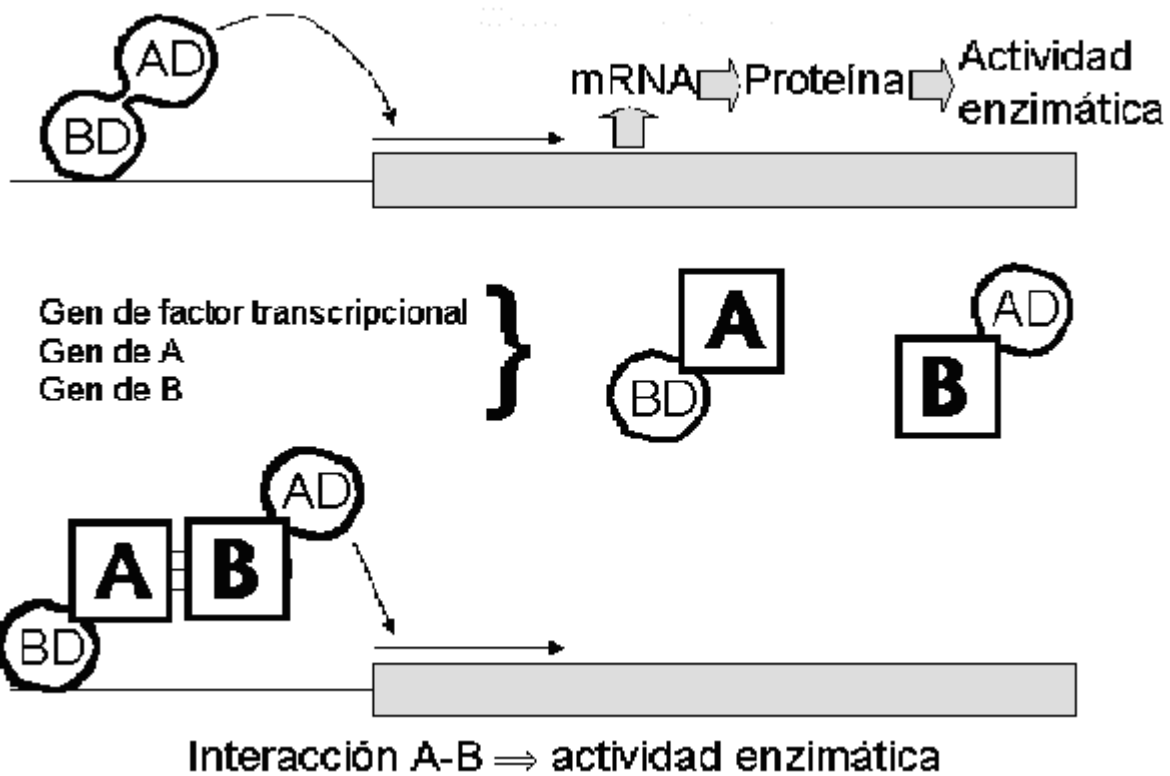
-Necesidad de hacer controles para diferenciar de reacción cruzada:

Usar tanto anti-A como anti-B, tiene q dar =

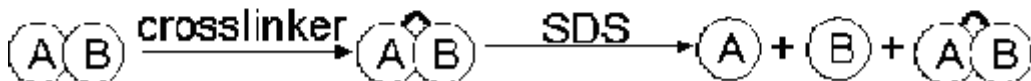


Confirmar por otros métodos tales como cross-linking o 2-hybrid.

2- HYBRID: desarrollado en levaduras, factor transcripcional de levaduras q media la transcripción de un gen concreto. Cuando la levadura tiene la prot sin otra y hay actividad enz-> se detecta fácil si f(x) o no. AD BD se pueden dividir en 2, manipulando el gen de esta prot. A cada uno le une una prot de la cual quiero estudiar la interacción. Si tienen interacción las prot se unirá el complejo, habrá transcripción y act enz



CROSSLINKING: añadir un agente químico formaldehído, une covalentemente todo aquello q está cerca prot A y B en elect dan 2 bandas aunque interaccionan pq no estan unidas covalente-



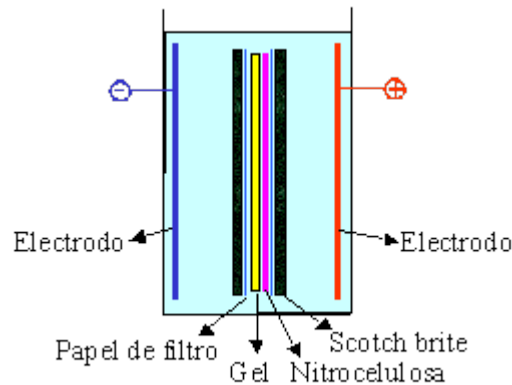
### Western blot (Inmunoblot)

Técnica muy poderosa que permite detectar la presencia, cantidad y calidad de un antígeno en una mezcla compleja, consiste en lo siguiente:

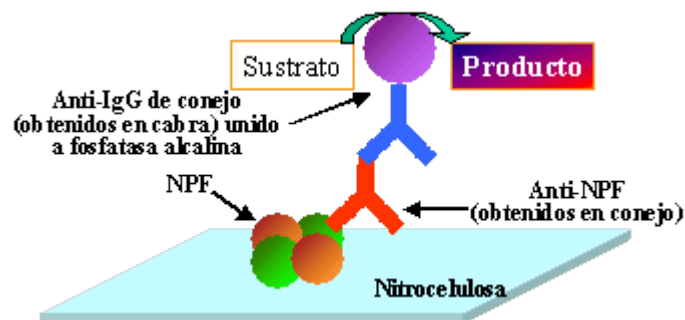
1.- Rotura de las células o tejidos en un tampón apropiado, se pueden romper las células incluso en el tampón de muestra de la electroforesis en SDS (se produce la desnaturalización inmediata de las proteínas). Tb se puede hacer en conformación

nativa. Tiene la ventaja de q no hay proteólisis pq se degrada todo incluso las proteasas.

- 2.- Electroforesis (normalmente en SDS) del extracto obtenido.
- 3.- Electrotransferencia de las proteínas a un soporte sólido (membranas de nitrocelulosa, PVDF o nylon) , lo hacemos aplicando corriente.



- 4.- Si añado el Ac a la mem se pega a ella pq es a fin a la prot, por eso antes bloqueo los sitios de unión con una mezcla de proteínas, por ejemplo leche desnatada en polvo.
- 5.- Incubación de la membrana con el anticuerpo dirigido contra el antígeno de interés (anticuerpo primario). La disolución tb contiene leche desnatada por si queda algún sitio libre.
- 6.- Lavado del anticuerpo primario, disolución con un tampón, todo lo q no está unido a ella se va, incluido el Ac 1º no unido.
- 7.- Incubación de la membrana con otro anticuerpo dirigido contra el anticuerpo primario, por ejemplo anti IgG de conejo obtenido en cabra, marcado con alguno de los marcadores ya vistos, por ejemplo fosfatasa alcalina (anticuerpo secundario).
- 8.- Lavado del anticuerpo secundario.
- 9.- Revelado del marcador. Incubamos con el sustrato de la enz, producto coloreado insoluble-> mancha color ene l sitio donde está la prot. Intensidad de color revela la cantidad. O q el producto de transf. de luz, se detecta sobre la mem un film transparente y una película fotográfica, una cámara de video detecta la luz permite establecer relaciones cuantitativas en  $f(x)$  de la intensidad.



Es necesario que el anticuerpo 1º reconozca la proteína desnaturalizada, lo cual es casi siempre cierto para los anticuerpos policlonales, pero no para los monoclonales.

Es común que aparezcan problemas de ruido de fondo, es decir aparecen bandas tras el revelado que no se corresponden con el antígeno y que se deben a reacción cruzada de los anticuerpos, especialmente si se trata de anticuerpos policlonales.

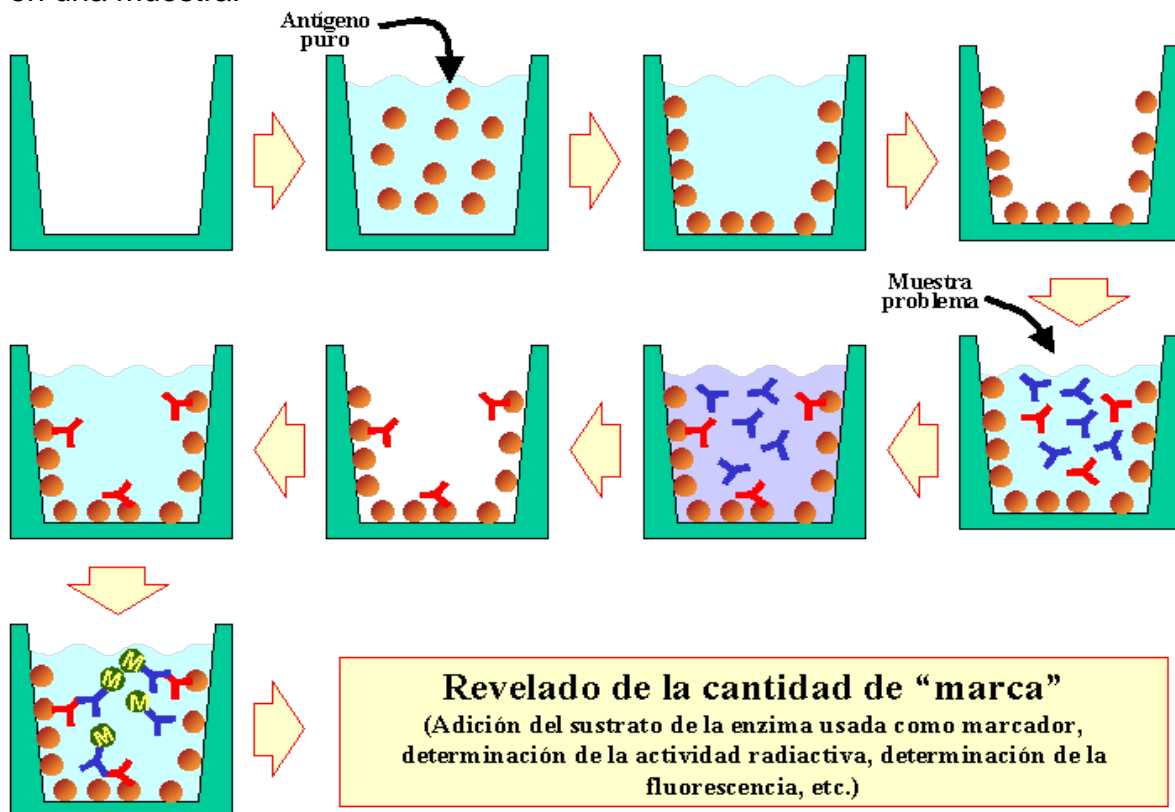
Posibles soluciones :

- Aumentar el bloqueo de la membrana para eliminar el ruido de fondo inespecífico.
- Tratar el anticuerpo previamente a su uso con un extracto lo más parecido posible al que se cargó a la electroforesis pero en el que esté ausente la proteína de interés.

### INMUNOENSAYO:

Se usan para detectar y cuantificar anticuerpos y antígenos. Todos requieren la unión del anticuerpo o del antígeno a una fase sólida, normalmente placas de microtitulación de PVC (polyvinylchloride) o membranas de nitrocelulosa.

Ejemplo de inmunoensayo en el que se detecta la cantidad de anticuerpo presente en una muestra.



ELISA y RIA: Se diferencian en el tipo de marcaje que se utiliza en el 1º el marcaje es con una enzima y en el 2º el marcaje es radiactivo.

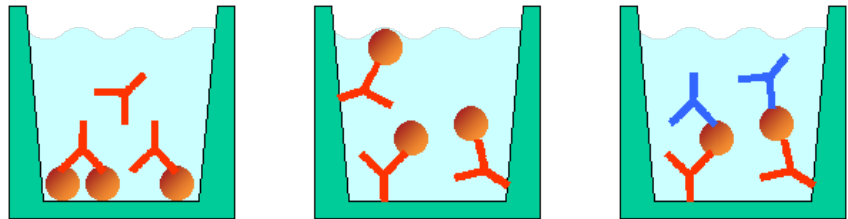
ELISA: soporte sólido al que le unimos el Ag o Ac al que le añadimos el correspondiente Ag o Ac. El soporte sólido son placas de microtitulación de PVC (polivinilcloruro, plástico con capacidad de unir proteínas) el aparato lee las placas. También se puede usar membranas de nitrocelulosa.



Ej. Inmunoensayo: detección cantidad Ac xa detectar si se ha pasado la rubéola. Ponemos los Ac en la placa añadimos una muestra del Ag q pasa a través de las paredes durante incubación. Lavamos el líq con tampón. Luego añadimos la muestra problema, incubamos y esperamos a q ocurra la unión Ag-Ac, lavamos con tampón. Añadimos un Ac<sup>2º</sup> ( marcado, desarrollado en otro organismo). Lavamos y revelamos con sustrato para enzima, cmp, espectrofotometro,...

**TIPOS DE INMUNOENSAYO:**

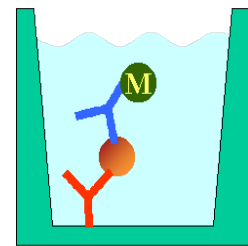
- 1.- Captura del Ac
- 2.- Captura del Ag
- 3.- Ensayo con 2 Ac en sándwich



Se dividen en f(x) de cual esta en la placa el Ag, Ac....

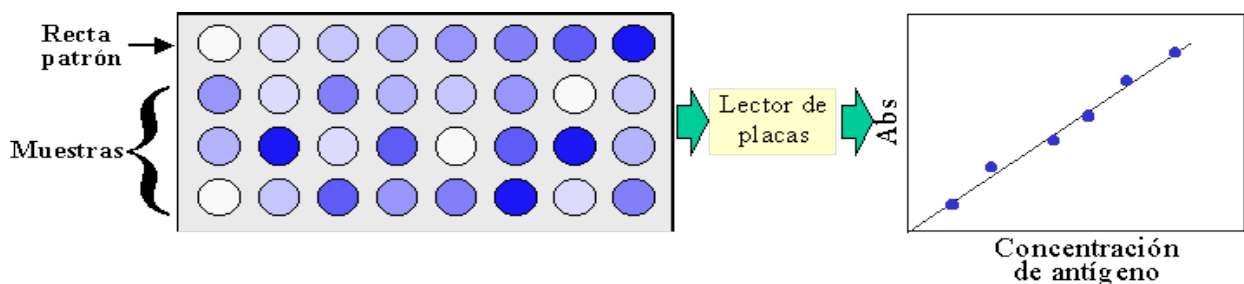
**MÉTODO DE DETECCIÓN DEL Ag (en orden de mayor a menor sensibilidad)**

A. Ensayo con dos anticuerpos en sandwich. Se requieren dos anticuerpos monoclonales diferentes (uno marcado y otro no) o anticuerpos policlonales purificados por inmunoafinidad (un parte marcada y otra no).



Un Ac en el soporte y otro que añadiremos posteriormente marcado. Se suelen usar anticuerpos monoclonales, pq en los ensayos no puede haber ruido de fondo. Se pueden usar Ac policlonales pero deben estar purificados por inmunoafinidad, tendríamos el Ac dividido en 2 partes, una marcada y la otra sin marcar, se unen a distintos epitopos del Ag.

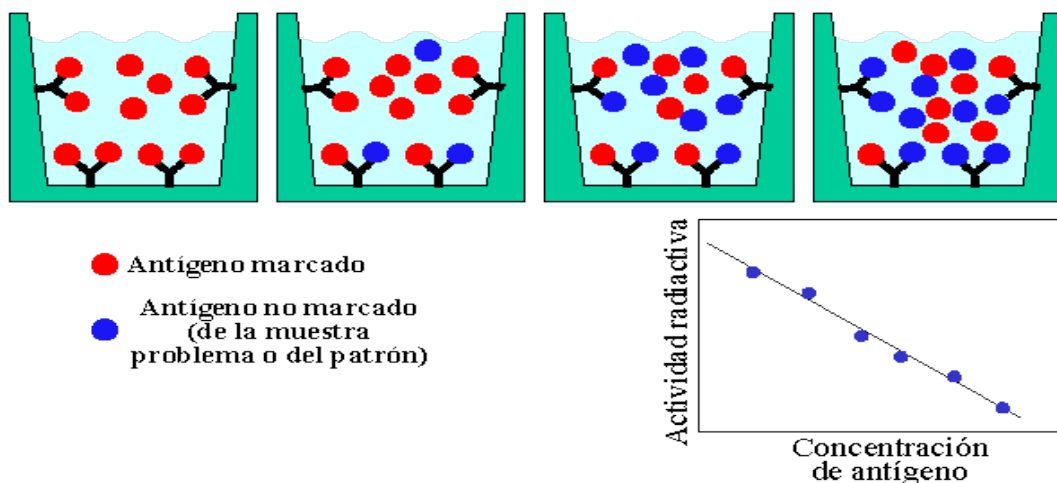
- 1.- Unión del anticuerpo no marcado al soporte.
- 2.- Bloqueo de sitios de unión libres en el soporte.
- 3.- Adición de la muestra de antígeno “problema” y lavado.
- 4.- Adición del anticuerpo marcado y lavado
- 5.- Revelado del marcador.



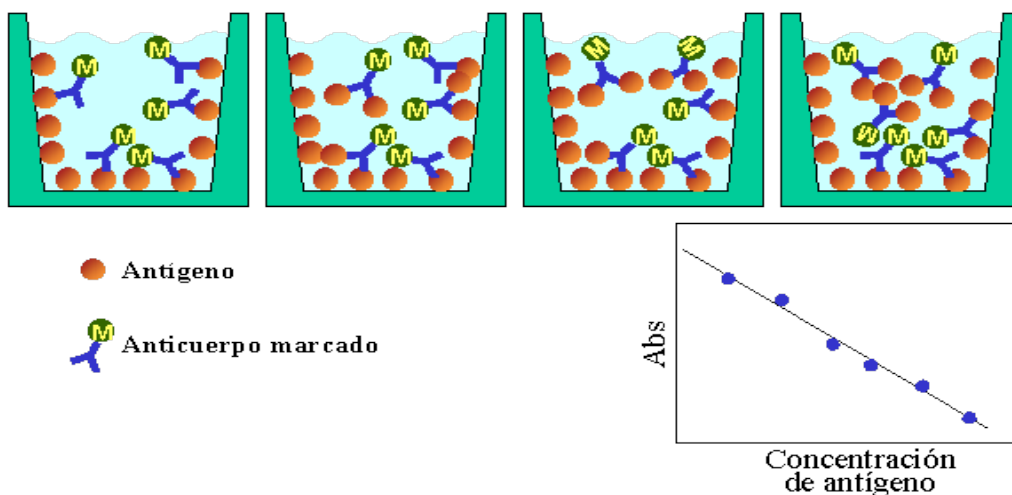
Obtenemos una muestra patrón para determinar cuantitativamente cuanto hay.

B. Ensayo de competencia. Se requiere antígeno puro, dos posibilidades:

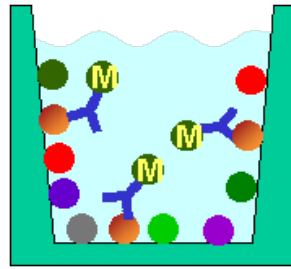
a) Captura del antígeno, con anticuerpo limitante: Una cantidad conocida de antígeno marcado se mezcla con la muestra problema (contiene antígeno frío) y ambas se ponen en una placa con anticuerpo unido al soporte. Tras incubar y lavar se mide la radiactividad en cada pocillo, cuanto mayor sea la cantidad de antígeno en la muestra, menor será la cantidad de antígeno radiactivo que se detecta (hay que hacer una curva de calibrado).



b) Captura del anticuerpo, con antígeno limitante. En primer lugar se une un antígeno puro al soporte y se añade luego una mezcla de anticuerpo marcado y muestra (con antígeno a determinar). Cuanto mayor sea la cantidad de antígeno en la muestra problema, menor será la unión de anticuerpo a la fase sólida (hay que hacer una curva de calibrado).



C. Ensayo por captura de anticuerpo: la muestra problema se une a la fase sólida y se añade luego un exceso de anticuerpo marcado.



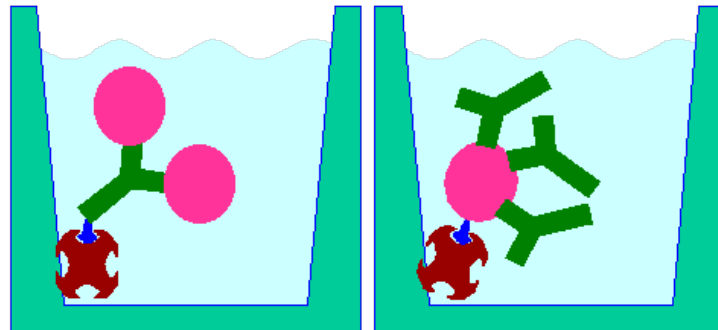
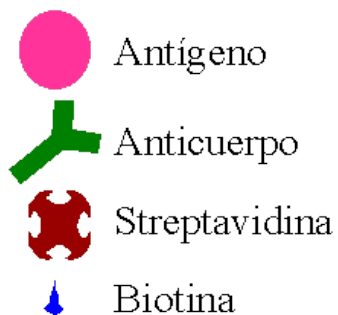
**MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE Ac** (en orden de mayor a menor sensibilidad):

Detección por captura de anticuerpo, usando un exceso de antígeno:

- 1.- Unión del antígeno (en exceso) al soporte sólido.
- 2.- Adición de la solución “problema” conteniendo los anticuerpos y lavado (todos los anticuerpos se unen).
- 3.- Adición de un anticuerpo 2º marcado (por ejemplo anti-inmunoglobulinas de conejo, obtenidas en cabra, unidas a fosfatasa alcalina) o de proteína A marcada. Lavado
- 4.- Revelado del marcador.

Los anticuerpos también pueden ser detectados tratándolos como un tipo más de antígenos, por cualquiera de los métodos de detección de antígenos ya vistos.

Placas cubiertas con streptavidina permiten el uso de antígenos o anticuerpos marcados con biotina.



## ANEXO 5

### TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.

#### Óptica: se trabaja sobre el microscopio.

1. **Fijación:** tratamiento químico para matar a las células de modo que quedan como eran *in vivo*, y que las moléculas queden fijadas, que no se eliminen/laven en manipulaciones posteriores.
2. **Seccionado:** se corta el tejido muy fino, de forma que lo atraviese la luz. Para ello se emplean los **microtomos**, estos pueden ser:
  - A. De mano: la muestra debe incluirse en un medio, la médula de saúco (de sauce, *Salix*).
  - B. De parafina: incluir la muestra en parafina, una especie de cera. Antes la muestra tiene que pasar un proceso: deshidratación, se impregna con disolvente *Xilol/Xileno*) de parafina, este junto a la parafina, y parafina únicamente.
  - C. De congelación: la muestra se impregna de nitrógeno líquido , y luego se corta con cuchilla de acero. Es el procedimiento más rápido.
3. **Tinción:** si el tejido es casi transparente hay que añadirle colorantes para permitir la visión. Normalmente se emplean más de un colorante de diferente color y también químicamente distintos. Esta es una sustancia química que reacciona con unas moléculas determinadas del tejido, quedándose fijado, así se obtiene el contraste.
4. **Montaje de la preparación:** se montan los diferentes cortes en el portaobjetos. Habitualmente se emplea el cubreobjetos, entre porta y cubre no debe haber aire. Dependiendo de la **duración**, la preparación puede ser:
  - D. Temporales: se emplea agua y otras sustancias.
  - E. Permanentes: indefinidas, se emplean bálsamo de Canadá y resinas.

**El orden entre montaje de la preparación y tinción, puede variar.**

#### **Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)**

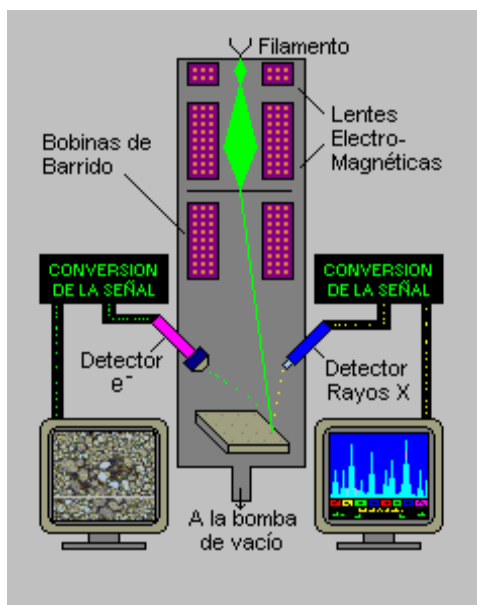
El microscopio electrónico de barrido -SEM- es el mejor método adaptado al estudio de la morfología de las superficies. A diferencia de un microscopio óptico que utiliza fotones del espectro visible, la imagen entregada por el SEM se genera por la interacción de un haz de electrones que "barre" un área determinada sobre la superficie de la muestra.

Construcción de un Microscopio Electrónico de Barrido

La parte principal de un microscopio electrónico de barrido es la denominada columna de electrones la cual lleva alojados en su interior los siguientes elementos:

- Un cañón de electrones con un filamento que actúa como emisor o fuente de iluminación, por analogía con un sistema óptico.
- Un sistema de lentes electromagnéticas encargado de focalizar y reducir a un diámetro muy pequeño el haz de electrones producido por el filamento.
- Un sistema de barrido que hace recorrer el haz de electrones ya focalizado por la superficie de la muestra.
- Uno o varios sistemas de detección que permiten captar el resultado de la interacción del haz de electrones con la muestra y transformarlo en una señal eléctrica.
- Una salida conectada a una o varias bombas que producen el vacío necesario para que el conjunto funcione adecuadamente.

Además, el microscopio posee diversos sistemas que permiten observar las señales eléctricas procedentes de los detectores, en forma de imágenes en un monitor de TV, fotografía, espectro de elementos, etc.



Por último, en el gráfico se han dibujado dos detectores. Uno, el de electrones secundarios, que son los electrones arrancados a la propia muestra por la acción del haz incidente. Con esta señal obtenemos en un monitor una imagen de la muestra, muy parecida a la visión del ojo humano debido a la gran profundidad de foco de esta señal. El otro detector, de rayos X, captura este tipo de señal, con la que obtenemos un espectro de elementos, es decir un análisis químico elemental de la muestra.

La técnica esencialmente consiste en hacer incidir en la muestra un haz de electrones. Este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales que, captadas con detectores adecuados, nos proporcionan información acerca de la naturaleza de la muestra

La señal de electrones secundarios proporciona una imagen de la morfología superficial de la muestra. La señal de retrodispersados una imagen cualitativa de zonas con distinto número atómico medio, y la señal de rayos X espectros e imágenes acerca de la composición de elementos químicos en la muestra.

### Electrones Secundarios

La señal de electrones secundarios es la que se emplea normalmente para obtener una imagen de la muestra. Es la señal que nos proporciona una imagen más real de la superficie que estemos estudiando, se considera un electrón secundario aquel que emerge de la superficie de la muestra con una energía inferior a 50 eV (electronvoltios), y un electrón retrodispersado el que lo hace con una energía mayor.

### Electrones Retrodispersados

La señal de electrones retrodispersados está compuesta por aquellos electrones que emergen de la muestra con una energía superior a 50 eV (electronvoltios). Estos electrones proceden en su mayoría del haz incidente que rebota en el material después de diferentes interacciones

La intensidad de la señal de retrodispersados, para una energía dada del haz, depende del número atómico del material (a mayor número atómico mayor intensidad) Este hecho permite distinguir fases de un material de diferente composición química. Las zonas con menor Z se verán más oscuras que las zonas que tienen mayor número atómico. Esta es la aplicación principal de la señal de retrodispersados.

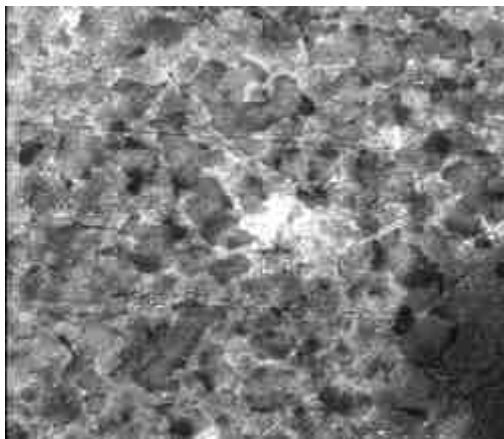


Imagen de electrones secundarios retrodispersados.

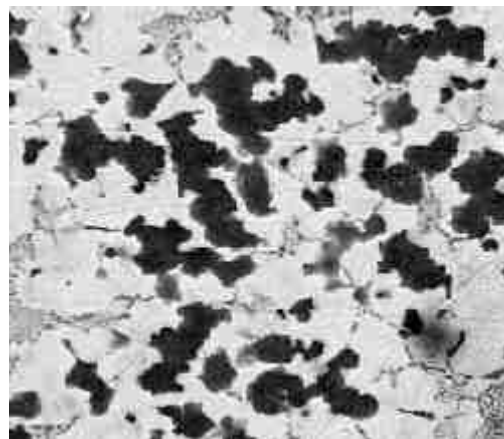


Imagen de electrones retrodispersados.

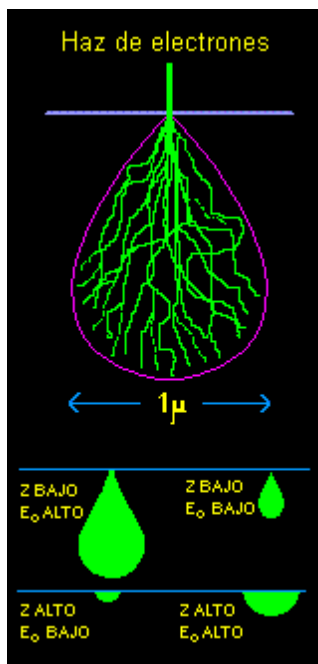
Las micrografías anteriores corresponden a la misma zona de una soldadura de un objeto de cubertería compuesta de una aleación Plata-Cobre-Niquel. En la imagen de secundarios no se aprecian con claridad las fases de la aleación, mientras que en

la imagen de retrodispersados vemos con claridad estas fases. Un análisis de rayos X puntual de cada fase mostraría que las zonas claras están compuestas por Plata y las oscuras por una aleación Cobre-Niquel.

### Microanálisis de Rayos X por Dispersión de Energías

La resolución espacial de los electrones secundarios es mucho mejor que la de los RX. Como resultado de esto, una característica de la muestra lo suficientemente grande para ser observada con la señal de secundarios puede no ser suficientemente grande como para contener todo el volumen de interacción del que emanan los RX. Con frecuencia, el haz de electrones al penetrar en la muestra causa la emisión de RX desde regiones de la superficie o de regiones cercanas, que tienen diferente composición que las del punto de incidencia del haz.

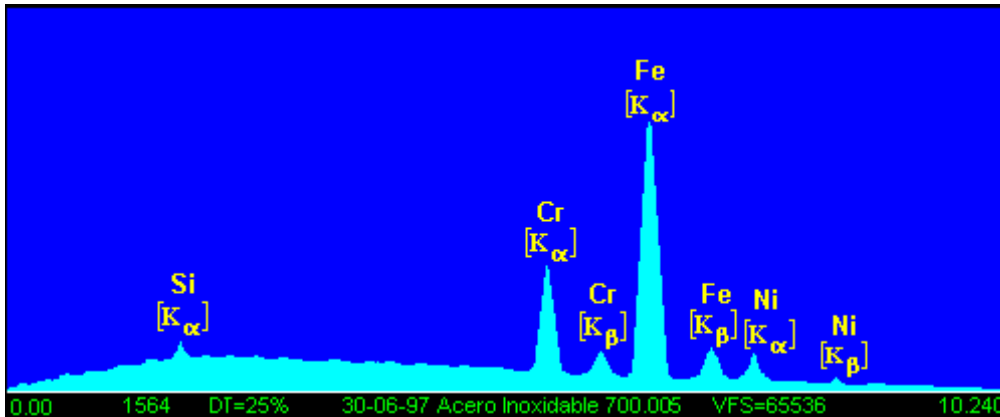
En la figura vemos las diferentes formas que puede tomar el volumen de interacción dependiendo de los valores del número atómico y de la energía del haz. Existen métodos para calcular aproximadamente el diámetro de este volumen, pero se puede asegurar que en el mejor de los casos este diámetro no es menor de una micra.



La adquisición de un espectro de RX consiste en recoger durante un determinado tiempo, normalmente del orden de minutos, los fotones de RX que proceden de la muestra, clasificándolos según su energía.

Como puede verse en la figura, un espectro de dispersión de energías se presenta usualmente como un histograma en donde el eje horizontal son unidades de energía, en Kiloelectronvoltios (KeV), en este caso de 0.00 a 10.240, y el eje vertical número de cuentas o intensidad, en este caso 65536 cuentas la altura total de la

escala, que se va autoajustando a medida que crece el número de cuentas de la energía del pico más alto.



Por último, una vez adquirido el espectro, con la ayuda de patrones o sin ellos y mediante el software adecuado se puede realizar de forma automática el análisis cualitativo, es decir, la identificación de picos y el análisis cuantitativo o cálculo de la concentración de los diferentes elementos.

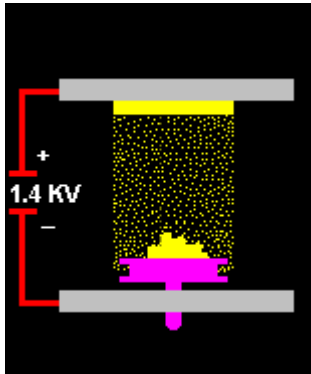
La preparación de muestras es, en general, sencilla. Los requisitos indispensables que deben cumplir son ausencia de líquidos, es decir, la muestra tiene que estar seca y además debe ser conductora de la corriente eléctrica. Este último requisito se cumple en los metales pero no así en otro tipo de materiales, por lo que para hacer a la muestra conductora se la recubre de una capa de algún material conductor tal como el carbón o el oro. Este recubrimiento ha de ser suficientemente grueso como para que circule la corriente eléctrica que se deposita en la muestra y suficientemente delgado para que no enmascare o tape las características superficiales de interés.

#### Técnica de recubrimiento con oro

Cuando el propósito del análisis de una muestra no incluye la obtención de un espectro de RX, un elemento que se utiliza frecuentemente para recubrir la superficie es el oro.

El gráfico muestra esquemáticamente lo que se conoce como "sputtering". Consiste en una fuente de alimentación en corriente continua regulable de 1 a 3 KV conectada por una parte a una tarjeta de oro u oro-paladio y por otra parte al portamuestras. El conjunto va acoplado a una bomba de vacío. La introducción de un gas tal como el argón en la campana de vacío provoca que los átomos de argón impacten en la tarjeta de oro y se desprendan átomos de dicha tarjeta que son atraídos hacia la muestra en la cual quedan depositados proporcionando un espesor de recubrimiento que depende del tiempo de exposición

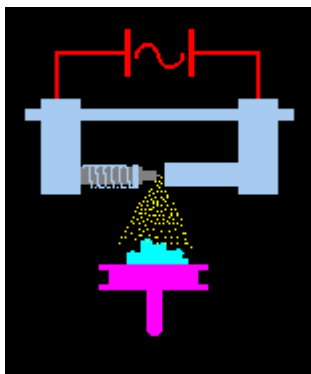




### Técnica de recubrimiento con carbono

En el caso de precisarse un análisis elemental en una muestra no conductora es necesario recubrir la superficie de un elemento lo más transparente posible a los RX. Este elemento es el carbono.

Uno de los tipos de metalizadores de carbono se muestra esquemáticamente en el gráfico. Consiste en dos electrodos conectados a una fuente de corriente alterna de bajo voltaje y alta intensidad entre los que se intercala una barra de carbono terminada en una punta afilada. Al pasar la corriente, la punta de la barra se va evaporando, de forma que rocía la muestra con una fina capa de carbono. La punta va acoplada a un muelle que la mantiene en todo momento en contacto con el otro electrodo. Todo el conjunto está encerrado en vacío con el fin de facilitar la deposición de la película de carbono sobre la muestra.

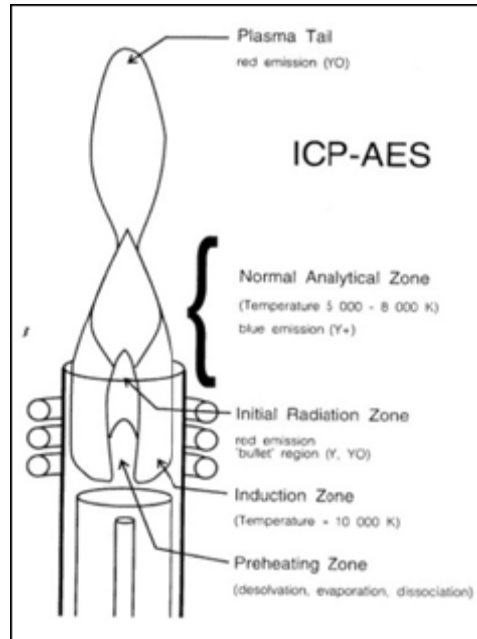
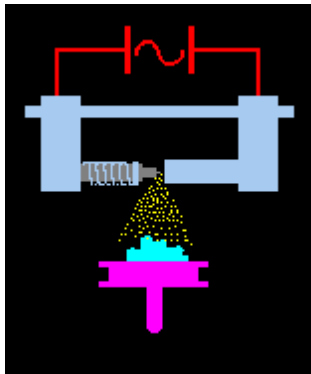


### Espectrometría Por Inducción de Plasma (ICP)

La espectrometría por inducción de plasma es una de las técnicas más versátiles para el análisis de muestras geológicas y ambientales, incluyendo rocas, minerales, aguas, suelos, sedimentos, etc., siendo probablemente el primer método práctico para la determinación simultánea de un gran número de elementos trazas con la exactitud requerida para muchos estudios petrológicos y geoquímicos.

La Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo es una técnica para análisis elemental con un límite de detección en el rango de partes por billón. ICP-MS provee información cualitativa y cuantitativa junto con composición

isotópica. Sus aplicaciones incluyen análisis de rocas, suelo, sedimento, agua, aire, tejidos vegetales y animales. Se obtiene un plasma de gas argón haciendo fluir una corriente de argón hacia una antorcha con un flujo de corriente de alta frecuencia en una bobina de inducción con campos magnéticos oscilantes. El plasma posee una temperatura superior a los 10.000 K.



Se introduce una muestra líquida en el sistema en forma de aerosol mediante un nebulizador. Una vez que la muestra alcanza el plasma, los iones de la muestra son excitados y reversionados espontáneamente a un estado de energía menor emitiendo un fotón de energía. Para propósitos cuantitativos, se asume que la energía emitida es proporcional a la concentración de iones.

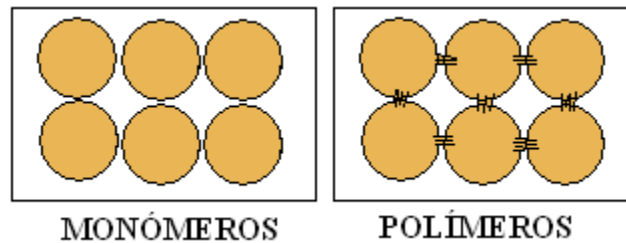
La luz emitida por la fuente emisora de plasma es enfocada a la ranura de entrada del sistema óptico. Después de pasar a través de la ranura de entrada, la luz es dispersada por una rejilla de difracción. Una gama estrecha de ondas dispersadas pasan por la rejilla de salida y caen en un detector.

El detector convierte la energía lumínica en corriente eléctrica, y la magnitud de la corriente es proporcional a la intensidad de la luz. La corriente es integrada sobre un periodo de tiempo predefinido y es medida por el circuito detector y pasa a la computadora.

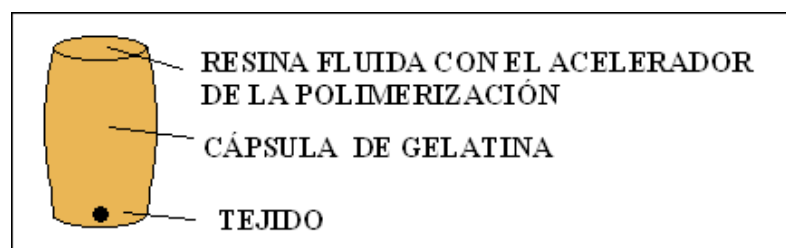
La longitud de onda de la luz medida por el detector es controlada ajustando el ángulo de difracción de la rejilla relativo al haz de luz incidente, en un escaneo, las características de longitud de onda de emisión atómica de la muestra son medidas. Se analiza rápidamente entre las longitudes de onda y se para de medir solo cuando son registradas las longitudes de onda deseadas.

Técnica de Microscopía Electrónica: se trabaja sobre fotografías.

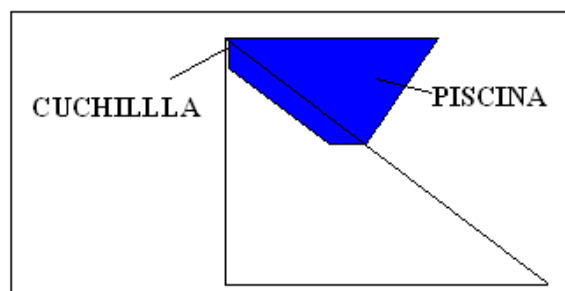
1. **Fijación:** tiene mucha importancia. Se sigue el mismo proceso que en la microscopía óptica.
2. **Seccionado:** los cortes, muy finos, son atravesados por electrones (muy poco poder de penetración). Se usan los ultramicrotomos, para poder emplearlos se debe incluir la muestra en una resina muy dura (polimerizada). La **resina** pasa por dos estados:
  - F. Como monómeros (unidades): moléculas muy grandes. La sustancia es fluida, pero viscosa, debido al choque y unión de estas grandes moléculas. La inclusión de la muestra, se produce en este estado.



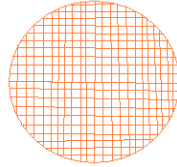
- G. Como polímeros (unión de unidades): son monómeros unidos fuertemente. Tiene estado sólido, es muy duro. Cuando, se impregna con disolvente de resina, este junto a la resina, y resina únicamente. Cuando la resina está en este estado se puede cortar.



Se emplean cuchillas de vidrio o de diamante. Los cortes se recogen en una minipiscina



3. **Montaje de la preparación:** en una rejilla de cobre, que actúa como red en la mini piscina. La rejilla es el portaobjetos. Se usa cobre porque los tejidos se adhieren bien .



4. **Tinción:** se tiñe siempre, aunque sin colorantes. En este caso se emplean metales pesados, ya que estos átomos pesados desvían a los electrones, mientras que los átomos ligeros no lo hacen. Y porque la materia viva está formada por átomos ligeros (C, N ,O...). Estos **metales pesados** se introducen formando parte de sustancias químicas, reaccionan selectivamente con las moléculas de una célula.

- H. Osmio (Tetróxido de Os): es un fijador y un colorante, pone negra la muestra en un principio. Reacciona con: lípidos, proteínas y polisacáridos. Fija a: membranas (lípidos y proteínas), citoplasma (proteínas), granos de glucógeno (animal), granos de almidón (vegetal).
- I. Plomo (Citrato de Pb): refuerza la acción del osmio.
- J. Uranio (Acetato de Uranio): reacciona con los ácido nucleicos.

### PODER DE RESOLUCIÓN DE UN MICROSCOPIO.

**Distancia mínima a la que pueden estar dos estructuras, para verse como dos distintas.**

#### Unidades:

$1 \text{ mm} = 1.000 \mu$  (micras)( m. óptico)=  $10 \text{ nm}$  (nanómetro)( longitud de onda/ fotosíntesis) =  $10 \text{ \AA}$  (ámstrongs)(m. electrónico).

#### Óptico:

- Poder de resolución:  $\sim 0'25 \mu$
- Aumento común: 2.000 x
- Aumento máximo: 4.000 x

#### Electrónico:

- Poder de resolución:  $\sim 5-10 \text{ \AA}$
- Aumentos: 200.000-300.000 x

## Anexo 6 CITOMETRIA DE FLUJO

### CARACTERISTICAS:

La CMF es una técnica sencilla que se aplica en la rutina diaria de muchos laboratorios clínicos y de investigación, capaz de proporcionar resultados de forma rápida que pueden ser aplicables al diagnóstico. Gracias a su gran especificidad es capaz de distinguir entre varias diferentes, y detectar una población celular en una muestra en la que predominan otras poblaciones celulares mayoritarias. Pero la principal característica de la CMF es que puede ofrecer información simultánea de varios parámetros de cada una de las células analizadas y la relación entre los parámetros de una célula y los de otra célula también analizada. Permite el análisis de dos parámetros de dispersión, SSC/FSC y tres de fluorescencia (en equipos con un solo láser), FI1, FI2 y FI3, y de una cuarta fluorescencia en equipos con dos láseres.

**VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA CITOMETRIA DE FLUJO**  
Debido a la necesidad de utilizar una suspensión de partículas (células, núcleos, cromosomas, etc), para ser leídas de una en una hace que se pierda información sobre la arquitectura de los tejidos que componen las células o de las propias células, así como la interacción entre estas y el medio que las rodea (patrones nodulares o difusos de los linfomas). Frente a este inconveniente la CMF presenta múltiples ventajas frente al microscopio de fluorescencia y las técnicas citoquímicas, como:

- Posibilidad de empleo de múltiples frente a un solo marcaje de la citoquímica y la microscopia de fluorescencia.
  - Posibilidad de analizar un elevado número de partículas en un corto período de tiempo (5000 partículas/segundo).
  - Posibilidad de cuantificar la por medio de los canales medios de fluorescencia.
  - Mayor sensibilidad y objetividad que le permiten detectar enfermedad mínima residual y caracterizar poblaciones celulares poco abundantes en condiciones normales como los basófilos.
  - Posibilidad de analizar poblaciones celulares y epitopos celulares. - Permite almacenar informáticamente la información del análisis para poderla utilizar en cualquier momento y reanalizar análisis hechos con anterioridad.
  - Posibilidad de cuantificar las moléculas antigénicas presentes en un grupo celular.
- (www.citometriadeflujo.com)

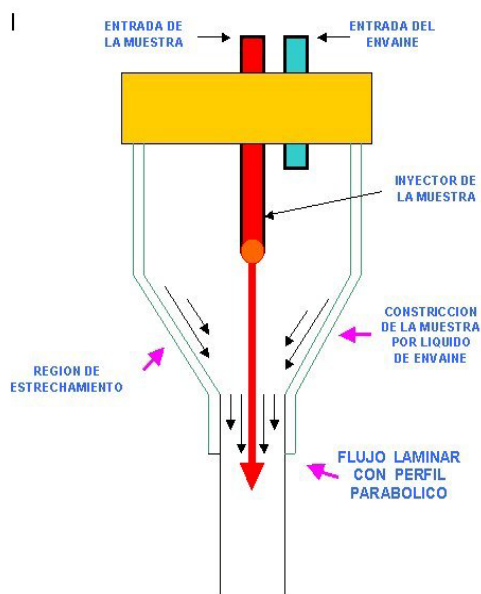
### ESTRUCTURA BÁSICA DE UN CITÓMETRO DE FLUJO

Está compuesto por tres partes:

- \* SISTEMA FLUÍDRICO - Inyección de la muestra.

- CÁMARA de flujo.
- \* SISTEMA OPTICO - Fuentes de luz.
- Detectores
- \* SISTEMA ELECTRICO - Amplificador-convertidor.
- Sistema informático

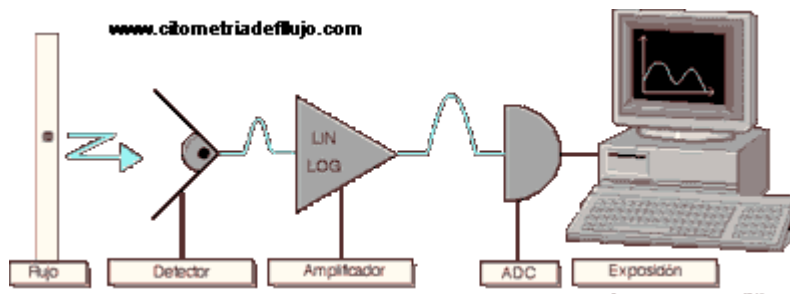
- SISTEMA FLUÍDRICO: Este sistema consta de dos fluidos, uno que contiene en suspensión a la muestra y otro que lo envuelve a fin de darle estabilidad (sheath fluid). Las células deben pasar una a una por delante del haz del láser. Ambos fluidos (Solución fisiológica, PBS, aire) no se mezclan porque circulan a diferente presión.



### BOQUILLA DEL CITOMETRO FLUJO DE LOS LIQUIDOS

- SISTEMA ÓPTICO : Este sistema se compone de dos tipos de ópticas:
- La óptica de excitación, compuesta de el láser y las lentes para enfocar y dirigir el haz de luz; y
- La óptica de lectura, compuesta por las lentes de recolección de luz emitida luego de la interacción entre el haz del láser y las partículas y el sistema de espejos y filtros para direccionar longitudes de onda específicas hacia los detectores correspondientes.
- FILTROS OPTICOS: Son aquellos que seleccionan las longitudes de onda que deja pasar hacia el detector. Estos pueden ser:
  - DE INTERFERENCIA (Dicroicos que reflejan las long de onda no deseadas);
  - DE ABSORCION (absorben las long de ondas no deseadas). De éstos hay tres tipos:
    - Filtros Band Pass : Dejan pasar un rango de longitudes de onda (Por ej.: 620 – 640 nm)

- Filtros Short Pass: Dejan pasar por debajo de una longitud de onda determinada ( Por ej.: < 575 nm)
- Filtros Long Pass: Dejan pasar por encima de una longitud de onda determinada (Por ej.: > 520 nm)



- SISTEMA ELECTRICO: El sistema electrónico convierte todo en señales digitales para almacenar en la computadora.

### INFORMACION OBTENIDA POR CITOMETRIA DE FLUJO

Básicamente podemos obtener los siguientes datos:

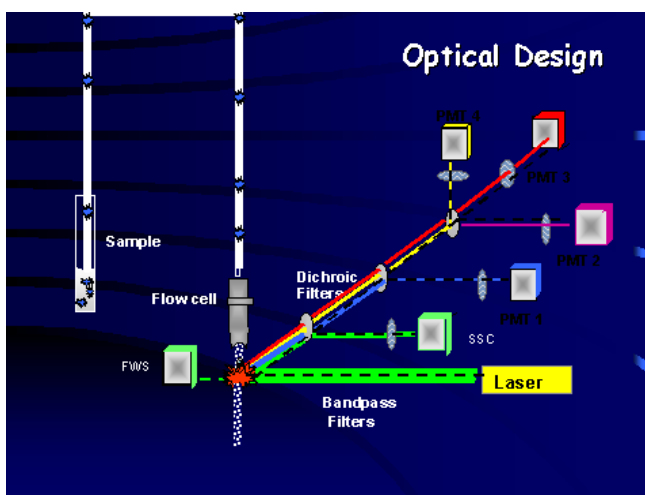
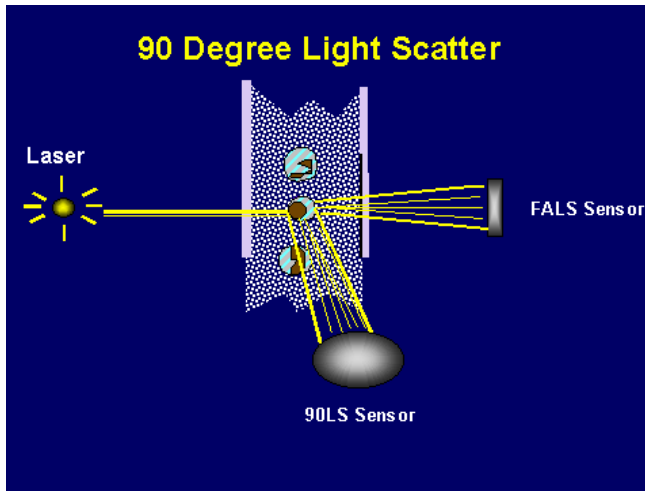
- Tamaño de la célula
- Complejidad de la membrana celular
- Con el uso de fluorocromo se puede detectar hasta 3 colores con un mismo laser

Señales de dispersión: La dispersión resulta de la interacción de la luz con una partícula que produce un cambio de dirección (no de la longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión de la luz son fundamentalmente el tamaño celular, la membrana, el núcleo y el material granular del interior de la célula, llamado complejidad. En los Citómetros de Flujo se miden dos fracciones de dispersión:

- La luz dispersada en ángulo cónico pequeño (0-10°) que casi coincide con la dirección de la luz incidente, llamada FSC (Forward Scatter). Es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión.
- La luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (Side Scatter). Es proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula.

Señales de Fluorescencia: Un fluorocromo es una molécula química que absorbe luz a una determinada longitud de onda (energía) y emite a una longitud superior (menor energía). El espectro de absorción o excitación es el rango sobre el que un fluorocromo absorbe luz, y el espectro de emisión es el rango sobre el que un fluorocromo emite luz. Cuando un fluorocromo interacciona con la luz de excitación procedente del láser emite energía radiante. Debido a que parte de la energía se utiliza para la absorción, la luz emitida es de menor energía que la luz de excitación, es decir la longitud de onda emitida es mayor. La diferencia entre la longitud de onda de absorción y emisión se denomina Stokes shift. Los citómetros de flujo permiten

detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos Antígeno/Anticuerpo marcados con un fluorocromo y situados en una célula, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula.



De forma esquemática, las células teñidas entran en la cámara de flujo de una en una y, al pasar por delante de un haz de luz de láser, emiten una luz fluorescente y dispersada, que es separada de acuerdo a su longitud de onda por apropiados filtros y espejos. Estas señales luminosas son recogidas por detectores y la información se integra y analiza adecuadamente por un sistema informático.

## Anexo 7

### CUADRO DE CONTROL INTERNO



FECHA	OBSERVACIONES
05 agosto 09	<p><b>1.- Cambios del protocolo para presentar al Comité de Investigación INR</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Revisar faltas de ortografía</li> <li>-Modificar cambios de tono de color y de tipos de letra</li> <li>-Proponer algún investigador de patología para que nos apoye con las tinciones</li> <li>-Proponer un sitio donde obtener los ratones (SINVESTAB, NUTRICION, ETC)</li> <li>-Revisar que las referencias correspondan con el artículo</li> <li>-Modificar los signos de puntuación</li> <li>-Modificar Colágena tipo I con letra romana</li> <li>-Dar continuidad a los párrafos con frases adecuadas</li> <li>-El párrafo que nos habla de que hay una gran cantidad de preguntas sin respuesta, pasa a la Justificación</li> <li>-Buscar como Runx 2, Fosfatasa alcalina son marcadores para hueso de novo</li> <li>-Pasar el párrafo de cómo medir la presencia de hueso de novo en metodología</li> <li>-El párrafo de fosfatasa alcalina pasarlo a metodología</li> <li>-El planteamiento del problema de salud quitarlo de los antecedentes y agregarlo a justificación</li> <li>-En justificación en el párrafo de misión visión agregar INP e INR</li> <li>-Modificar el párrafo de conejos y agregar ratones</li> <li>-Agregar el formato del comité de investigación a metodología, justificación, etc</li> <li>-Verificar las especificaciones del Bioterio para tener los ratones atómicos</li> <li>-Quitar el párrafo de Instrumental quirúrgico</li> <li>-Agregar como ANEXOS: Productos derivados de a investigación Modificaciones</li> </ul> <p><b>2.-Planear un cronograma de agosto a diciembre del 2009 con las siguientes propuestas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Agosto a Septiembre: Revisión del protocolo Familiarizarse con las técnicas de tinciones, microscopía Inmunohistoquímica, etc</li> <li>-Octubre a Noviembre: Conseguir los ratones y planear su estancia</li> <li>-Enero 2010 Planear cirugía de ratones para instalar las unidades osteogénicas</li> </ul>
12 agosto 09	<p><b>1.-Modificaciones al protocolo de investigación</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Agregar en antecedentes desde el punto de vista de ingeniería de tejidos como se da la osificación membranosa y los marcadores de genes para hueso</li> <li>-Planear hacer un modelo experimental en lesiones craneales en perros y su aplicación en pacientes humanos</li> <li>-Conocer el grosor del cráneo y el tamaño del cráneo de los ratones para planear el tamaño del defecto de tamaño crítico</li> <li>-Valorar hacer pruebas biomecánicas del hueso (PLANEAR HACER UN ENSAYO BIOMECANICO AL FINAL DEL PRIMER ESTUDIO)</li> <li>-Valorar hacer por inmunohistoquímica la presencia de fosfatasa alcalina, pontina, osteopontina</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Descripción de hueso de novo en forma experimental</li> <li>-Obtener cráneo de ratones de la misma edad que planeamos trabajar</li> <li>-Definir la población y rango de edad</li> <li>-Planear un grupo control para comparar con el neotejido</li> <li>-Antes de colocar las células mesenquimales en la unidad osteogénica hay que comprobar que efectivamente son células de la médula ósea y su fenotipo (esto se hace por citometría de flujo)</li> <li>-Valorar el andamio y luego implantar a los ratones</li> <li>¿Cuánto tiempo tardamos en obtener el hueso?</li> <li>-6 semanas primeras observaciones con toma de muestra</li> <li>-3 meses la siguiente toma</li> <li>- 6 meses la última toma</li> <li>¿Para la toma de muestra que hacer?</li> <li>-Análisis molecular de proteínas específicas de hueso</li> <li>-Aislar RNA por PCR o DNA</li> <li>-Buscar genes específicos de hueso (Osteopontina, Osteocalcina, etc)</li> <li>¿Qué proteínas de hueso vamos a buscar?</li> <li>-Fosfatasa alcalina por inmunohistoquímica</li> <li>¿Cómo demostramos los depósitos de calcio</li> <li>-Pro medio de tenciones de hematoxilina y eosina y Masson o Von Kossa</li> <li>PROPONEMOS 4 GRUPOS DE RATONES CON 5 RATONES CADA UNO</li> <li>-Un grupo control</li> <li>-Un grupo para búsqueda de DNA o RNA por PCR</li> <li>-Un grupo para Histoquímica</li> <li>-Un grupo para microscopía de Barrido a través de un ensayo de presencia y ausencia para una prueba no paramétrica. Toda la estructura del hueso midiendo el tamaño de las espículas, el análisis de difracción de rayos X para saber cuánto fosfato y cuanto calcio se depositó</li> <li>-Demostrar la evolución y desarrollo de osificación membranosa usando técnica de ingeniería de tejido</li> <li>PLAN DE TRABAJO</li> <li>-Defecto de tamaño crítico</li> <li>-Estructura histopatológica</li> </ul>
<p>19 agosto 09</p>	<p><b>1.- Modificaciones al protocolo de Investigación</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Definir el tipo de estudio en cuanto a temporalidad</li> <li>-Agregar en objetivos que va a ser en pasta el hueso desmineralizado</li> <li>-Mejor especificados los objetivos</li> <li>-Agregar hipótesis</li> <li>-Mencionar porque no se ponen placas de titanio en los niños</li> <li>-Valorar hacer la determinación de genes específicos por medio de Hibridación in situ</li> <li>-Identificar hueso por Fosfatasa alcalina</li> <li>-Identificar depósitos de hueso por tinción de Von Kossa</li> <li>-Identificar por Tinción de Masson Fibrosis, Fibrina y colágena de hueso</li> <li>-Determinar la morfología del hueso por tinción de Hematoxilina y eosina</li> <li>-Valorar si en objetivos en el grupo control aplicar sólo dermis acelular con hueso desmineralizado sin células</li> <li>-En variables del estudio quitar la presencia de RNA y DNA</li> </ul>

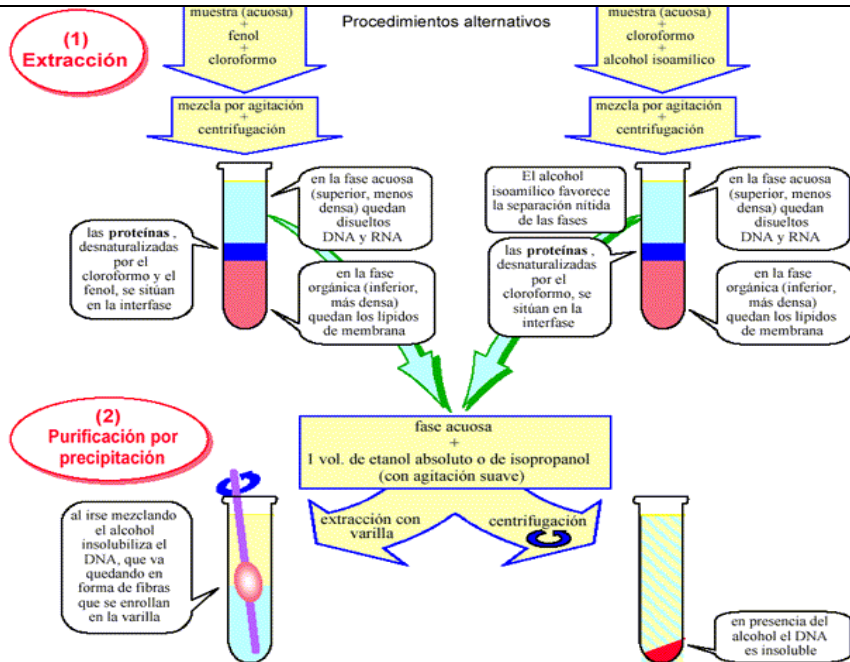
	-Agregar presencia de depósitos de calcio
26 agosto 09	<p><b>1.- Modificaciones al protocolo de investigación</b></p> <p>-Agregar como se forma la unidad osteogénica al resumen y al texto</p> <p>-Corregir el protocolo, en una parte dice 3 ratones por grupo y en otro 5 por grupo</p> <p>-Especificar porque se tomaran las muestras a las 3 semanas, a los 3 y 6 meses</p> <p>-Reducir la justificación</p> <p>-El protocolo queda como: Descriptivo, Transversal, Experimental, Prospectivo</p> <p>-En material y método: Agregar como obtener la unidad osteogénica</p>
02septiem09	<p><b>1.-Propuesta de trabajo de acuerdo a las siguientes fechas para preparación para el protocolo</b></p> <p>30 Sept. 09 al 25 nov. 09 Referente de normalidad de: Toma y estudio de poblaciones de</p> <p style="text-align: center;">médula ósea</p> <p style="text-align: center;">Toma de muestras de cráneo para</p> <p>microscopía de</p> <p style="text-align: center;">Barrido</p> <p style="text-align: center;">Tinciones para hueso membranoso</p>
09septiem09	<p><b>1.-Propuesta de trabajo de acuerdo a las siguientes fechas para preparación del protocolo</b></p> <p>-14 de diciembre: En esta fecha debemos tener material para búsqueda de fosfatasa alcalina, osteopontina y Runx 2, material para tinciones y material para microscopía de barrido</p>
17septiem09	<p><b>1. Minuta de Reunión con el Dr. Carlos Jiménez</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ratones serán parte del apoyo que otorgara INR, a través de la Dra. María Cristina Velasquillo Martínez. Jefa del Departamento de Ingeniería en tejidos. INR.</li> <li>2. Derivara una proporción de sus proyectos para financiar el proyecto de Ana.</li> <li>3. Compra de ratones "atimicos", según costeo en diferentes instituciones.</li> <li>4. Revisadas y corregidas las referencias bibliográficas</li> <li>5. Preguntas por investigar no contestadas. Tanto en planteamiento del problema como en justificación.</li> <li>6. Grupo expertos:             <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Coordinadores: Ana Sesman, Dra. María Cristina Velasquillo Martínez, Carlos Jiménez.</li> <li>b. Invitados: 10 a 15 personas, diferentes instituciones.</li> <li>c. Áreas temáticas de interés:                 <ol style="list-style-type: none"> <li>i. Histopatología</li> <li>ii. Microscopia de barrido</li> <li>iii. Proteínas de hueso</li> </ol> </li> <li>d. Agenda Trabajo:                 <ol style="list-style-type: none"> <li>i. Autoría Intelectual, Patente y Declaración de Conflictos de Interés                     <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Registro ante Comité de Investigación y Ética del INR</li> <li>2. Carta la elabora Carlos</li> </ol> </li> </ol> </li> </ol> </li> </ol>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>ii. Resultados de la Revisión Sistemática.</li> <li>iii. Muestreo</li> <li>iv. Variables de estudio</li> <li>v. Métodos de medición</li> <li>vi. Controles de calidad (internos y externos)</li> <li>vii. Referente de normalidad de técnicas y procedimientos</li> </ul> <p>e. Publicación:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Manual técnico de procedimientos....             <ul style="list-style-type: none"> <li>1. OPS.OMS</li> </ul> </li> <li>ii. Artículo en la Revista Iberoamericana de Cirugía Plástica.</li> </ul>																													
<p>22septiem09</p>	<p>Minuta de trabajo Dra. Velasquillo</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Contamos ya con financiamiento para los ratones y el protocolo en general</li> <li>2. En la uam xochimilco no hay alguien que nos pueda apoyar, la Dra. Velasquillo les va a dar apoyo en cuanto al tema de ingeniería de tejidos</li> <li>3. No es necesario invitar a otro patólogo porque voy a empezar a trabajar con la microscopia de barrido las tinciones histopatológica y biología molecular y vamos a estandarizar el manejo de cada área con respecto a la formación de hueso membranoso( de cráneo) y de acuerdo al resultado de la Referente de normalidad sabremos como necesitamos y cómo manejar las muestras</li> <li>4. La reunión de expertos ya está pactada con los siguientes invitados:</li> </ol> <table border="1" data-bbox="351 1232 1372 1937"> <thead> <tr> <th>Tema</th> <th>Experto</th> <th>Adscripción</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tinciones histopatológica</td> <td>Dra. Leticia Baena</td> <td>Inr</td> </tr> <tr> <td>Microscopia de barrido</td> <td>m. En c Lilia Solís</td> <td>Inr</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Biología molecular</td> <td>m en c Alberto López</td> <td>Inr</td> </tr> <tr> <td>m en c Erika</td> <td>Inr</td> </tr> <tr> <td>Veterinario y manejo animales</td> <td>Dr. Ricardo gomez</td> <td>inr</td> </tr> <tr> <td>Genética (fenotipo de células)</td> <td>m. En c. Carlos</td> <td>Inr</td> </tr> <tr> <td>Fotógrafo profesional</td> <td>pendiente el nombre</td> <td>Inr</td> </tr> <tr> <td>Comité científico</td> <td>Dr. Jose antonio leon perez</td> <td>inp</td> </tr> <tr> <td>Investigación experimental</td> <td>Dr. Gabriel lopez velasquez</td> <td>inp</td> </tr> </tbody> </table>	Tema	Experto	Adscripción	Tinciones histopatológica	Dra. Leticia Baena	Inr	Microscopia de barrido	m. En c Lilia Solís	Inr	Biología molecular	m en c Alberto López	Inr	m en c Erika	Inr	Veterinario y manejo animales	Dr. Ricardo gomez	inr	Genética (fenotipo de células)	m. En c. Carlos	Inr	Fotógrafo profesional	pendiente el nombre	Inr	Comité científico	Dr. Jose antonio leon perez	inp	Investigación experimental	Dr. Gabriel lopez velasquez	inp
Tema	Experto	Adscripción																												
Tinciones histopatológica	Dra. Leticia Baena	Inr																												
Microscopia de barrido	m. En c Lilia Solís	Inr																												
Biología molecular	m en c Alberto López	Inr																												
	m en c Erika	Inr																												
Veterinario y manejo animales	Dr. Ricardo gomez	inr																												
Genética (fenotipo de células)	m. En c. Carlos	Inr																												
Fotógrafo profesional	pendiente el nombre	Inr																												
Comité científico	Dr. Jose antonio leon perez	inp																												
Investigación experimental	Dr. Gabriel lopez velasquez	inp																												



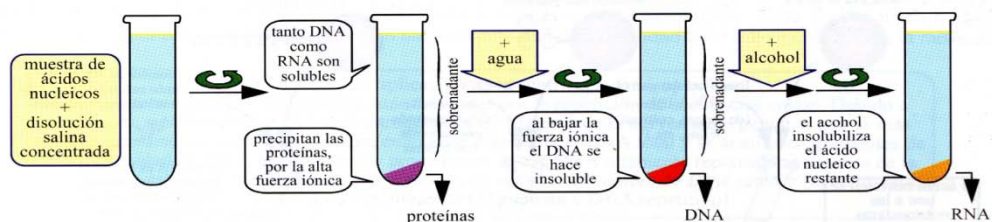
	<p>Tritón</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticuerpo 2° (1:100): Tomar 0.5 mL de Pba mas 5 mL de anticuerpo secundario</li> </ul>																																																
14Octubre09	<p><b>1.- Realización de Inmunohistoquímica</b></p> <p>-Desparafinar y Rehidratar</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fijar con PFA 1% 20 min en refrigeración</li> <li>• Lavar con PBS 2 veces 3 min</li> </ul> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Soluciones</th> <th>Tiempo(mi n)</th> <th>No. veces</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Etanol absoluto 100%</td> <td>3</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Etanol 96%</td> <td>3</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Etanol al 70%</td> <td>3</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>PBS</td> <td>3</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table> <p>-Oxidación endógena y bloqueo</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Soluciones</th> <th>Tiempo (min)</th> <th>No. Veces</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Peróxido de hidrogeno al 3% Para bloquear la actividad endógena de la peroxidasa del tejido</td> <td>10</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>PBS</td> <td>3</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Solución de bloqueo</td> <td>20</td> <td>Temp. ambiente</td> </tr> </tbody> </table> <p>-Inmunoreacción y tinción:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Soluciones</th> <th>Tiempo (min)</th> <th>No. Veces</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PBS</td> <td></td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Anticuerpo 1° (Solución de bloqueo, Ac primario, 1:50)</td> <td>Durante toda la noche</td> <td>4° C en cámara húmeda</td> </tr> <tr> <td>PBS (PBS; Tritón al 0.1%)</td> <td>3</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Anticuerpo 2° (Solución de bloqueo, Ac secundario, 1:50)</td> <td>2hrs</td> <td>37° C cámara húmeda</td> </tr> <tr> <td>PBS (PBS; Tritón al .1%)</td> <td>3</td> <td>Temp. ambiente</td> </tr> <tr> <td>Reactivo A+B</td> <td>20</td> <td>4</td> </tr> </tbody> </table>	Soluciones	Tiempo(mi n)	No. veces	Etanol absoluto 100%	3	2	Etanol 96%	3	2	Etanol al 70%	3	2	PBS	3	2	Soluciones	Tiempo (min)	No. Veces	Peróxido de hidrogeno al 3% Para bloquear la actividad endógena de la peroxidasa del tejido	10	1	PBS	3	2	Solución de bloqueo	20	Temp. ambiente	Soluciones	Tiempo (min)	No. Veces	PBS		3	Anticuerpo 1° (Solución de bloqueo, Ac primario, 1:50)	Durante toda la noche	4° C en cámara húmeda	PBS (PBS; Tritón al 0.1%)	3	4	Anticuerpo 2° (Solución de bloqueo, Ac secundario, 1:50)	2hrs	37° C cámara húmeda	PBS (PBS; Tritón al .1%)	3	Temp. ambiente	Reactivo A+B	20	4
Soluciones	Tiempo(mi n)	No. veces																																															
Etanol absoluto 100%	3	2																																															
Etanol 96%	3	2																																															
Etanol al 70%	3	2																																															
PBS	3	2																																															
Soluciones	Tiempo (min)	No. Veces																																															
Peróxido de hidrogeno al 3% Para bloquear la actividad endógena de la peroxidasa del tejido	10	1																																															
PBS	3	2																																															
Solución de bloqueo	20	Temp. ambiente																																															
Soluciones	Tiempo (min)	No. Veces																																															
PBS		3																																															
Anticuerpo 1° (Solución de bloqueo, Ac primario, 1:50)	Durante toda la noche	4° C en cámara húmeda																																															
PBS (PBS; Tritón al 0.1%)	3	4																																															
Anticuerpo 2° (Solución de bloqueo, Ac secundario, 1:50)	2hrs	37° C cámara húmeda																																															
PBS (PBS; Tritón al .1%)	3	Temp. ambiente																																															
Reactivo A+B	20	4																																															

	PBS (PBS; Tritón al .1%)	3	4																														
	Dako L DAB+ SCS	5-20	Hasta la reacción deseada																														
	PBS	3	2																														
-Para contrastar:																																	
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Soluciones</th> <th>Tiempo (min)</th> <th>No. veces</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Hematoxilina</td> <td>1</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Agua corriente para lavar</td> <td></td> <td>Eliminar exceso colorante</td> </tr> <tr> <td>Agua amoniacal</td> <td>1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Carbonato de litio saturado</td> <td>1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Agua destilada</td> <td>1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Etanol al 96%</td> <td>2</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Etanol al 1005</td> <td>2</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Xilol</td> <td>2</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Xilol</td> <td>20</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				Soluciones	Tiempo (min)	No. veces	Hematoxilina	1	3	Agua corriente para lavar		Eliminar exceso colorante	Agua amoniacal	1		Carbonato de litio saturado	1		Agua destilada	1		Etanol al 96%	2		Etanol al 1005	2		Xilol	2		Xilol	20	
Soluciones	Tiempo (min)	No. veces																															
Hematoxilina	1	3																															
Agua corriente para lavar		Eliminar exceso colorante																															
Agua amoniacal	1																																
Carbonato de litio saturado	1																																
Agua destilada	1																																
Etanol al 96%	2																																
Etanol al 1005	2																																
Xilol	2																																
Xilol	20																																
<ul style="list-style-type: none"> <li>Se elimina el exceso de xilol de la laminilla y se aplica resina transparente hasta cubrir los cortes histológicos que contenga la laminilla</li> <li>Se coloca un cubreobjetos sobre los tejidos embebidos en la resina y se dejan secar hasta el siguiente día</li> </ul>																																	
29Octubre09	<b>1.-Aprendizaje de técnica EXTRACCION DE RNA</b> Extracción RNA <ul style="list-style-type: none"> <li>Primera etapa de la mayoría de estudios Biol M</li> <li>Obtener AN purificados de diversas fuentes → realizar análisis específicos.</li> <li>Calidad y pureza de AN</li> </ul> Métodos de extracción Disolventes orgánicos Fenol – cloroformo Cloroformo-alcohol isoamílico Precipitación salina  Disolventes orgánicos: <ul style="list-style-type: none"> <li>FUNDAMENTO: Eliminar contaminantes de los AN               <ul style="list-style-type: none"> <li>FASE ACUOSA: Disueltos DNA y RNA</li> <li>INTERFASE: Proteínas desnaturalizadas</li> <li>FASE ORGÁNICA: Quedan los lípidos en la mb</li> </ul> </li> </ul>																																



### Precipitación salina

- FUNDAMENTO: diferencias de solubilidad de DNA y RNA en función a la concentración de sales
  - DNA y RNA soluble en disolución salina concentrada
  - RNA soluble a baja concentración de sales
- NaCl, tmb acetato sódico saturado en combinación con alcoholes orgánicos.



04Noviem09

### 1.-Modificaciones al protocolo de investigación

- Hablar con la histotecnóloga Lilia soto sobre las tinciones de Von Kossa y Massón
- Planear hacer el antígenos de superficie de las células de la médula ósea o hacer el fenotipo de las mismas
- Hacer un conteo de las células (saber cuáles y cuantas)
- Hablar con el Dr. Lecona del Bioterio y preguntar a que laboratorio podemos mandar para hacer una prueba automatizada de la médula ósea y saber cuántas células por mililitro estamos poniendo
- Para la detección de la expresión de los genes específicos de la línea osteogénica se utilizará la técnica de transcripción inversa y la reacción de cadena de la polimerasa



	<p>-Determinación de tejido osteoide por tinción de Von Kossa          -Zonas osificadas por Tricrómico de Massón          -Tejido osteoide y hueso desmineralizado con hematoxilina y Eosina          -Presencia de colágena I en la matriz extracelular  <b>AGREGAR LOS SIGUIENTES ANEXOS AL PROTOCOLO:</b>          -Inmunohistoquímica          -Hematoxilina y Eosina          -Tinciones de Von Kossa, Tricrómico de Massón, Microscopía de barrido y RT PCR</p> <p><b>2.-Propuestas de variables a estudiar</b>  <b>Variables de Médula ósea</b>          -Número de células mononucleares totales por micro litro          -Número de células viables con azul Tripán por ml          -Gramos de hueso desmineralizado en pasta (peso/ml) Un mililitro de médula ósea por gramo de hueso          -Número de células totales          -Número de células madre</p> <p><b>Variables de la formación de hueso</b>          -Determinación de RNA y expresión de los genes          -Planear animales control para el tamaño de las espículas  <b>CONSEGUIR CRANEOS PARA ESTANDARIZAR</b>          -Histoquímica          -Cultivo          -Extracción de RNA          -Tamaño de las espículas</p> <p><b>3.-Valorar fundamentar como estudio piloto</b> (mencionando que el estudio va a ser soportado por la UNAM y Dra. Sesman)</p> <p><b>4.-Planear un manual de procedimientos</b>  <b>ACUERDOS FINALES DEL PROTOCOLO PARA INICIAR EL 26 DE NOVIEMBRE 2009</b>  <b>1-COMPRAR A LA DRA SALMERON 6 RATONES DE INMEDIATO</b>  <b>2-SACRIFICAR UN CONEJO Y TOMAR LA MEDULA OSEA PARA HACER CIROMETRIA DE FLUJO</b>  <b>3.SACRIFICAR A LOS RATONES EXTRAER LA CALOTA Y COLOCARLOS EN PFA +EDTA PARA CONSERVARLOS Y SOMETERLOS A</b>          -Histología          -Inmunohistoquímica          -Extracción de RNA          -Microscopía de barrido</p> <p><b>4. Contactar al Dr. Luis Núñez Ochoa de la Facultad de veterinaria en el servicio de patología y solicitar:</b>          -Diferencial de médula ósea y cuantificación por micro litro de células de médula ósea</p> <p><b>5.Planeación de reunión de expertos para 09 de diciembre 2009</b></p>
05Noviem09	Revisión de Artículo de Inmunohistoquímica con MC Erika Rubalcaba
11Noviem0	Adiestramiento en cultivo celular con el Biol. Valentín Martínez

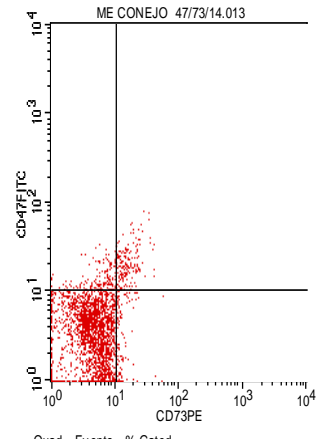
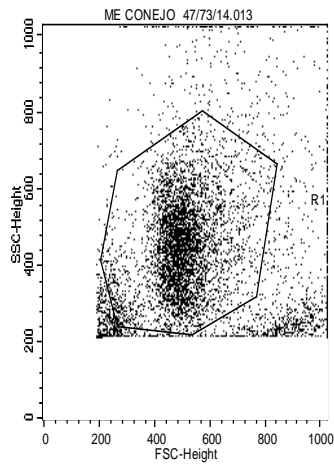
9	
12Noviem09	<p><b>Presentación del protocolo “Unidad Osteogénica en Ratones atómicos” en INR en la unidad de Ingeniería de Tejidos</b>  <b>MODIFICACIONES A LA PRESENTACIÓN</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Agregar grupo control</li> <li>-Ajustar el seguimiento al tiempo de vida de ratones (</li> <li>-Buscar más información sobre la células de médula ósea</li> <li>-Cuando se forme hueso nuevo valorar si se integrará</li> <li>-Quitar letras a las diapositivas</li> <li>-Agregar bibliografía a las diapositivas</li> <li>-Modificar la pregunta de investigación</li> <li>-Agregar en las diapositivas que es la craneosinostosis</li> <li>-Numerar las diapositivas</li> <li>-Agregar título a las diapositivas</li> <li>-Agregar pie de figura</li> <li>-Cambiar imagen de Von Kossa</li> <li>-Agregar que en la búsqueda de formación de hueso valorar si es normal y las características de su arquitectura y la conformación de que tomará en cuanto al hueso y tejidos adyacentes</li> <li>-En Metodología hacer hincapié en que será en defectos de tamaño crítico</li> <li>-Reescribir la justificación y agregar: <ul style="list-style-type: none"> <li>El estudio de la arquitectura del hueso con el objetivo de valorar sus características</li> <li>Enfatizarla en relación a los antecedentes con los que contamos</li> </ul> </li> <li>-Agregar dos diapositivas sobre el trabajo anterior(sólo para presentación en INR)</li> <li>-En los objetivos específicos agregar que obtendremos médula ósea de conejo como proveedor para la diferenciación</li> <li>-Estudiar por citometría de flujo y estandarizar de acuerdo a la edad de los conejos</li> </ul>
18-20 Nov. 09	<p>“IX REUNIÓN ANUAL DE INVESTIGACION” INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Asistencia a las pláticas de la reunión anual de investigación</li> </ul>
18Noviem09	<p><b>ENTREGA DE PROPUESTA DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN A LA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN</b></p>
25Noviem09	<p><b>PRESENTACION DE PROTOCOLO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Se hicieron las siguientes observaciones:</li> </ul> <p><b>RELATORIA ANA SESMAN</b>  <b>25 NOVIEMBRE 2009</b></p> <p><b>1.- Título.</b>  OK</p> <p><b>2.- Pregunta de investigación.</b>  No deja todavía claro, que es lo que se está evaluando, no incluye la unidad de ontogénesis. La pregunta no refleja la investigación que se está planteando, no el sustento teórico de la formación de hueso de novo.  Cambiar la redacción de la pregunta en base a una unidad osteogénica para</p>

	<p>reparar lesiones de tamaño crítico.</p> <p><b>3.-Antecedentes</b> Están claros, son suficientes y puntuales. Revisión más cuidadosa de los antecedentes epidemiológicos, ver las referencias no concuerdan. Es mejor dar información que calificativos, dejar que el lector juzgue la información. Checar la información para hacerlo más claro y relevante.</p> <p><b>4.-Planteamiento del problema.</b> Está claro.</p> <p><b>5.- Justificación</b> Está claro, pero tiene algo de redundancia. Tal vez debería de meter otro tipo de elementos que hagan que la justificación tenga más fuerza y sea, más precisa.</p> <p><b>6.- Objetivo general.</b> Está muy claro y puntual.</p> <p><b>7.-Objetivos específicos.</b> El primero y segundo objetivo no están bien planteados, no deberían de estar, porque no están dentro de la pregunta de investigación, finalmente es parte del procedimiento. Quitarlos!!! Es posible hipotetizar sobre el logro de montar un procedimiento. Un objetivo secundario podría ser que es desarrollar una nueva técnica quirúrgica, pero como ya se justifico la capacidad de desarrollar la técnica, la suficiencia de materiales (precondición) por lo cual no puede ir en objetivos. ¿A que le vas a llamar logro de implantación? ¿Qué se puede incluir para lograr tu planteamiento del problema? Voy a evaluar por inmunohistoquímica, por microscopía, etc. Si el hueso que se forma es normal, describir la expresión de los genes. Describir la unión con el tejido vecinal. En las hipótesis hay que quitar lo de “si podemos”. Describir la expresión del gen y de la proteína (el gen de la proteína de colágena 1), Runx factor de transcripción. Las hipótesis deberían de ser aseverando o expresando lo que se pretende encontrar. Quitar el objetivo 6. Determinar el fenotipo celular y el número de células de la médula de los conejos que se va a ocupar. Ponerlo en la técnica, no en objetivos.</p> <p><b>8.-Diseño del estudio</b> No es descriptivo es analítico. Experimental, descriptivo vs analítico (no se pueden ser los dos), transversal, prospectivo, quitar comparativo. Ver cuáles son mis variables de resultado, para saber qué tipo de estudio será. Después de todo solo dejar experimental</p> <p><b>9.-Tamaño de la muestra</b> OK</p> <p><b>10.- Ver lo de analizar a todos los ratones para que les hagan todos los procedimientos, o bien aumentar la muestra.</b></p> <p><b>11.-Variables.</b> Aclarar bien los procedimientos, que correspondan a cada caso, hay algunos</p>
--	---

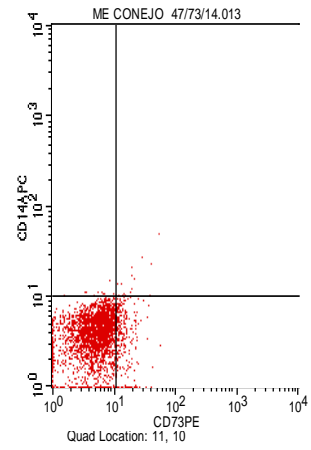
	que están al revés. Mencionar en los objetivos lo de la difracción de rayos X.
26Noviem09	<p>Reunión donde especificamos los detalles para conservar las muestras de los cráneos de ratones que sacrificaremos el 27 de noviembre 2009</p> <p>Para: Inmunohistoquímica, Microscopia de Barrido, Histología y Runx 2</p> <p>conservarlas en Para formaldehído al 4%</p> <p>-Dejar todas las muestras del mismo tamaño hasta determinar si haremos DNA o RNA y valoraremos si se hará búsqueda de expresión de RNA mensajeros o haremos hibridación in situ</p> <p>-Planear hacer modificaciones al protocolo y solicitar nueva valoración del mismo a la dirección de investigación</p>
27Noviem09	<p><b>Minuta de Reunión con Dra. Velasquillo</b></p> <p>-Presentar al 30 de Noviembre la relatoría ya contestada para nueva revisión en la reunión de expertos</p> <p>-Agregar a 8 ratones por grupo como tamaño de la muestra</p> <p>-Hacemos la carta invitación para la reunión de expertos proyectada para el 09 de diciembre del 2009 a las 10 am dirigida a:</p> <p>Dr. José Luis Pérez Gómez Neurocirujano del INP</p> <p>Dr. Hugo Lecona Jefe Bioterio INR</p> <p>MC Erika Rubalcaba Investigadora de Ingeniería de Tejidos INR</p> <p>Biólogo Valentín Martínez Investigador de Ingeniería de Tejidos INR</p> <p>MC Lilia Solís Investigadora de Microscopia de Barrido</p> <p>Dra. Leticia Baena Investigadora de Inmunohistoquímica</p>
27Noviem09	<p><b>Fueron sacrificados 5 ratones atómicos el 27 de noviembre 2009</b></p> <p><b>Para estandarizar en hueso de cráneo de ratón</b></p> <p><b>Hibridación in situ: Determinación del factor de transcripción Run X2</b></p> <p><b>Análisis histológico de tejido neoformado:</b></p> <p><b>-Hematoxilina- eosina</b></p> <p><b>-Masson</b></p> <p><b>-Von Kossa</b></p> <p><b>Análisis mediante inmuno histoquímica: La presencia de fosfatasa alcalina ósea, colágena tipo I</b></p> <p>Las calotas de conejo se conservan en PFA al 4% a una temperatura de 4 grados</p>
02Diciem09	Sacrificamos un conejo para toma de médula ósea para someter a citometría de flujo
03Diciem09	Ponemos las muestras de calota de ratón atómico a descalcificar en una solución de PFA + EDTA por 7 días



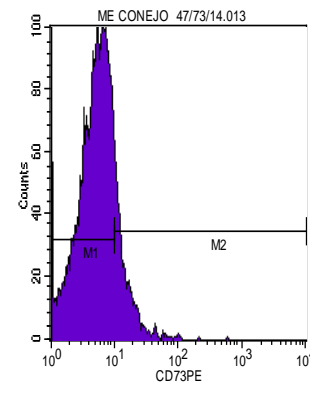
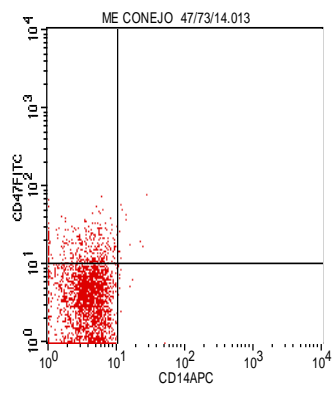
03Diciem09	Realizamos citometría de Flujo de las células de médula ósea con los siguientes resultados:



Quad	Events	% Gated
UL	955	6.64
UR	931	6.48
LL	11821	82.24
LR	666	4.63

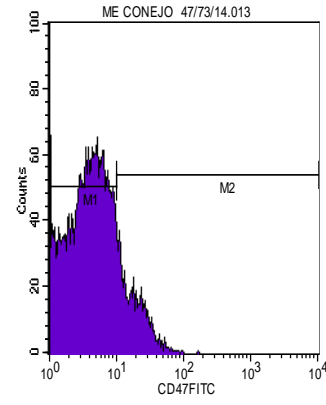
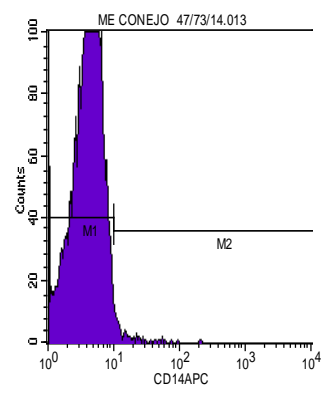


Quad	Events	% Gated
UL	61	0.42
UR	116	0.81
LL	12883	89.63
LR	1313	9.14



File: ME CONEJO 47/73/14.013  
 Sample ID: ME CONEJO 47/73/14  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 02-Dec-09  
 Gated Events: 14373  
 X Parameter: CD73PE (Log)

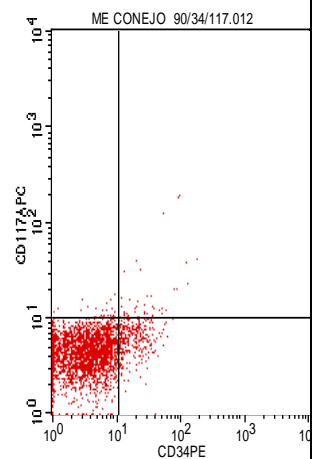
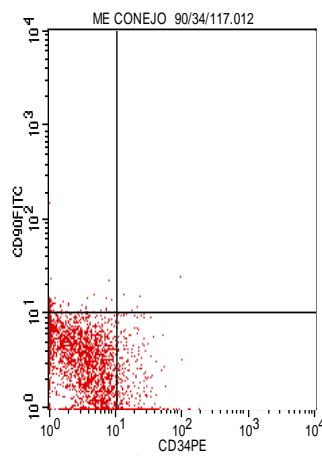
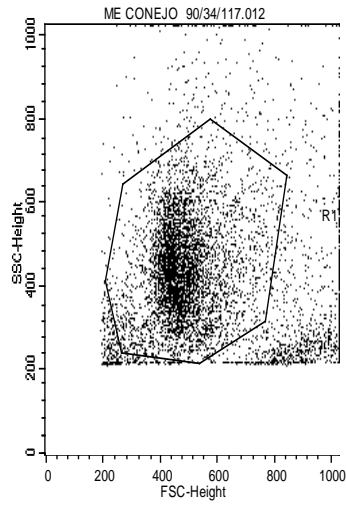
Marker	Left, Right	Events	% Gated
All	1, 991	14373	100.00
M1	1, 1	12495	86.93
M2	10, 991	1930	13.43



File: ME CONEJO 47/73/14.013  
 Sample ID: ME CONEJO 47/73/14  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 02-Dec-09  
 Gated Events: 14373  
 X Parameter: CD47FITC (Log)

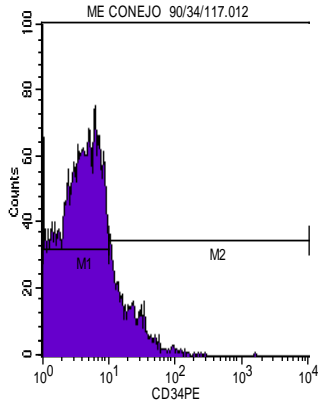
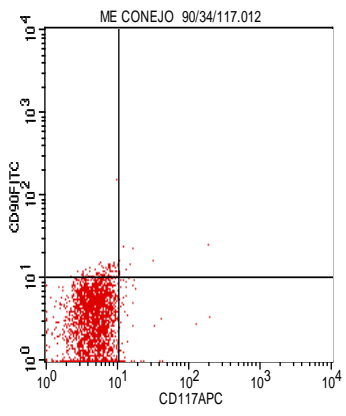
Marker	Left, Right	Events	% Gated
All	1, 991	14373	100.00
M1	1, 1	12438	86.54
M2	10, 991	1935	13.46

Marker	% Gated
All	100.00
M1	98.30
M2	1.70



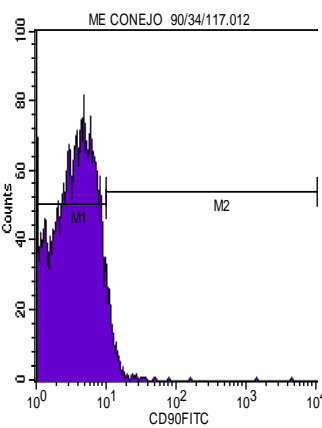
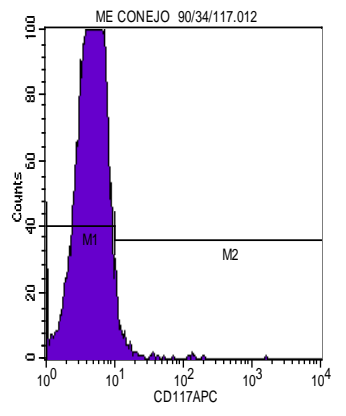
Quad	Events	% Gated
UL	410	2.83
UR	42	0.29
LL	12330	85.20
LR	1690	11.68

Quad	Events	% Gated %
UL	151	1.04
UR	244	1.69
LL	12684	87.65
LR	1393	9.63



File: ME CONEJO 90/34/117.012  
 Sample ID: ME CONEJO 90/34/117  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 02-Dec-09  
 Gated Events: 14472  
 X Parameter: CD34PE (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated
All	1	991	14472	100.00
M1	1	1	12573	86.88
M2	10	991	1923	13.29



File: ME CONEJO 90/34/117.012  
 Sample ID: ME CONEJO 90/34/117  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 02-Dec-09  
 Gated Events: 14472  
 X Parameter: CD90FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated %
All	1	991	14472	100.00
M1	1	1	13981	96.61
M2	10	991	491	3.39

Marker	% Gated
All	100.00
M1	97.23
M2	2.73

Las células e marcaron con CD90, CD34, CD 117, CD47, CD73 y CD14 todos

	<p>son monoclonales específicos para humano</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Se aisló una población compacta y bien definida</li> <li>-Encontramos la presencia de CD34 en nuestra muestra de médula ósea de conejo un 13.29%</li> <li>-El CD90 fue negativo está relacionado con progenitores endoteliales</li> <li>-El CD 117 está relacionado con precursores hematopoyéticos</li> <li>-El CD 14 salió también negativo</li> <li>-Obtuvimos una población doble positiva para células progenitoras endoteliales que son CD73 y CD47 con 13.43% y 13.46% respectivamente ambas marcado para la población celular de conejo</li> <li>-Habrá que considerar la posibilidad de cultivar esas células para ver qué línea celular crece y hacer nuevamente citometría de flujo</li> </ul>
09Diciem09	<p><b>LLEVAMOS A CABO LA REUNION DE EXPERTOS DE ACUERDO A LO PLANEADO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION. UNIDAD DE INGENIERIA DE TEJIDOS Y SE HICIERON LAS SIGUIENTES OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Revisar información sobre líneas celulares de la médula ósea</li> <li>-Cambiar la <b>justificación</b> con la siguiente sugerencia: Debido a que el mecanismo de generación de hueso requiere las 3 características principales de un hueso que son osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción y no existe hasta este momento en el mercado algún material que pueda generar hueso en los defectos de cráneo de tamaño crítico que se define como aquel que es de más de un 10% del tamaño del hueso independientemente del tipo de éste nosotros pretendemos formar hueso de novo con una unidad osteogénica propuesta formada por hueso desmineralizado que cumple con la osteoinducción, dermis humana acelular para favorecer la osteoconducción y células de médula ósea para permitir la osteogénesis. Pretendemos conocer las características histomorfométricas, del hueso y macroscópicamente estudiaremos si tiene el mismo grosor, si rebasa o no más allá del defecto de tamaño crítico que pretendemos rellenar y si infiltra o no otras estructuras como duramadre o encéfalo</li> <li>-Modificar el <b>planteamiento del problema</b> con la siguiente sugerencia: Creemos que existe la posibilidad de formar hueso en defectos craneales y proporcionar regeneración ósea con las 3 características del hueso. Osteoinducción Osteoconducción Osteogénesis Tenemos grandes posibilidades de formar hueso con la unidad osteogénica propuesta. Actualmente todos los materiales utilizados para la regeneración ósea poseen al menos uno de estos tres mecanismos de acción y sólo el hueso autólogo posee los 3. De ahí que sea indispensable buscar un sustituto de hueso que tenga los 3 factores: osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis</li> <li>-En los 3 primeros objetivos especificar que es en hueso de novo</li> <li>-Evaluar por inmunohistoquímica</li> <li>-Agregar en los antecedentes que hay un modelo previo ya hecho sin embargo no se realizó un análisis específicos de los datos propuestos en este proyecto</li> <li>-En hipótesis si se observa la expresión del gen Runx2 se puede demostrar la</li> </ul>



	<p>generación de tejido óseo de novo, especificar con los 3 mecanismos de osteoinducción osteoconducción y osteogénesis como demostramos que se presentan a través de las diferentes proteínas y factores</p> <p>-En población objetivo especificar que son ratones atímicos machos (y hacer la Referente de normalidad del modelo con ratones machos)</p> <p>-El tamaño de la muestra deben ser 3 ratones por cada uno de las pruebas a las que se van a someter (inmunohistoquímica, hibridación in situ, histología y microscopia de barrido) en total 12 ratones por grupo x 6 grupos = 72 ratones</p> <p>-Grupo Shamm no es necesario.</p>
10Diciem09	Cambio a las muestras de calota de ratón nuevamente a PFA al 4%
18Diciem09	<p><b>SACRIFICAMOS A 2 RATONES ATIMICOS Y RESECAMOS LA CALOTA PARA PODER SOMETERLOS A MICROSCOPIA DE BARRIDO Y ESTANDARIZAR:</b></p> <p>-El tamaño de las espículas óseas</p> <p>-Determinar la presencia de grupos fosfato y calcio</p> <p>Se prepararon en glutaraldehído por 1 hr y media y luego sometido a 5 lavados de 5 minutos con PBS y finalmente conservar en PBS a 4 grados hasta la preparación para los cortes histológicos</p>
18Diciem09	Cambio de PFA al 4% a las muestras de calota de ratón atímico
23Diciemb09	Cambio de PFA al 4% a las muestras de calota de ratón atímico
28Diciem09	Cambio de PFA al 4% a las muestras de calota de ratón atímico
04Enero10	Cambio de PFA al 4% a las muestras de calota de ratón atímico
08Enero10	Cambio de PFA al 4% a las muestras de calota de ratón atímico
13Enero10	<p>Minuta de Reunión con Dra. Velasquillo</p> <p>-Iniciar preparación del artículo de antecedentes en conejos previ al protocolo actual</p> <p>-Hacer cita con Dra. Villegas para Iniciar a trabajar en el laboratorio de Patología y Microscopía de Barrido</p> <p>-Iniciamos preparación de rehidratación de muestras para inclusión en parafina</p> <p>-Nuevo cambio de PFA a las muestras al 4%</p>
14Enero10	<p>-Planeamos el diferencial de las muestras de células de medula ósea</p> <p>-Cuantificación de las mismas</p> <p>-Solicitamos realización de Frotis en Medicina veterinaria UNAM</p> <p>-La cuantificación es el número de células madre en la muestra de medula ósea de conejo</p> <p>-Solicitaremos frotis o Citometría de Flujo</p> <p><b>PLAN PARA INICIO DE REFERENTE DE NORMALIDAD DE LAS MUESTRAS</b></p> <p>-Las muestras para microscopía de Barrido deben estar en PBS y nuestras muestras están en PFA por lo que va a ser necesario sacrificar otros ratones para estandarizar la microscopia electrónica.</p> <p>Se decide realizar Inmunohistoquímica para todas las variables que vamos a medir aunque vamos a encontrar dificultades porque el anticuerpo es habitualmente monoclonal antihumano y vamos a usar raton aunque atimico y células e medula osea de conejo, por lo que va a ser difícil encontrar reactivos policlonales que crucen la información</p> <p>Decidimos hacer</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Osteocalcina por Inmunohistoquímica</li> <li>-Osteopontina por Inmunohistoquímica</li> <li>-Runx2 por inmunohistoquímica</li> <li>-Fosfatasa alcalina por Inmunohistoquímica</li> <li>-Colagena I por Inmunohistoquímica</li> </ul>								
20Enero10	<p>Reunion con Dra Velasquillo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Planeamos contactar al Dr Luis Nuñez Ochoa de la Facultad de Veterinaria para tratar de determinar la cantidad de células en medula ósea, el tipo de las mismas,</li> <li>Y verificar la viabilidad de las células madre</li> <li>-Se determina finalmente el tamaño de la muestra:</li> </ul> <p>Decidimos hacer 3 grupos control y 3 grupos experimental</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-En el grupo control solo haremos e defecto de tamaño critico sin apliar la unidad osteogenica</li> <li>En el grupo experimental se hara el defecto de tamaño critico y aplicaremos la unidad osteogenica</li> <li>--El primer grupo (problema y experimental) se carificara al mes, el segundo a los 2 meses y el tercero a los 3 meses</li> <li>-Cada grupo tanto control como esperimental contara de 5 ratones para tener un total de 30 ratones</li> <li>-Nos ponemos en contacto con el Bioterio del Instituto Nacional de Nutrición para conseguir los primeros 15 ratones</li> </ul> <p><b>REUNION CON LA DRA BAHENA DE PATOLOGIA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Planeamos la tinción de hematoxilina y eosina</li> <li>-Planeamos la tinción de Masson</li> <li>-Se quedara pendiente la tinción de Von Kossa porque las muestras que tenemos hasta ahora están descalcificadas y para ver depósitos de calcio deben estar sin descalcificar</li> </ul>								
21Enero10	<p>Presentación de un artículo en la sesión Bibliografiaca del Instituto Nacional de Rehabilitación Unidad de Ingeniería de tejidos:</p> <p style="text-align: center;">“Inductores de regeración In vivo: Eficacia de las células óseas mesenquimatosas humanas”</p> <p><b>CONCLUSIONES DEL ESTUDIO PRESENTADO:</b></p> <p>Este estudio mostró por primera vez la eficacia de las células madre para la regeneración ósea in vivo pudiendo inducir la grandemente por una combinación de diferenciación osteogénica de las células madre, previo al trasplante y el uso de un andamio con hidroxiapatita. Este estudio puede crear un impacto para la terapia celular con células madre para la regeneración ósea en especialistas que requieren hueso para algún tipo de reconstrucción, se requieren más estudios para su potencial terapéutico, para determinar la calidad del tejido, la reacción inflamatoria en animales inmno y no inmunocomprometidos, etc.</p>								
21 Enero10	<p>Hacemos la solicitud de los reactivos y el material para iniciar la Referente de normalidad de Las inmunohistoquímicas:</p> <p><b>SOLICITUD DE REACTIVOS PARA REALIZAR INMUNOHISTOQUIMICAS PROTOCOLO ANA SESMAN</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">MATERIAL</th> <th style="width: 20%;">CANTIDAD</th> <th style="width: 30%;">NUMERO DE CATALOGO</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>			MATERIAL	CANTIDAD	NUMERO DE CATALOGO			
MATERIAL	CANTIDAD	NUMERO DE CATALOGO							

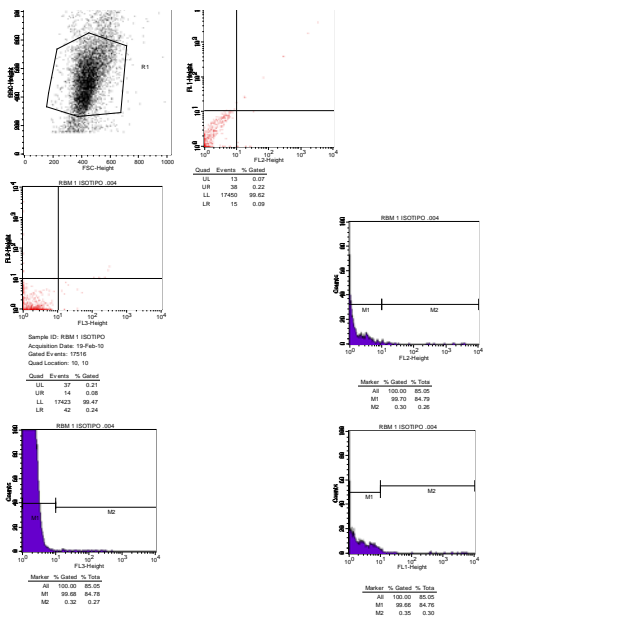
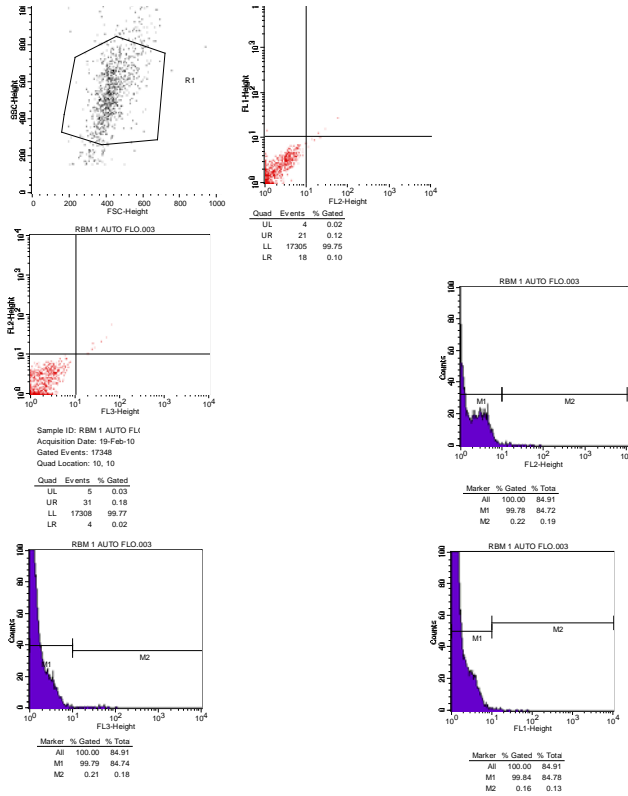
	Palaplast embedding media Palaplast X-Tro	1 kilo	P3808	
	Solución de Papanicolaou Solución hematoxilina de Harris-Merk	1000ml	Art 9253	
	Alcohol Etílico absoluto anhidro J-T aker	1 caja de 4 litros (16 litros)	9000-03	
	Tubos de centrífuga 50 ml Polipropileno libre de RNasas, DNasas, no pirógenos, estéril	25 bolsas	430897	
	Cajas de Petri	1 caja	Bioselect	
	Tubos eppendorf 1.5 ml, 0.5 ml, 0.2 ml	1 caja de cada uno	Biolselect	
	Xilol	2 Fcos de 4 litros	JT Baker 9490-03	
	PBS en tabletas al 1X	10 tabletas	Merck 524650	
	PFA	1 Kg	Bioselect	
	Rx2 c-19 Santa Cruz Biotechnology	1 kit completo	Sc-8566	
	Osteocalcin (V-19)	1 kit completo	Sc-18319	
	Alkaline Phosphatase (L-19)	1 kit completo	Sc-15065	
	Col 1 A2 (M-19)	1 kit completo	Sc-8788	
	OPN (P-18)	1 kit completo	Sc-10593	
28Enero10	<p>Inicio de Inclusion en parafina</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1-Probamos que stan descalcificadas</li> <li>2-Retiramos PFA</li> <li>3-Agregamos PBS</li> <li>4-Se colocan drante 30 minutos en la agitadoraa temperatura ambiente</li> <li>5-Cambiamos a alcohol al 50% se mantienen en agitación a temperatura ambiente por 30 min</li> <li>6- Cambiamos a alcohol al 70% se mantienen en agitación a temperatura ambiente por 30 min</li> <li>7- Cambiamos a alcohol al 96% se mantienen en agitación a temperatura ambiente por 30 min</li> <li>8- Cambiamos a alcohol al absoluto se mantienen en agitación a temperatura ambiente por 30 min</li> <li>9- Cambiamos a alcohol al absoluto se mantienen en agitación a temperatura ambiente por 60 min</li> </ol> <p>Las dejamos aquí para continuar posteriormente la inclusión</p>			
5Febrero10	<p>Tomamos muestra de medula ósea para el Dr Luis Nuñez a un Conejo de 2 kg New Zealand y se la lleva para hacer citología en la fac de Veterinaria de la UNAM</p> <p>-Hacemos 4 improntas.</p> <p>**El resultado deesta toma no es satisfactorio por lo que planeamos hacer la toma de muestras el 19 de Febrero personalmente por el Dr. Nuñez</p>			
8Febrero10	<p>Reunión con la Dra. Hilda Villegas</p> <p>Puntos tratados:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-La preparación de las muestras se hara a través del departamento de patología por la Citotecnologa Bertha Vargas</li> <li>-Las tinciones a través de la Dra Bahena</li> </ul>			

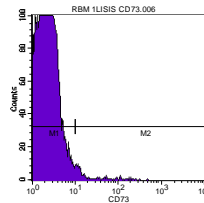
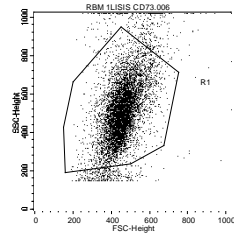
-La microscopía se hace a través de la Dra Liliana Solis

19Feb10

Toma de muestra al mismo conejo New Zealand de 2 Kg por el Dr Luis Nuñez y se la lleva a su laboratorio en la facultad de Veterinaria de la UNAM para hacer el frotis correspondiente.

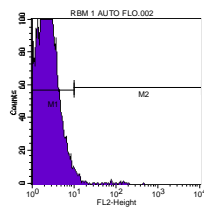
En la Unidad de Tejidos Hacemos Citometría de Flujo para hacer cuantificación de células y tipo de las mismas:



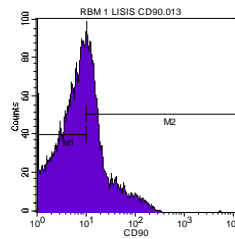
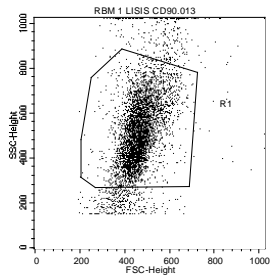


File: RBM 1 LISIS CD73.006 Log Data Units: Linear Value  
 Sample ID: RBM 1 LISIS CD73 Patient ID:  
 Case Number: Tube: Untitled  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List Acquisition Date: 19-Feb-10  
 Gate: G1 Total Events: 21660

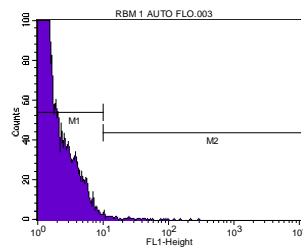
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	991	19541	100.00	90.22
M1	1	1	19244	98.49	88.85
M2	10	991	306	1.57	1.41



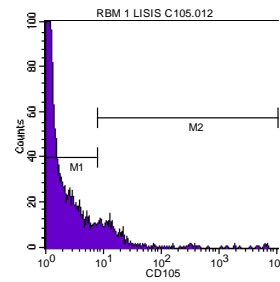
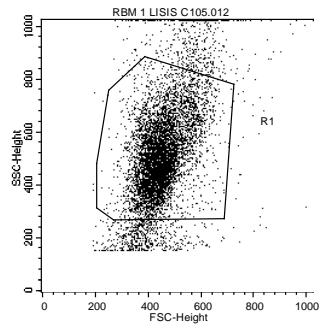
Marker	% Gated	% Total
All	100.00	90.25
M1	98.96	89.31
M2	1.09	0.98



File: RBM 1 LISIS CD90.013  
 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID: RBM 1 LISIS CD9  
 Patient ID:  
 Marker Events % Gated % Total SD CV  
 All 17729 100.00 87.03 41.91 324.62  
 M1 11523 65.00 56.57 2.79 58.90  
 M2 6296 35.51 30.91 67.73 243.29



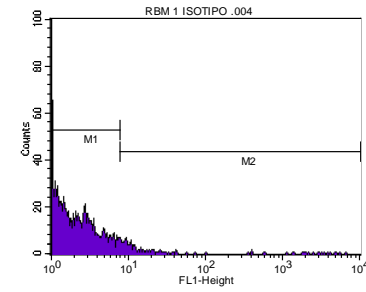
File: RBM 1 AUTO FLO.003 Log Data Units: Linear Value  
 Sample ID: RBM 1 AUTO FLO Patient ID:  
 Tube: Untitled Panel: Unt  
 Acquisition Date: 19-Feb-10 Gate: No C  
 Gated Events: 20430 Total Even  
 X Parameter: FL1-Height (Log)  
 Marker Left, Right, Events, % Gated, % Total  
 All 1, 991 20430 100.00 100.00  
 M1 1, 1 20339 99.55 99.55  
 M2 10, 991 92 0.45 0.45



Histogram Statistics

File: RBM 1 LISIS C105.012  
 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID: RBM 1 LISIS C10  
 Patient ID:

Marker	Events	% Gated	% Total	SD	CV
All	26193	100.00	85.89	125.12	2384.24
M1	25372	96.87	83.20	0.84	66.16
M2	828	3.16	2.72	693.09	544.14

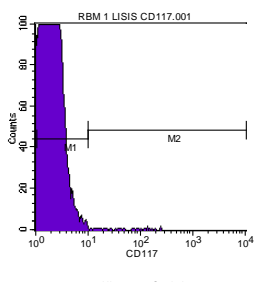
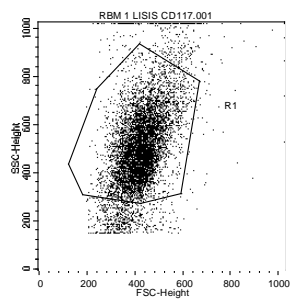


Histogram

File: RBM 1 ISOTIPO .004  
 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID: RBM 1 ISOTIPO  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 19-Feb-10  
 Gated Events: 20595  
 X Parameter: FL1-Height (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Unt  
 Gate: No C  
 Total Even

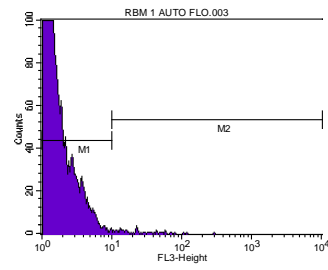
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 991	20595	100.00	100.00
M1	1, 20361	98.86	98.86	98.86
M2	8, 991	237	1.15	1.15



Histogram Statistics

File: RBM 1 LISIS CD117.001  
 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID: RBM 1 LISIS CD11  
 Patient ID:

Marker	Events	% Gated	% Total	SD	CV
All	19500	100.00	87.19	4.56	207.00
M1	16844	86.38	75.31	0.98	44.71
M2	56	0.29	0.25	57.50	91.86

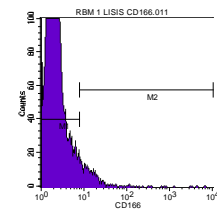
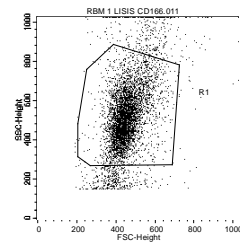


Histogram

File: RBM 1 AUTO FLO.003  
 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID: RBM 1 AUTO FLO  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 19-Feb-10  
 Gated Events: 20430  
 X Parameter: FL3-Height (Log)

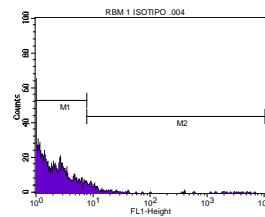
Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Unt  
 Gate: No C  
 Total Even

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 991	20430	100.00	100.00
M1	1, 20336	99.54	99.54	99.54
M2	10, 991	95	0.47	0.47



File: RBM 1 LISIS CD166.011  
Log Data Units: Linear Values  
Sample ID: RBM 1 LISIS CD166  
Patient ID:

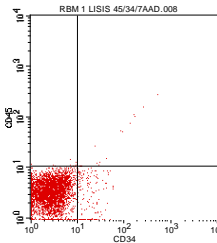
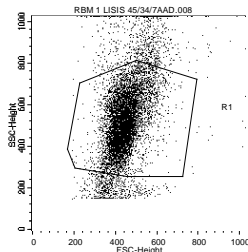
Marker	Events	% Gated	% Total	SD	CV
All	17879	100.00	85.32	93.56	1876.87
M1	17028	95.24	81.26	1.17	53.02
M2	859	4.80	4.10	423.32	705.23



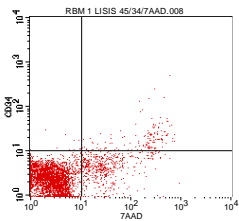
File: RBM 1 ISOTIPO .004  
Sample ID: RBM 1 ISOTIPO  
Tube: Untitled  
Acquisition Date: 19-Feb-10  
Gated Events: 20595  
X Parameter: FL1-Height (Log)

Log Data L  
Patient ID:  
Panel: Unt  
Gate: No C  
Total Even

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	991	20595	100.00	100.00
M1	1	20361	98.86	98.86	98.86
M2	8	991	237	1.15	1.15

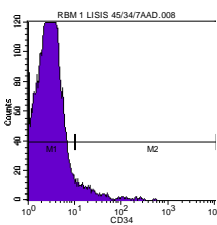


Quad	Events	% Gated
UL	53	0.25
UR	91	0.43
LL	20065	95.66
LR	766	3.65

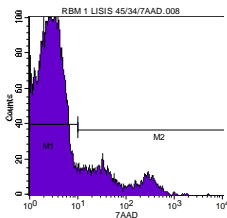


Sample ID: RBM 1 LISIS 45/34/7AAI  
Acquisition Date: 19-Feb-10  
Gated Events: 20975  
Quad Location: 10, 10

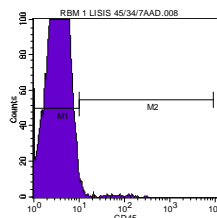
Quad	Events	% Gated
UL	47	0.22
UR	795	3.79
LL	17968	85.86
LR	2165	10.32



Marker	% Gated	% Total
All	100.00	83.88
M1	95.91	80.46
M2	3.89	3.26



Marker	% Gated	% Total
All	100.00	83.88
M1	85.66	71.85



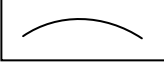
Marker	% Gated	% Total
All	100.00	83.88

25febrero10

MINUTA DE REUNION CON EL DR SERGIO SANCHEZ (JEFE DE BANCO DE SANGRE DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA)  
-De los donantes alogénico se tomara una muestra de la sangre periférica cosechada para donación de medula ósea, esa muestra de rutina se procesa

	<p>para realizar nuevamente HLA, y citometría de flujo, para determinar tipo de células viabilidad y cuantificación de las mismas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Posteriormente el sobrante se desecha de acuerdo al manejo de tejidos Biológico Infecciosos</li> <li>-De ese sobrante se solicitara con consentimiento informado el uso de esas células madre para el protocolo</li> <li>-Planeamos el consentimiento informado</li> <li>-Se hace una cita para la firma del consentimiento informado con el primer donador alogénico que ingresara en el protocolo el día 04 de marzo 2010 y recogeremos las muestras el día 05 de marzo 2010</li> </ul>
03Marzo10	<p>Las muestras habían quedado en alcohol absoluto y se deshidrataron por lo que fue necesario rehidratarlas y se reinicia el proceso de deshidratación para las muestras que van a Estandarizarse:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.-Las muestras se encuentran en PFA al 4% o PFA con EDTA</li> <li>2.-Se cambian las muestras a pBS 1x se mantienen en agitación a temperatura ambiente por 30 min</li> <li>4.-REINICIAMOS LA DESHIDATACION</li> <li>5.-Se cambian las muestras a etanol al 50% se mantienen en agitación por 30 min</li> <li>6.- Se cambian las muestras a etanol al 70% se mantienen en agitación por 30 min</li> <li>7.- Se cambian las muestras a etanol al 96% se mantienen en agitación por 30 min</li> <li>8.- Se cambian las muestras a etanol absoluto se mantienen en agitación por 30 min</li> <li>9.- Se cambian las muestras a etanol absoluto se mantienen en agitación por 60 min</li> <li>10.-Se cambian a xilol y se colocan en agitación por 30 min</li> <li>11.- Se cambian a xilol y se colocan en agitación por 30 min</li> <li>12.-Se saca de la agitación y se retira el xilol (El agitador es un MaxQ mini 4450 se colocan a 26.5 gr y a 200rpm)</li> <li>13.-Se ponen en parafina de 52 a 55 grados se quedan toda la noche en la estufa</li> </ol>
03Marzo10	<p>EN EL BIOTERIO DEL INSTITUTO DE REHABILITACION.</p> <p>Se prepara todo para la cirugía del primer grupo experimental de ratones una vez que contemos con las células de medula ósea:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Se esteriliza el cuarto de inmunocomprometidos</li> <li>-Recogemos los ratones del Instituto Nacional de Nutrición</li> <li>-Se esteriliza el material para la cirugía</li> <li>-Esterilizamos agua y comida</li> <li>-Dejamos la lámpara de rayos UV</li> <li>-Verificamos que todo funciona adecuadamente</li> </ul>



04Marzo10	<p>Continuamos con la inclusión de las muestras en parafina</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Se sacan de la estufa</li> <li>-Las colocamos la muestra en los bloques de la siguiente forma:</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>-Se incluyen todas las muestras usando un aparato LEICA EG 1160</li> <li>-Se quedan pendiente para hacer los cortes con el micrótomo</li> </ul>
05Marzo10	<p>Se hace la cirugía de los ratones (15) primer grupo experimental y se coloca la unidad osteogenica:</p> <p>Se realizó una incisión medio sagital a lo largo de la superficie antero superior del cráneo, incidiendo el pericráneo en la línea media, formándose dos colgajos de piel y pericráneo que fueron disecados y elevados bilateralmente. Posteriormente se realizó una craneotomía de 4 x 4 mm que corresponderá aproximadamente al 20% de la superficie de la calota del ratón efectuada con bisturí, teniendo precaución de no lesionar la duramadre ni el cerebro e implantamos la unidad osteogénica: Dermis humana acelular como andamio y una pasta formada por células de médula ósea y hueso desmineralizado</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Los ratones se quedan en el cuarto de inmunocomprometidos en el Bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación</li> <li>-Hubo un deceso durante la aplicación de anestesia</li> </ul>
24Marzo10	<p>Hacemos la cirugía del grupo Control (15 ratones)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-A estos ratones se realizó únicamente el defecto de tamaño crítico</li> </ul> <p>Se realizó una incisión medio sagital a lo largo de la superficie antero superior del cráneo, incidiendo el pericráneo en la línea media, formándose dos colgajos de piel y pericráneo que fueron disecados y elevados bilateralmente. Posteriormente se realizó una craneotomía de 4 x 4 mm que corresponderá aproximadamente al 20% de la superficie de la calota del ratón efectuada con bisturí, teniendo precaución de no lesionar la duramadre ni el cerebro.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Los ratones se quedan en el cuarto de inmunocomprometidos en el Bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación</li> <li>-Hubo un deceso durante la aplicación de anestesia</li> </ul>
31Marzo10	<p>Se continúa con los cortes de los cráneos para Referente de normalidad</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Se hace un corte en el micrótomo</li> </ul> <p><b>**LOS CORTES E HACEN A 3 MICRAS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Hacemos inicialmente un corte de prueba y se aplica alcohol al 20%</li> <li>-Lo colocamos en una laminilla</li> <li>-Lo ponemos en un baño de flotación a 46-47 grados</li> <li>-Marcamos las laminillas</li> </ul> <p><b>EN LAMINILLAS TRATADAS CON TESPAS SE COLOCAN LAS MUESTRAS PARA:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Osteocalcina</li> <li>-Osteopontina</li> <li>-Runx2</li> <li>-Fosfatasa Alcalina</li> <li>-Colagena I</li> </ul> <p><b>EN LAMINILLAS NO TRATADAS SE COLOCAN LAS MUESTRAS</b></p>

	<p>PARA:          -Ticones de Hemeyoxilina y Eosina          -Tinciones de Masson          Se cortan completas las laminillas de las muestras: E(Referente de normalidad)          E1, E2, E3, E4 y E5</p> <p>PREPARAMOS LAMINILLAS CON TESPA:          Preparamos 300 ml de Tespa          -288 ml de acetona          12 ml de Tespa          Colocamos 50 laminillas y las sumergimos:          HCL 105/ETOH 70% 1 min          Agua 1min          ETOH96% (acetona) 1min          Se deja secar en el horno 5 min 150gradosC          Se deja enfriar          Tespa 4% acetona 1 min          Acetona 1min x 3 Baños          Agua 5min x 2 baños          Se dejan secar a 42 grados</p> <p>EN PATOLOGIA SE PERPARAN LAS MUESTRAS Y S HACEN TINCION DE HEMATOXILINA EOSINA          Xilol 5 minutos x2 baños          Alcohol absoluto 1min x2 baños          Alcohol al 96% 1min x2 baños          Hasta agua corriente          Hematoxilina 5min          Carbonato de Litio 1min          Eosina 1min          Baños de alcohol absoluto y xilol          Cubrimos con resina y están listas para la lectura al microscopio          PENDIENTE REVISAR DRA BAHENA EL DIA 13 DE ABRIL 2010</p>																		
31Marzo10	<p>Minuta de Reunión Dra. Velasquillo:          -Poner en resultados la dificultad para la toma de la muestra          -Hablar de las ventajas y cualidades de un donador humano          -Pendiente la Referente de normalidad de la tinción de Von Kossa</p>																		
06y 07 Abril2010	<p>Iniciamos las inmunohistoquimicas para Colagena I  <b>Inmunoreacción y Tinción:</b></p> <table border="1" data-bbox="375 1697 1353 1995"> <thead> <tr> <th>Soluciones</th> <th>Tiempo (min)</th> <th>No. de Veces</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PBS</td> <td></td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Anticuerpo 1° (Solución de Bloqueo; Anticuerpo primario, 1:50)</td> <td>Durante toda la noche</td> <td>4°C en Cámara Húmeda</td> </tr> <tr> <td>PBS (PBS; Triton al 0.1%)</td> <td>3</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Anticuerpo 2° (Solución de Bloqueo; Anticuerpo primario, 1:50)</td> <td>2 h</td> <td>37°C en Cámara Húmeda</td> </tr> <tr> <td>PBS (PBS; Triton al 0.1%)</td> <td>3</td> <td>A Temp Ambiente</td> </tr> </tbody> </table>	Soluciones	Tiempo (min)	No. de Veces	PBS		3	Anticuerpo 1° (Solución de Bloqueo; Anticuerpo primario, 1:50)	Durante toda la noche	4°C en Cámara Húmeda	PBS (PBS; Triton al 0.1%)	3	4	Anticuerpo 2° (Solución de Bloqueo; Anticuerpo primario, 1:50)	2 h	37°C en Cámara Húmeda	PBS (PBS; Triton al 0.1%)	3	A Temp Ambiente
Soluciones	Tiempo (min)	No. de Veces																	
PBS		3																	
Anticuerpo 1° (Solución de Bloqueo; Anticuerpo primario, 1:50)	Durante toda la noche	4°C en Cámara Húmeda																	
PBS (PBS; Triton al 0.1%)	3	4																	
Anticuerpo 2° (Solución de Bloqueo; Anticuerpo primario, 1:50)	2 h	37°C en Cámara Húmeda																	
PBS (PBS; Triton al 0.1%)	3	A Temp Ambiente																	

Reactivo A+B	20	4
PBS (PBS; Triton al 0.1%)	3	4
Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System	5-20	Hasta notar la reacción deseada
PBS	3	2

**Para contrastar:**

Soluciones	Tiempo (min)	No. de Veces
DAPI		1 gota de DAPI y se pone el cubre-objetos y se deja secar durante toda la noche en oscuridad
		Al siguiente día se puede leer la muestra en microscopía de Fluorescencia

- Se elimina el exceso de Xilol de la laminilla y se aplica resina transparente hasta cubrir todos los cortes histológicos que contenga la laminilla.

Cuidadosamente, se coloca un cubreobjetos sobre los tejidos embebidos en la resina y se dejan secar hasta el próximo día.

-Las muestras se procesan:

E3 y E5 Se colocan anticuerpos de colágena

E4 únicamente se coloca el anticuerpo secundario

E1 y E2 servirán de control con Pba

**EN PATOLOGIA HACEMOS LA PREPARACION E INCLUSION DE LAS MUESTRAS DEL PRIMER GRUPO EXPERIMENTAL**

1.-Las muestras se encuentran ahora en Formol Bufferado

2.-Se cambian las muestras a pBS 1x se mantienen en agitación a temperatura ambiente por 30 min

3.-Se cambian las muestras a etanol al 50% se mantienen en agitación por 30 min

4.- Se cambian las muestras a etanol al 70% se mantienen en agitación por 30 min

5.- Se cambian las muestras a etanol al 96% se mantienen en agitación por 30 min

6.- Se cambian las muestras a etanol absoluto se mantienen en agitación por 30 min

7.- Se cambian las muestras a etanol absoluto se mantienen en agitación por 60 min


8.-Se cambian a xilol y se colocan en agitación por 30 min

9.- Se cambian a xilol y se colocan en agitación por 30 min

10.-Se saca de la agitación y se retira el xilol

(El agitador es un MaxQ mini 4450 se colocan a 26.5 gr y a 200rpm)

11.-Se ponen en parafina de 52 a 55 grados se quedan toda la noche en la

	<p>estufa</p> <p>12.- Continuamos con la inclusión de las muestras en parafina</p> <p>13.-Se sacan de la estufa</p> <p>14.-Las colocamos la muestra en los bloques de la siguiente forma:</p>  <p>15.-Se incluyen todas las muestras usando un aparato LEICA EG 1160</p> <p>16.-Se quedan pendiente para hacer los cortes con el micrótopo</p>
12 abril 10	<p>Revisión de laminillas de tinción con Hematoxilina y Eosina del grupo de referencia con la Dra Baena</p> <p>Iniciamos las primeras microscopías y la Lectura de las inmunohistoquímica del grupo de referencia</p> <p>Laminillas E1 a E5</p>
13 abril 10	<p>Reunión con la Dra Velasquillo y se hacen las modificaciones correspondientes al protocolo dándose una estructura nueva corrigiendo, desde la hipótesis los objetivos y la justificación</p> <p>Revisar definiciones</p> <p>Explicar la definición por grupos</p> <p>Darle enfoque a los resultados</p> <p>Esquema de plan de trabajo</p>
15 abril 10	<p>Hacemos nuevos cortes para inmunohistoquímica para el grupo de referencia</p> <p>Pendiente las tinciones de Masson para el grupo de referencia</p>
21 abril 10	<p>Trabajamos la inmunohistoquímica para osteocalcina con anticuerpo de conejo</p> <p>Preparamos el anticuerpo para inmunohistoquímica para Osteocalcina para las laminillas E1, E2, E3, E4, E5</p> <p>Preparamos TESPA para las laminillas de las inmunohistoquímica</p> <p>Para 400ml de tespa:</p> <p>16cc de Tespa</p> <p>384 de acetona y se lleva un proceso de impregnación y secado de la minillas para la inmunohistoquímica</p>
28 abril 10	<p>Sacrificamos los ratones del primer grupo control</p> <p>Iniciamos las inmunohistoquímicas para Runx 2 para el grupo de referencia</p> <p>Hacemos los cortes de los sujetos de el grupo de experimental del primer mes con la Sra Bertha Vargas Sacamos 10 laminillas con el dermatomo para cada uno de los sujetos</p> <p>Hacemos fosfatasa alcalina con anticuerpo de conejo para la inmunohistoquímica con las laminillas E5, E2, E1 y colocamos anticuepo secundario en E4 y E3</p>
11 mayo 10	<p>Se hace la eutanasia de 5 ratones del grupo experimental a los 2 meses de la intervención y se procede a la etiquetación e iniciamos la inclusión de las muestras</p>
12 mayo 10	<p>Continuamos con inmunohistoquímica para fosfatasa alcalina en las laminillas E5,E2, E1 y colocamos ac secundario en E3 y E4</p> <p>Tomamos fotos de las primeras imágenes de el grupo de referencia de las inmunohistoquímicas</p>
17 mayo 10	<p>Tomamos fotos de las inmunohistoquímicas de el grupo de referencia</p>
26-mayo 10	<p>Empezamos los cortes de los bloques de parafina para ponerlos en las laminillas del grupo experimental a los 2 meses hacemos 15 laminillas de cada bloque</p>
2 junio 10	<p>Minuta de Reunión con la Dra Velasquillo</p> <p>Discutimos el promedio de los minerales analizados hasta ahora por microscopía</p> <p>Discutimos las características y el CD 34 positivos de la segunda cocecha tomada del</p>

	paciente donante de médula ósea Hacer modificaciones en el cronograma y en los anexos y se envía a la Dra. velasquillo
4 junio 10	Revisión de las laminillas teñidas con H-E del grupo de referencia y toma de fotos a estas muestras con la Dra Leticia Bahena
8 junio 10	Minuta de Reunión con el Dr. Carlos Jiménez Iniciamos el proyecto de la Formación de base de datos: 1.capturar los datos Casos/Controles/Experimentales *Características morfológicas Vamos a darle un folio a cada sujeto Establecemos modificaciones en la definición de las variables
09 junio 10	Minuta de reunión con la Dra Velasquillo Revisamos la presentación y hacemos modificaciones en la diapositiva 55 fig 1 y 4 Diapo 56 figura 1 Diapo 65 y 78 figuras 2 y 4 respectivamente Hacemos eutanasia del tercer grupo experimental ( a los 3 meses) El caso 3-4 tuvo un absceso pero aparentemente no hay pérdida del constructo Hacemos nuevas modificaciones al protocolo para responder a lo solicitado por el comité científico del INR La propuesta: Mencionar que los gastos corren a cargo de la investigadora responsable Mencionar ya algo de resultados en la fase experimental Mencionar avances en el protocolo para justificar porque estamos usando médula ósea humana
23 junio 10	Hacemos los bloques de los cortes de parafina del grupo control a los 2 meses Preparamos nuevamente laminillas con tepsa
30 junio 10	Sacrificamos el grupo control a los tres meses de haber hecho la intervención
28 julio 10	Hacemos un plan de trabajo con la Bióloga Erica Ruvalcaba y con la Dra Baena El 04 de agosto hacemos con Bertha Vargas las tinciones de H-E y Massón La siguiente semana tinciones de VonKossa y Masson Cita con la Dra Baena el 06 de agosto 10 para leer las tinciones de H-E Cita con la Dra baena para leer las Masson y Von Kossa Iniciamos las inmunohistoquímicas el 18 de agosto Dejar las laminillas listas a Erika para el 10 de agosto (controles) Dejar las laminillas de los experimentales el 25 de agosto
04 de agosto 10	Hacemos las tinciones para hematoxilina y Eosina y Massón
06 de agosto 10	Reunión con la Dra Baena para revisar las laminillas de H-E y Massón Revisamos control 1-1, 1-2 y 1-3, Experimental 1-1, 1-2, 1-3, Control 2-1, Control 2-2, Control 2-3, control 2-4, Control 3-2, 3-2 y 3-4 También revisamos las tinciones de Von Kossa
13 agosto 10	Le dejo a erika unas laminillas para ajustar y prepararlas para el grupo de referencia y el control
18 agosto 10	Hacemos con Ericka la segunda fase de las Inmunos, los controles grupos 1 y 2 Le dejo dos laminillas más para que complete en caso de pérdida de casos
20 agosto	Terminamos la segunda inmunohistoquímica y las laminillas se distribuyen como sigue Osteocalcina                      Runx2 Control                                  Control Control 1-1                              Control 1-1

	Control 1-2 Control 1-3 Control 2-1 Control 2-2 Control 2-3 Control2-4  Colágea 1 Control Control 1-1 Control 1-2 Control 1-3 Control 2-1 Control 2-2 Control 2-3 Control2-4  Osteopontina Control Control 1-1 Control 1-2 Control 1-3 Control 2-1 Control 2-2 Control 2-3 Control2-4	Control 1-2 Control 1-3 Control 2-1 Control 2-2 Control 2-3 Control 2-1  Fosfatasa Alcalina Control Control 1-1 Control 1-2 Control 1-3 Control 2-1 Control 2-2 Control 2-3 Control 2-1  Secundario Control Control 1-1 Control 1-2 Control 1-3 Control 2-1 Control 2-2 Control 2-3 Control 2-1
25 de agosto-10	Hicimos Inmunohistoquímica con el grupo experimental colágena 1. Osteocalcina y runx 2 Esta pendiente Osteopontina y Fosfatasa alcalina	
1º septiembre 10	Hacemos las inmunohistoquímicas para el grupo experimental para osteopontina y fosfatasa alcalina	
10-septiembre 10	Tomamos fotografías con el microscopio Carl Zeiss para el cartón del congreso nacional de medicina Transfusional	
22,23, 28 y 30 septiembre 10	Tomamos fotografías con el microscopio Carl Zeiss de las tinciones e inmunohistoquímicas para anexar los resultados a la base de datos	
06 y 07 octubre 10	Tomamos fotografías con el microscopio Carl Zeiss de las tinciones e inmunohistoquímicas para anexar los resultados a la base de datos	
13 octubre 10	Iniciamos el vaciado de la información en la base de datos para planear el análisis estadístico luego de analizar la información de las fotografías tomadas	
15 de octubre 10	Reunión con el Dr Jiménez -Revisamos la base de datos y hacemos algunas modificaciones a la misma	
19 de octubre 10	Reunión con el Dr López Alvarenga, jefe de Bioestadística del Hospital general de México. -Llegamos a un acuerdo sobre que hay que hacer modificaciones en cuanto a	

	establecer una escala para la lectura de las inmunohistoquímica para que pueda ser analizado -Hacemos una estrategia para planear el tipo de análisis estadístico y las pruebas que se les van a hacer a cada una de las variables de acuerdo a su clasificación Anova, Chi2, T muestras independiente, Modelo General Lineal, etc
22 de octubre 10	Reunión nuevamente con la Dra Baena y revisamos todas las fotografías tomadas en Tinciones e inmunohistoquímicas. Llenamos la base de datos con la lectura de las laminillas por imagen de las mismas Reunión con la Dra Solís Discutimos el caso de porque hay más carbono y oxígeno en los grupos control que en el experimental e incluso en el de referencia
27 octubre 10	Iniciamos el análisis estadístico de las variables empezando por el univariado y descriptivo para cada una de las variables.
29 octubre 10	Revisión con el Dr López Alvarenga para ver como se había llevado a cabo la primera fase del estudio descriptivo y pruebas de normalidad y hacemos el plan para el bivariado y multivariado
30 octubre 10	Continuamos con el análisis estadístico y empezamos a la escritura de los resultados en el documento final para enviarlo al seminario
03 Noviembre 10	Empezamos a escribir la Discusión de acuerdo a lo que arrojo el análisis estadístico uni variado, bivariado y multivariado para Inmunohistoquímica, Microscopia de Barrido y Tinciones
04 Noviembre 10	Revisión de la Metodología del protocolo con el Dr Héctor Avila y principalmente revisar la forma en como se discuten los resultados
05 Noviembre 10	Revisión del desarrollo del trabajo y la forma del análisis estadístico con el Dr García de la puente ENVIO DEL REPORTE FINAL PARA REVISION DEL PROTOCOLO 10 NOV 10

## Anexo 8

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### FORMATO DE CONSENTIMIENTO

**Nombre del Estudio:** DESARROLLO DE HUESO DE NOVO GENERADO EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN CRANEO DE RATONES ATIMICOS

**Patrocinador del Estudio:** Instituto Nacional de Rehabilitación/ Instituto Nacional de Pediatría/ Instituto Nacional de Cancerología

**Médico del Estudio:** Dra. Ana Luisa Sesman Bernal (Médico Adscrito al Servicio de Cirugía Plástica del Instituto Nacional de Pediatría).

**Participantes en el Estudio:** Dra. María Cristina Velasquillo (Doctora en Biología y Responsable de la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina



Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación), Biol. Valentín Martínez López (Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación), M en C. Erika Ruvalcava (Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación), Tec. Laboratorista Xochitl Guerrero (Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación), M en C. Carlos Ianda Solís (Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación), M en C Lilia Solís (Departamento de Morfología Celular y Molecular del Instituto Nacional de Rehabilitación), Dr. Hugo Lecona Butrón (Jefe de Servicio del Bioterio Instituto Nacional de Rehabilitación), Dra. Leticia del Carmen Bahena (Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Rehabilitación), Dra. En C. Hilda Villegas Castejón

(Directora del departamento de Investigación Instituto Nacional de Rehabilitación), Carlos Jiménez Gutiérrez (Responsable de la Unidad de Análisis de evidencia centro Cochrane Instituto Nacional de Pediatría), Dr. Luis Núñez Ocho (Unidad de Patología Clínica facultad de Veterinaria y Zootecnia UNAM), Dr. Sergio Sánchez Guerrero (Jefe del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cancerología)

Se le está invitando a participar en un estudio de investigación. El presente formato de consentimiento tiene información que le ayudará a decidir si desea participar. Tómese su tiempo, lea cuidadosamente este formato y formule cualquier pregunta que tenga al doctor o personal del estudio.

### **Acerca de este Estudio**

El objetivo general de este estudio es: La formación de una unidad osteogénica (es decir la formación de hueso) para que sea aplicada a pacientes que necesitan hueso en el cráneo debido a accidentes, cirugía, malformaciones de nacimiento entre otros

### **Podría haber razones por las cuales no se le permita participar en este estudio. Algunas de estas razones incluyen**

- Por supuesto que no sea candidato a ser donador de médula ósea
- Si ha sido tratado con un medicamento en otra investigación o estuvo participando en una prueba clínica dentro del mes anterior.

Participaran 2 o más pacientes en el estudio.

### **El estudio consta del siguiente procedimiento:**

Formaremos una unidad osteogénica (con dermis humana sin células, hueso desmineralizado y células de médula ósea) aplicado a un animal de experimentación para observar cómo se comporta el tejido en un organismo en crecimiento. Al final, se sacrificará al animal y se realizarán pruebas para mostrar que el hueso nuevo recién formado sigue produciendo enzimas, proteínas características de un hueso normal y haremos pruebas con microscopía electrónica y confirmar que lo que se formó es efectivamente hueso





Los pasos anteriores permitirán mostrar que los tejidos que aplicamos formaron un tejido óseo, que se comporta adecuadamente en un ser viviente y que tiene las características de resistencia suficientes para ser implantados en un paciente que por alguna razón requiere hueso en el cráneo

Las células de medula ósea que se colocaran en esa unidad osteogénica serán tomadas de la muestra que usted dona para hacer las pruebas habituales como tipo de sangre, pruebas de DNA para ver la compatibilidad con el receptor, la prueba de Citometría de flujo que determina la viabilidad de las células, una vez que se hacen esas pruebas, generalmente llega a sobrar aproximadamente 1 mililitro de esa muestra que frecuentemente no se requiere para más pruebas y entonces ese sobrante de la muestra la usaríamos para colocarla en la unidad osteogénica si es que Usted nos autoriza usar sus células.

**Las complicaciones que pueden encontrarse en este estudio, pueden dividirse en aquellas relacionadas con:**

1. La toma de muestra: Las complicaciones posibles en el procedimiento de toma de muestra son menores ya que ésta se obtiene directamente del catéter. El proceso de almacenamiento y transporte es seguro y confiable.

**¿Qué se le pedirá a usted que haga?**

- Se le pedirá lean este formato de autorización.
- Se le aclararán con detalle las dudas que pudiera tener.
- Se le dará el tiempo necesario para que decida

La aplicación de la unidad osteogénica a los animales de experimentación es llevado a cabo en el Instituto Nacional de Rehabilitación, en la Unidad de Ingeniería Tisular, equipada específicamente para la generación de tejidos y con los permisos necesarios por la Coordinación Nacional de Institutos y la Secretaría de Salud.

Es importante mencionar que este tipo de tratamiento es experimental. Algunos centros en otros países se encuentran trabajando con el mismo investigación sobre defectos óseos Craneofaciales Todos estos estudios son estudios pilotos experimentales y se encuentran aprobados por sus respectivos Comités de Ética e Investigación. El efecto que puede producirse a largo plazo aún no está descrito.

**Información Adicional que Usted Debe Saber**

**¿Qué beneficio podría obtenerse por participar en el estudio?**

El propósito primordial es BENEFICIAR a una persona enferma que tiene como único recurso probable el uso de este hueso formado con los materiales que usamos nosotros



La información que se obtenga en este estudio: 1) Podría ayudar a otras personas con defectos óseos en el futuro, 2) Podría ayudar a otras personas con otras enfermedades donde el problema principal sea falta de tejido óseo por cáncer, traumatismo o complicaciones de otras cirugías, 3) Podría generar otras líneas de investigación en Ingeniería tisular y prefabricación de tejidos.

### **¿Qué riesgos corro al participar en este estudio?**

Los riesgos que existen al incorporarse al estudio son mínimos, pues son sólo los causados por la toma de la muestra de sangre. Si le causara alguna molestia, se le Brindará el tratamiento adecuado que se derive de este procedimiento incluyendo los primeros auxilios.

### **¿Cuáles son mis opciones si no participo en el estudio?**

Tiene usted la libertad de descartar ésta invitación. Cualquiera que sea su decisión ya sea registrarse o no, NO afectará de ninguna manera su relación con el servicio de banco de sangre o el Instituto Nacional de Cancerología ni resultará en modo alguno en penalidad o pérdida de los beneficios a los cuales usted tiene derecho.

### **¿Cómo se protegerá mi privacidad?**

Su identidad NO será revelada en ningún informe o declaración escrita como resultado de su participación en el estudio. Los resultados del análisis de sus células de médula ósea serán identificados mediante un código y **la clave de acceso es absolutamente confidencial**

### **¿Tendré que pagar algo o me van a pagar por esto?**

No se le pagará a usted por participar en el estudio, por donar su sangre periférica. **LA DONACIÓN ES TOTALMENTE VOLUNTARIA Y ALTRUISTA.**

No tendrá que cubrir ningún gasto por la colección de la médula ósea ó la sangre periférica, procesamiento ó análisis de su sangre.

### **¿A quién llamo si tengo preguntas sobre...?**

El estudio: Dra. Ana Luisa Sesman Bernal al 10840900 ext. 1202, 1670 o 1825 o al celular 0445551825777

### **Al firmar a continuación, acepto que:**

- He leído este formato de consentimiento.
- He tenido la oportunidad de hacer preguntas, las mismas que han sido respondidas con detalle.



- Entiendo que mi participación en este estudio es voluntaria.
- Doy mi permiso para usar y compartir la información sobre este estudio como se describe en este formato.
- Autorizo la toma, uso y material fotográfico
- Puedo decidir NO participar en el estudio. Sé que no estaré sujeto a alguna penalidad ni perderé cualquiera de los beneficios a los que de otro modo hubiéramos tenido derecho al no participar en el estudio.
- He recibido un duplicado firmado de este formato de consentimiento.

### **Solicitudes en el futuro.**

Al ser parte de este estudio, podría solicitársele en el futuro que participe en alguna actividad adicional relacionada o no con la donación de sangre. Por ejemplo, es posible que se le pida nuevamente donar sangre, participar en algún otro estudio de investigación, o completar algún cuestionario. ***Si se le pidiera participar en dichas actividades, usted tendrá la oportunidad de decir "NO".***

Pero, si usted prefiriera que no le pidamos participar, entonces, no lo haremos. Por favor, escriba sus iniciales al lado de una de las siguientes declaraciones.

\_\_\_\_\_ Sí está bien que se me pida participar en otras actividades.

Yo entiendo que tengo la libertad de decir "NO". \_\_\_\_\_ No me pidan participar en otras actividades.

**Estoy consciente y de Acuerdo** en aceptar participar en la investigación.

### **SU FIRMA ABAJO INDICA QUE USTED**

- HA LEIDO Y ENTENDIDO EL CONSENTIMIENTO INFORMADO ; QUE HA TENIDO LA OPORTUNIDAD DE HACER PREGUNTAS
- QUE SE LE HA DADO LA INFORMACIÓN MAS PRECISA QUE HA SIDO POSIBLE
- QUE USTED ESTÁ DE ACUERDO EN PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO
- QUE USTED AUTORIZA QUE UTILICEMOS LOS DATOS DE LA MUESTRA QUE LE TOMAMOS PARA ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN
- QUE USTED AUTORIZA DE SER NECESARIO, QUE ENVIEMOS LA MUESTRA QUE LE TOMAMOS A OTROS LABORATORIOS (NACIONALES O EXTRANJEROS) PARA CONFIRMACIÓN DE SU TIPIFICACIÓN

\_\_\_\_\_  
**Nombre del Donante**

\_\_\_\_\_  
**Firma del Donante**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**



**Nombre del Testigo**

---

**Firma del Testigo**

---

Fecha