



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA, FMVZ-UNAM.
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
BIOLOGÍA DE LA REPARACIÓN ÓSEA**

**ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE LAS
PROTEÍNAS ÓSEAS MORFOGÉNICAS BMP-2 Y BMP-4 EN
BORREGOS CON FALTA DE UNIÓN DE LA TIBIA TRATADA CON
ESTIMULACIÓN MECÁNICA.**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
ANGEL RAYMUNDO LOZADA GALLEGOS**

**TUTOR
DC María de Lourdes Juárez Mosqueda
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DC Federico Bernardo Castro Muñozledo
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
DC Miguel Ángel Cornejo Cortés
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM**

MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE 2013



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.



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.

CONTENIDO

1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT	6
3. ANTECEDENTES	7
1. Fracturas óseas	7
2. Aspectos moleculares de la reparación ósea	7
1. Contribución de las diferentes zonas de la fractura a la reparación ósea	
2. Tipos de reparación ósea	
3. Células fundamentales en el proceso de reparación ósea	
4. Moléculas involucradas en la promoción de la reparación ósea.	
5. Factores de transcripción activados en la diferenciación osteoblástica.	
6. Secuencia de los eventos moleculares que se presentan durante la reparación ósea.	
3. Falta de unión	32
1. Concepto	

2.	Clasificación	
3.	Causas	
4.	Diagnóstico	
1.	Criterios clínicos	
2.	Criterios radiográficos	
5.	Tratamiento	
4.	Efectos de la estimulación mecánica en el hueso	35
1.	Mecanotransducción	
2.	Estimulación mecánica y expresión de las BMPs	
5.	Modelos animales de falta de unión ósea	37
1.	Características generales	
2.	Modelos previos	
4.	HIPÓTESIS	39
5.	OBJETIVOS	39
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	40
3.	Animales	
4.	Inducción del proceso de falta de unión por medio de un modelo de defecto segmental óseo no crítico	
1.	Procedimiento anestésico	

2. Procedimiento quirúrgico

5. Tratamiento de la falta de unión
 1. Tratamiento quirúrgico
 2. Estimulación mecánica
 1. Características del clavo
 2. Características del tratamiento

6. Evaluación
 1. Examen ortopédico
 2. Radiográfica
 3. Análisis del tipo de tejido presente en la zona de la falta de unión.
 4. Expresión de las BMPs en el sitio de falta de unión
 1. Descalcificación
 2. Inmunomarcaje
 1. Inmunofluorescencia
 2. Inmunohistoquímica

7. RESULTADOS

49

1. Evaluación ortopédica
 1. Examen ortopédico en dinámica
 2. Examen ortopédico a la manipulación
2. Evaluación radiográfica
3. Análisis del tipo de tejido presente en la zona de falta de unión

4.	Expresión de las BMPs	
1.	Inmunofluorescencia	
2.	Inmunohistoquímica	
8.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	56
9.	LITERATURA CITADA	63

1. RESUMEN

En humanos la falta de unión es una complicación que se presenta en un 5 a 10% de las fracturas de huesos largos, porcentaje que se incrementa notablemente cuando la diáfisis tibial se encuentra involucrada. En la falta de unión el proceso de reparación ósea se detiene y la reparación de la fractura es poco probable, a menos que se establezca un protocolo terapéutico adicional. Se sabe que el tejido presente en el sitio de falta de unión puede servir como un reservorio de células progenitoras mesenquimales, que en respuesta a un estímulo específico (eléctrico, mecánico, biológico o una combinación de todos ellos), son capaces de continuar con el proceso osteogénico.

Se sabe que la estructura del hueso se adapta a las cargas a las que se somete de manera continua; existiendo evidencia que sustenta que los cambios en la presión del flujo del líquido intersticial es uno de los mecanismos mediante los que se transmite un estímulo mecánico externo a las células óseas. En consecuencia, al incrementarse la presión intramedular o la estimulación mecánica externa, el flujo del líquido intersticial podría modificarse al inducirse la deformación del tejido mediante la aplicación de dicho estrés mecánico. Es decir, si la estimulación mecánica es capaz de inducir la osteogénesis, su aplicación en un proceso de falta de unión por medio de un clavo bloqueado intramedular percutor podría reactivar la reparación ósea y favorecer la reparación de la fractura.

Para evaluar esto último, en el presente trabajo se utilizaron 3 borregos machos de la raza Suffolk, de un año y medio de edad en los que se generó un proceso de falta de unión ósea en la tibia izquierda. Uno de los animales se utilizó como control y los dos restantes se sometieron a estimulación mecánica por vibración. El estímulo mecánico se administró mediante un clavo intramedular bloqueado diseñado en el Instituto Nacional de Rehabilitación, México. El estímulo mecánico se administró por un periodo de 12 semanas en el animal experimental 1 (grupo EM12) y por 3 semanas en el animal experimental 2 (grupo EM3). El seguimiento del estudio se realizó por un periodo total de 12 semanas. En el estudio radiográfico a 12 semanas se observó una línea de fractura evidente y ausencia de un callo de reparación entre los bordes de fractura (Grupos control y EM12); el grupo EM3 mostró un callo mineralizado y no se observó evidencia de la línea de fractura. En el análisis histológico, se observó la predominancia de tejido fibroso en los grupos control y EM12. En contraste, en el grupo EM3 el total del tejido evaluado en el callo de reparación correspondió a matriz ósea mineralizada. Se evaluó la expresión de las BMPs 2/4 en el sitio de falta de unión; sin embargo, en ninguno de los animales de experimentación o el control se observó tinción positiva a las 12 semanas de evaluación. En conclusión, demostramos que la estimulación mecánica, administrada por medio de un clavo bloqueado percutor, reactiva el proceso de osteogénesis y facilita a la reparación de una fractura cuando se aplica a un proceso de falta de unión ósea.

2. ABSTRACT

In humans, the bone nonunion is a complication that occurs in 5 to 10% of long bone fractures. Such ratio is increased when the affected bone is the tibia, especially the tibial diaphysis. In the nonunion, bone repair has stopped and the union between the edges of the fracture is unlikely, unless an additional therapeutic protocol is used.

It is accepted that bone molds its shape in response to mechanical load. Accumulated evidence suggests that changes in interstitial fluid pressure are a mechanism by which an external mechanical stimulus is transmitted to bone cells. In addition, it has been observed that osteogenic process at the nonunion site may be resumed after a mandatory stimulus (electric, mechanic, biological or a combination of them), since the nonunion site may serve as a reservoir of mesenchymal progenitor cells. As a consequence, the interstitial fluid pressure can be modified by deformation of tissue either through the application of mechanical stress, increasing intramedullar pressure or by means of an external mechanical stimulation. If mechanical stimulation is capable of inducing osteogenesis, a percutor mechanism placed in direct contact with the bone might improve the efficiency of bone repair on a process of bone nonunion.

This study was carried out in three 1.5 year-old Suffolk male sheep which had a process of bone atrophic nonunion in the left tibia. One experimental animal was used as control; the other two were subjected to mechanical stimulation. Mechanical stimuli were applied *in situ* using an interlocking nail with an internal percussion device, designed at the National Institute of Rehabilitation, Mexico. Animal number one (MS12 group) was followed up for 12 weeks, while animal number two (MS3 group) was followed up for 3 weeks. At 12 weeks, the radiographic study showed that Control group and SM12 group had evident fracture gaps with rounded edges and no evidence of callus formation between them. In contrast, MS3 group showed a large mineralized callus between the four bone cortices; there was no evidence of fracture gap. Histological analysis demonstrated that predominant tissue in control group and MS12 group was the fibrous. Conversely, the ME3 group showed that total tissue at the reparation callus corresponded to mineralized bone matrix. The expression for BMPs 2/4 was evaluated at the nonunion site; however, neither experimental nor control animals showed positive staining at 12-weeks evaluation. We conclude that mechanical stimulation applied through a percutor interlocking nail reactivates osteogenesis and leads to bone repair when it is applied onto a process of bone nonunion.

3. ANTECEDENTES

1. FRACTURAS ÓSEAS

Los huesos largos están sometidos a la acción de fuerzas fisiológicas y no fisiológicas. La acción de las fuerzas no fisiológicas se presenta durante situaciones poco usuales como accidentes automovilísticos, lesiones por armas de fuego o caídas, donde estas fuerzas son transmitidas directamente al hueso, excediendo su límite de resistencia y dando origen a una fractura. Por su parte, las fuerzas fisiológicas se originan al apoyar peso sobre los miembros, por la contracción muscular o la actividad física y se transmiten al hueso a través de las superficies articulares por la misma contracción muscular, ejerciendo su acción en forma de tensión o compresión axial; estas últimas a su vez originan fuerzas de flexión y torsión. Normalmente, la acción de estas cuatro fuerzas (tensión, compresión, flexión, torsión) no excede el límite de resistencia del hueso, pero bajo ciertas circunstancias poco usuales, también puede dar origen a una fractura.¹

Una fractura es la pérdida completa o incompleta de la continuidad de un hueso o cartílago. Se acompaña de varios grados de lesiones a los tejidos blandos adyacentes, incluyendo el compromiso del flujo sanguíneo. Como resultado de este conjunto de alteraciones se compromete la función del sistema locomotor. Las fracturas pueden clasificarse tomando en cuenta las causas que las originaron, su localización, su forma, la presencia de heridas en la piel y la estabilidad lograda después de la reducción.²

Por otra parte, las fracturas en reparación pueden presentar complicaciones derivadas del propio accidente o como resultado del tratamiento seleccionado para su reparación. Es decir, a pesar de que la tecnología médica y la ortopedia han hecho grandes avances en el tratamiento de las fracturas, aún se siguen presentando complicaciones como mala unión, unión retardada y falta de unión. De particular interés es la falta de unión ósea debido al cese total de la reparación.³

2. ASPECTOS MOLECULARES DE LA REPARACIÓN ÓSEA

Si bien el proceso de reparación de una fractura, aún continúa sin ser comprendido con precisión, este involucra una cascada compleja de eventos biológicos. Estos eventos involucran mecanismos de señalización molecular extracelular e intracelular relacionados con la inducción y la conducción ósea.⁴ La reparación ósea, un proceso regenerativo complejo pero bien organizado, se inicia en respuesta a una lesión y en la mayoría de los casos, terminará con el restablecimiento de la estructura y función esquelética. Durante este

proceso, se repite la vía del desarrollo embrionario normal del hueso, con la participación coordinada de diversos tipos celulares.^{4,5}

2.1. Contribución de las diferentes zonas de la fractura a la reparación ósea

Existen cuatro zonas que componen el sitio de la lesión en una fractura y que contribuyen al proceso de reparación, las cuales son las cortezas óseas y el espacio entre éstas, el periostio, el canal medular (médula ósea) y los tejidos blandos adyacentes. Debido a las diferencias entre estas zonas, durante la reparación de una fractura, la formación de tejido nuevo no es homogénea en todo el callo formado.^{4,5,6} De manera general, a partir de la médula ósea y las zonas intercorticales se genera un callo blando que dará lugar a la formación de hueso por osificación endocondral; mientras que a partir del periostio y los tejidos blandos adyacentes se forma un callo duro, que generará hueso por osificación intramembranosa.^{4,7,8} El grado de contribución a la reparación de cada componente dependerá de las condiciones presentes en el sitio de fractura, entre las que se pueden mencionar la cantidad de factores de crecimiento, hormonas, nutrientes, pH, tensión de oxígeno, ambiente eléctrico y sobre todo, la estabilidad mecánica de la fractura.^{4,5}

2.2. Tipos de reparación ósea

De acuerdo a los eventos histológicos que se presentan durante el proceso de reparación, este se ha clasificado en directa o primaria e indirecta o secundaria.^{4,5}

a) Reparación ósea directa (primaria)

Este tipo de reparación se presenta cuando se logra una reducción anatómica de los fragmentos de fractura por medio de una fijación interna rígida, que en consecuencia reduce la tensión interfragmentaria. Este proceso involucra el restablecimiento directo de nuevos conductos Haversianos entre los fragmentos a través de las unidades de remodelación conocidas como “conos de remodelación”, con el objeto de restablecer la continuidad mecánica. En este tipo de reparación, las células vasculares endoteliales y las mesenquimales perivasculares producen células osteoprogenitoras que se diferenciarán a osteoblastos. En este proceso se observa poca o ninguna formación de callo a partir del periostio.^{4,5,7,9,10}

b) Reparación ósea indirecta (secundaria)

Este tipo de reparación se presenta en la gran mayoría de las fracturas e involucra la formación de callo por medio de la combinación de la osificación endocondral e intramembranosa.^{4,5, 6,7,8,9,10, 11,12,13}

En la osificación intramembranosa se forma hueso de manera directa, sin pasar previamente por la formación de cartílago, a partir de las células comprometidas a la línea osteoprogenitora y de las células mesenquimales indiferenciadas que residen en el periostio que se encuentra lejos de la línea de fractura.^{4,6}

La osificación endocondral involucra la formación de cartílago, a través del reclutamiento, proliferación y diferenciación de células mesenquimales hacia la línea condroblástica; posteriormente, este tejido será calcificado y sustituido por hueso. Por sus características temporales se ha dividido en seis etapas: formación del hematoma e inflamación, angiogénesis y formación de cartílago, calcificación del cartílago, remoción del cartílago, formación de hueso y finalmente remodelación ósea. Este tipo de reparación se atribuye al periostio y tejidos blandos adyacentes a la línea de fractura, los cuales generan la formación temprana de un callo que estabiliza los fragmentos de fractura.^{5, 6,7,8,11,13,14,15}

2.3. Células fundamentales en el proceso de reparación ósea

Las células son el elemento clave en el proceso de reparación y se comunican entre ellas por medio del intercambio de moléculas que actúan sobre receptores específicos de superficie. Los diferentes tipos celulares aparecen en secuencia cronológica, con cierto grado de solapamiento, lo que da lugar a las fases reconocidas en la reparación ósea a través de la osificación endocondral.¹⁶

En el proceso se observa la acción coordinada de diversos tipos celulares y de células individuales en el sitio de fractura. La acción de estas células es controlada por la activación secuencial de genes típicos, mismos que son activados por citocinas solubles (factores proteicos solubles), moléculas pequeñas (histamina, prostaglandinas, etc.) o moléculas provenientes de la matriz extracelular. Estas moléculas mensajeras interactúan con receptores específicos en la superficie celular, lo que usualmente causa un cambio en la conformación de las proteínas receptoras transmembranales, activando su función enzimática para iniciar una cadena de señalización intracelular que llevará la información al DNA en el interior del núcleo. A continuación, la respuesta celular es iniciada por la activación de genes y la expresión de ciertas proteínas, ya sean productos de secreción o de regulación intracelular.¹⁶

Las células inflamatorias, mesenquimales (MSCs), vasculares, progenitoras osteocondrales y los osteoclastos son parte fundamental del proceso de reparación.¹¹ Las MSCs son células madres que tienen el potencial de comprometerse y diferenciarse hacia múltiples líneas celulares, dando origen a las células de los tejidos mesenquimales que incluyen al hueso, cartílago, tendón, músculo, ligamento, estroma de la médula ósea y grasa.^{5,12,14}

Durante la reparación ósea, las fuentes potenciales de migración de células mesenquimales son la médula ósea, el tejido de granulación, la capa profunda del periostio, el endostio, así como los tejidos blandos circundantes. Además, las células mesenquimales perivasculares que existen en los vasos sanguíneos también contribuyen a la reparación. Sin embargo, el tejido fuente primario de MSCs es el periostio, por lo que la capacidad de formar un callo de reparación se ve disminuida si este es removido.^{5,14}

2.4. Moléculas involucradas en la promoción de la reparación ósea

Las moléculas de señalización que regulan el proceso de la reparación pueden ser clasificadas en tres grupos:^{4,5,6,8,11,14}

1. Citocinas proinflamatorias
2. Factores de crecimiento y diferenciación.
3. Metaloproteinasas y factores angiogénicos

Cada uno de estos grupos de citocinas y morfogénos tiene actividad biológica que promueve diferentes procesos que se sobreponen y dirigen las interacciones entre las diferentes poblaciones celulares.⁶

2.4.1. Citocinas proinflamatorias

Las citocinas son producidas por las células inflamatorias y comienzan a ejercer su acción inmediatamente después de la lesión por un periodo limitado de tiempo. Además, algunas de ellas son expresadas de nuevo en las etapas centrales de la reparación para estimular la osteoclastogénesis y llevar a cabo la remoción del cartílago; otras más son inducidas en las últimas etapas, durante la remodelación ósea.⁶

La interleucina 1 (IL-1) y la 6 (IL-6), así como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), son reconocidos por desempeñar un papel clave en el inicio de la cascada de la reparación ósea. Son secretados por macrófagos y células inflamatorias, así como por las células mesenquimales del periostio.^{4,5,6} Los efectos de estas citocinas son la quimiotaxis hacia otras células inflamatorias,

el incremento en la síntesis de matriz extracelular, estimular la angiogénesis, y el reclutamiento de células fibrogénicas endógenas hacia el sitio de lesión.^{4,6}

Las citocinas inflamatorias presentan dos picos de expresión, el primero a las 24 horas de ocurrida la fractura, reduciéndose a niveles casi indetectables durante el periodo de formación de cartílago.⁴ En el segundo pico, la expresión de factores reguladores clave de la osteoclastogénesis, como RANKL y OPG (dos miembros de la superfamilia del TNF- α), así como el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), se incrementa en asociación con la resorción del cartílago mineralizado al final de la osificación endocondral y disminuyen su expresión durante la remodelación ósea; en contraste, la IL-1 y la IL-6 vuelven a incrementar su expresión en asociación con la remodelación ósea durante la osificación secundaria.⁶ Por esta razón se considera que estas citocinas participan en la regulación de la osificación endocondral y la remodelación; de manera específica, el TNF- α promueve el reclutamiento de células madre mesenquimales, induce la apoptosis de los condrocitos hipertrofiados y estimula la función osteoclástica. De hecho, el TNF- α es de vital importancia en la regulación inicial del proceso, su ausencia retrasa la reabsorción de cartílago mineralizado, evitando la formación de hueso nuevo; por el contrario, cuando es sobrepresado, el cartílago se remueve de manera prematura dando lugar a una formación deficiente de hueso.^{4,5,6}

2.4.2. Factores de crecimiento y diferenciación

2.4.2.1. Superfamilia del TGF- β

La superfamilia del TGF- β es una gran familia de factores de crecimiento y diferenciación que incluye a las proteínas óseas morfogénicas (BMPs), al factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), los factores de crecimiento de diferenciación (GDFs), activinas, inhibinas, y la sustancia inhibitoria Mulleriana.^{4,5,6} Estos factores se originan de proteínas precursoras de alto peso molecular que son activadas por enzimas proteolíticas y actúan en receptores de membrana serina/treonina de las células diana. La interacción ligando-receptor activa una vía de señalización intracelular que tiene efecto sobre la expresión de genes en el núcleo.^{4,5} Los miembros específicos de esta familia que promueven las diversas fases de la osificación intramembranosa y endocondral durante la reparación ósea son las BMPs 1-8, GDF-1, 5, 8 y 10, así como el TGF- β 1, β 2 y β 3.^{4,5,6}

2.4.2.1.1. Proteínas óseas morfogénicas

A partir del descubrimiento por Urist en 1965, de que la implantación de hueso desmineralizado induce la formación de hueso y sobre la participación de las

BMPs en este proceso, existen numerosos trabajos que relacionan a estas proteínas con la esquelotogénesis y la reparación de las fracturas. Actualmente se conocen al menos 15 BMPs, que a excepción de la BMP-1, forman parte de la superfamilia de genes del TGF- β .^{17,18}

2.4.2.1.1.1 Función

Durante la vida embrionaria, las BMPs son importantes en la señalización que regula la neurogénesis y la hematopoyesis, así como en la organogénesis del esqueleto al inducir la formación de los somitas, y la diferenciación de los precursores de condroblastos y osteoblastos. Después del nacimiento estas proteínas juegan un papel importante en la regeneración y el mantenimiento de la masa ósea, ya que inducen la diferenciación de células mesenquimales hacia osteoblastos y regulan su función. También están involucradas en el desarrollo de tendones, ligamentos y cartílago^{17,18,19}. Diversas BMPs, incluyendo las BMPs-2, -3, -4, -6 y -7 inducen la diferenciación a osteoblastos de diferentes células mesenquimales pluripotenciales. También se ha observado que se encuentran involucradas en la reparación de las fracturas. En este aspecto se conoce poco sobre el efecto fisiológico de los diferentes factores de crecimiento *in vivo*, pero algunos estudios de inmunolocalización de los diferentes factores de crecimiento durante la reparación de fracturas en humanos, han mostrado que las BMPs, sus receptores y los componentes de su vía de señalización se expresan en el callo de reparación. En estos estudios se observó que las BMPs-2 y -4 se expresan en todas las fases de la reparación de una fractura²⁰.

Adicionalmente, se ha demostrado que las BMPs -2, -4 y -7 se regulan positivamente en células inmaduras durante las fases tempranas de la reparación ósea, y su expresión se mantiene de forma continua a lo largo de todo el proceso. Las BMPs y las moléculas que participan en su cascada de señalización se expresan en los sitios de formación de callo, lo que sugiere un papel clave en la reparación de las fracturas y da origen a la posibilidad de usarlas como objetivo o terapia para el tratamiento de las mismas.^{21, 22} Se ha sugerido que la disminución en la actividad de estas proteínas se asocia con retrasos y falta de unión durante la reparación de fracturas.^{20, 23} Algunos autores postulan que en los sitios de unión demorada y/o de falta de unión, los niveles de BMPs y/o sus receptores se encuentran por debajo de los niveles normales²⁴.

Actualmente es claro que las BMPs juegan un papel esencial en el control de la reparación ósea, y que su expresión varía a través de las fases del proceso. Las BMPs son morfógenos pleiotrópicos que desempeñan un papel central en la regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis de osteoblastos, condroblastos, células neurales y epiteliales.^{4,7} Estas proteínas son producidas por las células mesenquimales, osteoprogenitoras, osteoblastos y condrocitos^{4,6,7} y se almacenan en la matriz extracelular^{4,5}. En la condroosteogénesis inducen una cascada de eventos secuenciales, entre los que se

incluyen quimiotaxis, proliferación y diferenciación de células mesenquimales y osteoprogenitoras, angiogénesis y la síntesis controlada de matriz extracelular.^{4,5,6} Su efecto regulatorio depende del tipo de célula diana, su etapa de diferenciación, la concentración local del ligando así como su interacción con otros factores circundantes, de tal forma que cuando las BMPs activan sus receptores, se inicia una vía de señalización que regula la transcripción de genes blanco.^{4,5}

Los diferentes tipos de BMPs están relacionados estructural y funcionalmente entre sí, sin embargo, cada tipo tiene una función específica así como un patrón de expresión temporal diferente durante el proceso de reparación.^{4,5,13} Se ha identificado a las BMPs 2,4,6,7,9 y 14 como las más representativas en función. Estas BMPs presentan diferencias en expresión, afinidad por sus receptores, y en el efecto de regulación que los antagonistas extracelulares (Noggin, Gremlin, regulador de unión a BMP derivado de precursor de células endoteliales- BMPER) presentan sobre ellas. Además, difieren en su disponibilidad para ciertos tejidos debido a su unión específica a los componentes de la matriz extracelular y la presencia de receptores de superficie celular.¹³ Los receptores de las BMPs están formados por complejos heteroméricos compuestos de receptores Tipo I y Tipo II (BMPRI, BMPRII), pero además, su señal es regulada por co-receptores específicos de los tejidos, como Endoglin, Ror2 y las moléculas de guía repulsivas –RGMs.

2.4.2.1.1.2 Vía de señalización

La vía de señalización intracelular de las BMPs involucra la activación de las proteínas Smad, las cuales serán translocadas al núcleo para inducir la transcripción de genes. Sin embargo, también pueden inducir respuestas a través de la señalización independiente de Smads al activar a la proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38MAPK). La vía de señalización de la p38MAPK se caracteriza por el reclutamiento de proteínas inhibitoras de la apoptosis (XIAP), la cinasa activada 1 del TGF- β (TAK1) y la proteína de unión a TAK (TAB). Estas proteínas forman un complejo adaptador que regula las cinasas activadas por mitógeno (MKK) cuya función es activar a las MAPKs.¹³ Adicionalmente, las BMPs también activan la cinasa de regulación extracelular 1,2 (Erk 1,2) y a la cinasa c-Jun-NH₂-terminal (JNK)/proteína cinasa activada por estrés (SAPK).¹³ Las BMPs también activan a la fosfatidil inositol cinasa (PI3K) que generará el segundo mensajero unido a membrana fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), molécula que regula la actividad de las proteínas involucradas en la sobrevivencia y migración celular (cinasa de sobrevivencia Akt/PKB; GTPasas Rho respectivamente). La señalización por Akt es importante para la diferenciación dependiente de BMPs y las GTPasas Rho son importantes en la reorganización del citoesqueleto de actina mediante la formación de actina filamentosa (F-actina). Otro ejemplo de cinasa regulada por BMPs, y con un papel determinante en la reorganización del citoesqueleto, es la cinasa de

dominio Lim (LIMK). Esta cinasa reorganiza el citoesqueleto de actina a través del factor de despolimerización de la actina (ADF)/cofilina.¹³

Además, las BMPs se pueden unir a un solo receptor, lo que induce su oligomerización e internalización dependiente de caveolina para activar las vías independientes de Smad como Erk y MAPK. Estas dos vías activarán ATF2, c-jun o c-fos, las cuales regulan los genes blancos de las BMPs como la osteopontina, fosfatasa alcalina o colágena Tipo I.¹⁶

Los efectos de las BMPs en los osteoblastos son mediados por la activación de un complejo heteromérico de receptores de membrana y la transducción de señalizaciones específicas. Una vez activado, el complejo de receptores lleva a cabo la transducción de señales a través de la activación de proteínas específicas que forman complejos heteroméricos que se acumulan en el núcleo y participan en la regulación de expresión de genes.¹⁹ Estos receptores han sido identificados, caracterizados molecularmente, y clonados. Se trata de proteínas pertenecientes a la superfamilia de los receptores de los factores de crecimiento relacionados con el TGF- β , incluyendo las BMPs. La mayoría de los miembros de esta superfamilia actúan formando complejos constituidos por dos tipos diferentes de receptores: receptores tipo I (50-55 kDa) y tipo II (más de 75 kDa).^{19,20} Estos receptores poseen un dominio serina/treonina cinasa; en el BMPR II el dominio es activo y fosforila al dominio Gly-Ser (GS) del BMPR I al unirse a su ligando, activando las cinasas del BMPR I (Figura 1). La especificidad de la señal intracelular está determinada principalmente por los receptores tipo I. El BMPR-II tiene una cola C-terminal después del dominio SER/TREO; esta cola terminal interactúa con la cinasa LIM 1 (LMK1) y con Tctex1.²⁰

Diversos estudios sugieren que los receptores sufren una regulación positiva durante la formación del hueso ya sea durante el desarrollo embrionario o durante la reparación de fracturas. Asimismo se ha encontrado que en las células osteoblásticas existen numerosos sitios de unión para BMPs, aproximadamente 2500/por célula, así como también en células tumorales o asociadas a otras patologías.^{17,19,20} Para las BMPs se conocen dos receptores Tipo I diferentes: el receptor Tipo IA (BMPR-IA o receptor cinasa similar a la activina-ALK 3), y el Tipo IB (BMPR-IB o ALK-6), estos poseen un 84% de similitud en la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio con actividad de cinasa. Además, las BMP-7(OP-1) y BMP-2 comparten el receptor de la activina (ActR-I o ALK-2), que posee un 62% de identidad con los dos receptores anteriores.²⁰

Por otra parte, el receptor BMP Tipo II (BMPR-II) contiene en su porción terminal 530 aminoácidos ricos en residuos de serina y treonina. El BMPR-II une a varias BMPs, como las BMPs-2, -4 y -7, y no se ha observado que se una a la activina. En contraste se ha observado que los receptores Tipo II (ActR-II) y IIB (ActR-IIB) de la activina si pueden unir a las BMPs-7 y -2.²⁰

Hasta ahora se han identificado 184 genes de respuesta temprana a las BMPs en células osteoprogenitoras. Estos se clasifican en tempranos inmediatos (2 horas después de la estimulación de BMP's), tempranos intermedios (6 horas post estimulación) y tempranos tardíos (24 horas post estimulación). Los genes que regulan la transducción de la señal han sido identificados como genes tempranos inmediatos. Los genes intermedios y tardíos tempranos se relacionan con procesos de diferenciación de los osteoblastos. Uno de los principales genes blanco de las BMP son los que codifican para las proteínas Id (Inhibidor de la diferenciación o inhibidor de la unión al DNA), estas proteínas son inducidas por la estimulación de las BMPs en diferentes tipos celulares y son uno de los blancos más importantes de las BMPs. Funcionan como reguladores negativos de la diferenciación celular y reguladores positivos de la proliferación celular.¹⁷⁻¹⁹

Se ha encontrado que durante la organogénesis, en el embrión de ratón, los receptores BMPR-IA y -IB se expresan en el cartílago y el hueso en desarrollo, lo que sugiere que son importantes en la morfogénesis del hueso. Además, las diferencias en los patrones de expresión espacial y temporal de los receptores BMPR-IA y IB sugieren que estos receptores tienen diferentes acciones durante la organogénesis. En la rata adulta, cuando el hueso es fracturado, tanto las proteínas del receptor BMPR-IA como del -IB son inducidas en las células osteogénicas de la capa de células en proliferación, en los condrocitos de los sitios de osificación y en los osteoblastos del hueso trabecular nuevo. En estos tipos celulares también se observó la inducción de la proteína del receptor BMPR-II.^{18, 19}

Después de la activación de receptores (Figura 2, A), las BMPs transmiten la señal a través de vías dependientes e independientes de las Smads que incluyen moléculas como Erk, JNK y la MAP cinasa p38. EL BMPR-I activado fosforila en el extremo carboxilo terminal a las Smads reguladas por receptor (R-Smad-1, -5 y -8; Figura 2, B). Las R-Smads entonces forman complejos con las Smads asociadas-comunes (Co-Smad; 4 es la única en mamíferos; Figura 2, C).^{18, 19}

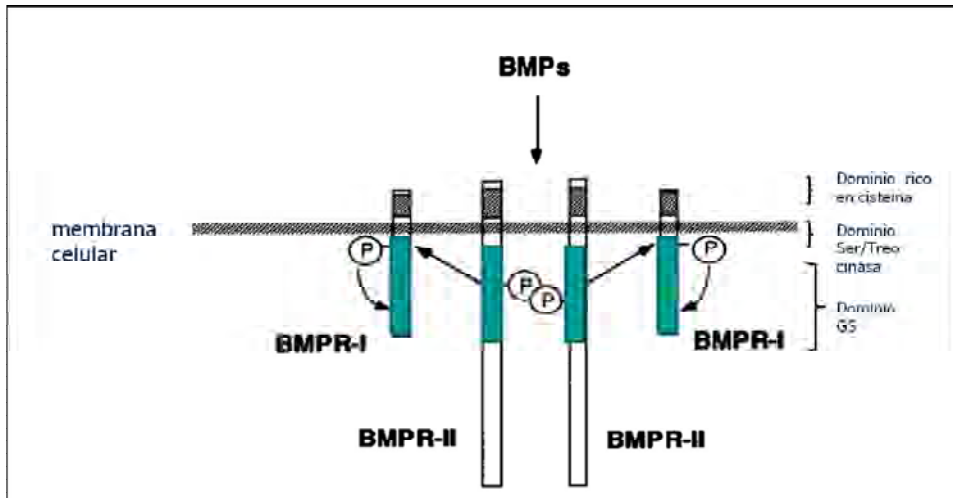


Figura 1.- Estructura de los receptores de las BMPs.

Posteriormente, el complejo R-Smad/Co-Smad se transloca al núcleo y regula la transcripción de genes blanco mediante la interacción con diversos factores de transcripción y co-activadores o co-represores transcripcionales (Figura 2, D). Existen otras proteínas Smads inhibitorias, las I-Smads (Smad 6 y 7), las cuales regulan de manera negativa la señalización de las R-Smads y Co-Smads (Figura 2, E).^{18, 19}

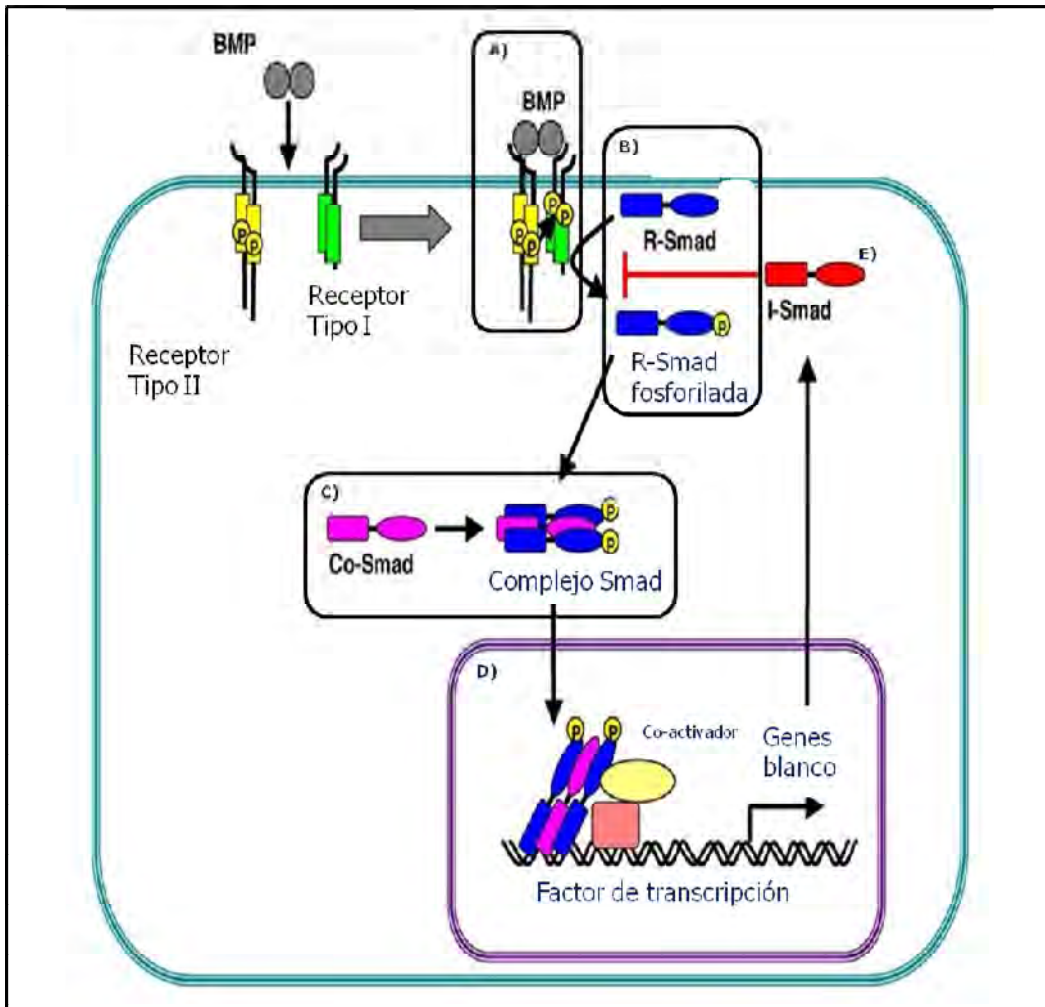


Figura 2.- Vía de señalización de las BMPs. A) activación de los receptores; B) Fosforilación de las R-Smad; C) Formación del complejo R-Smad/Co-Smad; D) Translocación al núcleo y transcripción de genes blanco; E) Smads inhibitorias.

Las R-Smad son similares en estructura y función. Todas a excepción de la Smad-8, son activadas eficientemente por la BMP-6 y -7 y las tres son activadas por BMP-2. En el núcleo, las Smads regulan la transcripción de los genes blanco al unirse directamente a secuencias específicas de DNA. La Smad 4 se une directamente a secuencias de unión de las Smad: SBEs, AGAC o GTCT al interactuar con otras proteínas de unión al DNA. En este proceso las proteínas Smad/Co.Smad interactúan con diferentes factores de transcripción, otras proteínas y con factores co-activadores o co-represores de la transcripción. ^{18, 19}

2.4.2.1.1.3. Participación específica de las BMPs en la reparación ósea

La BMP2 es esencial para iniciar el proceso de reparación ósea (además de ser necesaria para la reparación ósea post natal y el mantenimiento de la masa ósea en el adulto) y presenta sus máximos niveles de expresión dentro de las primeras 24 horas de ocurrida la fractura, aunque su expresión puede ser detectada durante todo el proceso. A pesar de que otras BMPs pueden compensar la falta de expresión de BMP2 durante el desarrollo óseo, ninguna es capaz de sustituir su función durante la reparación ósea.^{4,6,13} Durante la osificación endocondral la BMP2 regula el reclutamiento de las células osteoprogenitoras principalmente desde el periostio, así como la activación de su diferenciación hacia las líneas condrogénica y osteoblástica.¹³ Además, la BMP2 controla la expresión de diversas BMPs y cuando está ausente, las células madre de la médula ósea fallan en su diferenciación a osteoblastos.^{4,6} De manera adicional, BMP5 y BMP6 también se incrementan durante las fases tempranas para regular la proliferación de las células madre mesenquimales.¹³ Las BMPs 2, 6 y 9 son las más potentes para inducir la diferenciación de células mesenquimales hacia osteoblastos y las restantes (excepto BMP-3 y 13) promueven la diferenciación terminal de los precursores osteoblásticos comprometidos y de los osteoblastos.^{4,5,6}

De manera similar, las BMPs 5 y 6 son expresadas en la primera mitad de la reparación ósea, sugiriendo un efecto regulador en la osificación intramembranosa y endocondral.⁶ El GDF5 (BMP14) se expresa durante la segunda etapa de la reparación ósea para regular la condrogénesis.¹³ En adición a las BMPs 2, 5 y 6, se expresan otras BMPs como la 3, 4, 7 y 8, las cuales muestran un periodo de expresión restringido a la etapa de remodelación del cartílago hacia hueso esponjoso, donde hay una gran actividad de resorción del cartílago calcificado y reclutamiento osteoblástico.^{6,13} De manera sobresaliente, se ha observado que la expresión de la mayoría de los factores relacionados con la reparación ósea se encuentra disminuida en la falta de unión.¹³

La función de las BMPs está regulada de manera adicional por sus receptores asociados. En relación a la diferenciación osteogénica, la señalización mediada por BMPRIb parece ser la más importante, mientras que la mediada por BMPRIa es más importante para otros procesos de diferenciación. Cuando se bloquea la acción de BMPRIb se reduce de manera significativa la expresión de los genes Runx2, ALP, y osteocalcina; además de inhibirse la mineralización de la matriz. De manera opuesta, cuando se bloquea BMPRIa se inhibe la diferenciación hacia adipocitos.¹³

Además, las BMPs podrían estimular la síntesis y secreción de otros factores de crecimiento óseo y angiogénicos como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF). También podrían estimular la formación de hueso por activación directa de las células endoteliales para estimular la angiogénesis.^{4,5}

Las BMPs pueden ejercer sus efectos osteogénicos a través de la vía de las Smads y las vías independientes de Smads, siendo ambas vías de señalización intracelular. La vía de las Smads induce la expresión de *Runx2*, un factor de transcripción inicial y esencial para la diferenciación osteogénica, una vez expresado induce de manera directa la expresión de osteocalcina, osteopontina y colágena tipo I. Además, de manera conjunta, *Runx2* y *Dlx5* estimulan la expresión de ALP. También *Id1-4* son genes blanco para la señalización de las Smads, estos factores de transcripción promueven la diferenciación osteogénica al bloquear el proceso de diferenciación mioblástica.¹³

Las vías independientes de Smads incluyen la activación mediada por BMPs de p38, ERK, JNK, o PI3K. Las vías de señalización dependientes de Smads y las independientes de Smads actúan de manera sinérgica para activar y aumentar la función de factores de transcripción osteogénicos importantes como son *Dlx5*, *Runx2* y Osterix. Por ejemplo, las proteínas Smads inducen la activación de *Dlx5* y la fosforilación de este factor de transcripción por p38 aumenta su actividad. De la misma forma, *Runx2* es expresado por la acción de las Smads, pero su fosforilación está determinada por la vía de las MAPK (TAK1/MKK3/6-P38). En el caso de osterix, también su expresión está regulada por la expresión de p38, quien induce su fosforilación para incrementar su actividad de transcripción. La vía de JNK está involucrada en el proceso de diferenciación osteoblástica final y cuando es inhibida, se reduce de manera significativa la mineralización de la matriz y la expresión de marcadores osteogénicos como la osteocalcina y la sialoproteína ósea. En el caso de la PI3K, aún no se comprende del todo su función, pero se cree que regula de manera positiva la diferenciación osteobástica, aunque existe controversia al respecto.¹³

Por otra parte, también es importante considerar que los antagonistas de las BMPs desempeñan un papel importante en la reparación ósea, pues se ha visto que la expresión de Noggin (el cual bloquea la acción de las BMPs 2, 4 y 7) es simultánea a la de BMP4, regulando de manera conjunta la formación de callo en las fracturas. De manera complementaria se ha observado que su ausencia de expresión resulta en un exceso en la formación de cartílago durante el desarrollo.^{4,5,6}

2.4.2.1.2. Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)

Las tres isoformas (TGF- β 1 a 3) de este grupo de morfógenos están involucradas en la reparación de fracturas⁵ y su efecto es mediado por receptores cinasas en serina/treonina tipo I y II, los cuales activan la vía de las Smads (Smad 2 y 3).^{4,5} En la reparación ósea, las plaquetas producen y liberan el TGF- β durante la fase inicial de la inflamación, por lo que podría estar involucrado en iniciar la formación del callo. Además, en etapas

posteriores, el TGF- β es producido por osteoblastos y condrocitos y se almacena en la matriz ósea.^{4,5,6,7}

El TGF- β es un potente estimulador que incrementa la proliferación de células madre mesenquimales, preosteoblastos, condrocitos y osteoblastos.^{4,5,6} Además, induce la producción de proteínas extracelulares como la colágena, proteoglicanos, osteopontina, osteonectina y fosfatasa alcalina. Sin embargo, se piensa que su principal función es actuar durante la condrogénesis y la formación endocondral de hueso.^{4,5,6} Este factor también podría estar involucrado en iniciar la señalización para la síntesis de BMPs en las células osteoprogenitoras, además de inhibir la activación de osteoclastos y promover su apoptosis.^{4,5}

Con base en sus niveles máximos de expresión durante la condrogénesis, se ha sugerido que TGF- β 2 y β 3 podrían tener una participación más importante en la reparación de fracturas que el TGF- β 1, el cual presenta niveles de expresión constantes durante la reparación ósea.^{4,5,6} En la osificación endocondral, el TGF- β 2 es detectado en todas las zonas de cartílago, pero principalmente en las zonas de hipertrofia y mineralización; TGF- β 1 y β 3 se expresan en condrocitos de las zonas proliferativa e hipertrófica. Por otra parte, en la osificación intramembranosa, el TGF- β 1 y β 2 se detectan en los sitios de mineralización, mientras que el TGF- β 3 muestra una distribución más difusa.⁹ Aunque el TGF- β ha mostrado aumentar la proliferación celular, su potencial osteoinductivo parece limitado.^{4,5}

2.4.2.2. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

El PDGF es un factor extracelular que existe en tres isoformas biológicamente activas.¹⁹ El efecto del PDGF es mediado por receptores con actividad tirosinquinasa. Y su unión a receptores es afectada por la IL-1, TNF- α y el TGF- β 1.^{4,5}

Este factor es un mitógeno potente para células de origen mesenquimal y es sintetizado por plaquetas, monocitos, macrófagos, células endoteliales y osteoblastos.^{4,5,6,7} Es liberado por las plaquetas durante las fases tempranas de la reparación de fracturas, actuando como un potente quimiotáctico para las células inflamatorias y el principal estímulo de migración y diferenciación para las células MSCs y osteoblastos.^{4,5,6,25}

2.4.2.3. Factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs)

Esta familia de factores de crecimiento incluye nueve polipéptidos relacionados estructuralmente. Los FGF ácidos y básicos son los más abundantes en el

tejido adulto normal. Su acción es mediada por su unión a receptores tirosina cinasa.^{4,5}

En la reparación ósea, son sintetizados por monocitos, macrófagos, células mesenquimales, osteoblastos y condrocitos, promoviendo crecimiento y diferenciación de una gran variedad de células como los fibroblastos, miocitos, osteoblastos y condrocitos.^{4,5,7} Están presentes durante las fases tempranas de la reparación ósea y tienen un papel crucial en la angiogénesis y mitogénesis de las células mesenquimales.^{4,5}

El FGF- α regula principalmente la proliferación de condrocitos y es importante para su maduración, mientras que el FGF- β es expresado por osteoblastos y es más potente que el primero. El FGF- β también induce angiogénesis, así como mitogénesis de células mesenquimales y osteoblastos.^{4,5,25}

2.4.2.4. Factores de crecimiento similares a insulina (IGFs)

Las fuentes del IGF-I (somatomedina-C) y del IGF-II (o factor de crecimiento esquelético) son la matriz ósea, las células endoteliales, osteoblastos y los condrocitos^{4,5,7}, de manera general, promueven la proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras.⁷

Las acciones biológicas de los IGFs son moduladas de manera específica en cada célula por las proteínas de unión a IGFs (IGFBPs) y las concentraciones séricas del IGF-I son reguladas principalmente por la hormona del crecimiento.^{4,5}

El IGF-I promueve la formación de matriz ósea (colágena tipo I y proteínas no colágenas) por los osteoblastos totalmente diferenciados y es más potente que el IGF-II. El IGF-II actúa en etapas más avanzadas de la formación endocondral de hueso estimulando la síntesis de colágena tipo I, la síntesis de matriz cartilaginosa y la proliferación celular.^{4,5,26}

2.4.3. Metaloproteinasas y factores angiogénicos

El cartílago y el hueso es degradado por metaloproteinasas específicas de matriz (MMPs) durante las etapas finales de la osificación endocondral y en la fase de remodelación, permitiendo la infiltración de vasos sanguíneos.^{4,5} La formación de vasos sanguíneos nuevos se presenta después de que el hueso se fractura, para recuperar la homeostasis del oxígeno, el transporte de nutrientes, la eliminación de productos de desecho y para permitir la llegada de células y moléculas estimulantes de la reparación.⁹

Además las MMPs juegan un papel esencial en la degradación enzimática y remodelación de la matriz extracelular.²⁵

La angiogénesis es regulada por dos vías de señalización diferentes, la vía dependiente del VEGF y la vía dependiente de angiopoyetina; ambas vías participan en la reparación ósea.^{4,5,6,9,13}

a) Vía dependiente del VEGF

Este grupo de factores son mediadores esenciales de la neoangiogénesis y mitógenos específicos de las células endoteliales.^{4,5} Las BMPs inducen su expresión en osteoblastos y también es estimulado por el PDGF.²⁵ En áreas de baja tensión de oxígeno, como la porción avascular del callo cartilaginoso, se activa la vía de señalización del factor inducido por hipoxia (HIF), un factor de transcripción que incrementa de manera directa la expresión del gen del VEGF.^{25,27} Además, el VEGF puede encontrarse unido a la matriz extracelular y ser liberado desde ella por la acción de las MMPs, regulando su actividad en la reparación ósea.

b) Vía dependiente de angiopoyetina

Las angiopoyetinas 1 y 2 son moléculas reguladoras de la morfogénesis vascular y están relacionadas con la formación de grandes vasos y el desarrollo de ramas colaterales desde los vasos preexistentes. Su síntesis es estimulada por el TNF- α^2 y su participación en la reparación ósea aún no se comprende del todo.^{4,5}

2.4.4. Otras moléculas y vías de señalización que participan en la regulación de la reparación ósea

Los estudios genéticos en ratones y humanos han revelado el potencial de diversas vías de señalización como blancos terapéuticos para estimular la reparación ósea. En este sentido, se ha puesto interés particular en la vía de señalización del Wnt debido al papel esencial que su señalización dependiente de β -catenina desempeña en el desarrollo embrionario del hueso y el mantenimiento de la masa ósea.^{15,28}

2.4.4.1 Vía de señalización del Wnt

Las proteínas Wnt (Wingless-type MMTV integration site), descubiertas por primera vez en *Drosophila*, desempeñan un papel crucial en la embriogénesis, desarrollo y regeneración de órganos, migración y proliferación celular, así como en la carcinogénesis en los mamíferos. Las Wnts son glicoproteínas de secreción únicas, ya que pueden unirse a diferentes tipos de receptores de membrana, entre los que se encuentran Frizzled (Fzd), Ror2, Rik y LRP-5/6; dependiendo el receptor al que se unen, estimulan una o más vías de señalización intracelular (Wnt/ β -catenina; Wnt/ Ca^{2+} ;Wnt/polaridad celular plana-PCP;Wnt/Protein cinasa A –PKA).^{15,26,28}

Entre estas vías, la mejor comprendida involucra la estabilización de la β -catenina, la cual se inicia cuando las Wnts (1,2,3,3b,4,8 y 10) se unen al receptor Fzd. A continuación, el complejo formado es estabilizado por la unión de la proteína correceptora relacionada al receptor lipoproteico de baja densidad (LRP5 ó LRP6). A continuación, la glicógeno sintetasa cinasa 3 β (GSK3 β) y la caseín cinasa (CK)-1, inhiben la fosforilación de la β -catenina para evitar su degradación mediada por proteosomas. Como resultado, los niveles citoplasmáticos de β -catenina se elevan y esto eventualmente permite su translocación al interior del núcleo, donde se asocia con factores de transcripción, el factor de células T (Tcf7) y el factor potenciador linfoide (Lef1).^{15,28}

Como en todas las vías del desarrollo, las Wnts están estrechamente reguladas por factores paracrinos y retroalimentación autocrina. Entre los reguladores negativos que actúan sobre las Wnts, se encuentran GSK3 β , Dickkopfs (Dkk), proteínas secretadas relacionadas con Frizzled (Sfrp) y la esclerostina. Dkk1 y la esclerostina se unen a Lrp5/6 antagonizando el complejo receptor-ligando, en contraste, las Sfrps unen el ligando y evitan su unión con el receptor.^{15,28}

2.4.4.1.1. Activación de la vía del WNT en los sitios de fractura

El estudio de fracturas en roedores ha mostrado que las vías del Wnt contribuyen a la reparación ósea, en donde se asume que desempeñan un papel importante en las etapas tempranas del proceso que involucran la osificación intramembranosa pues componentes de dichas vías (Wnt4, 5a, 5b,11 y 13; Fzds 1,2,4,5 y 6; Lrp5 y 6; DKK2 y β -catenina) son sobreexpresadas en los primeros días después de ocurrida la fractura.²⁸ Posteriormente, los genes correspondientes a dichos componentes regresan a sus valores normales, pero se mantienen elevados durante el periodo de osificación endocondral, lo que sugiere que su participación también es importante en esta fase de la reparación. Además, la β -catenina se encuentra presente en el núcleo de células osteoblásticas de la capa periostial que

recubren las trabéculas cercanas al sitio de fractura, en los condrocitos del callo de reparación y en osteocitos del hueso cortical.²⁸

La estabilización de la β -catenina es un evento crucial en la vía de señalización “canónica”, la cual es activada por subconjuntos de Wnts (1,3^a,8,10b o Wnt5a dependiendo de los receptores disponibles). Ya en el núcleo, la β -catenina coopera con los factores de transcripción Lef1/Tcf7 para regular la expresión de genes. El complejo formado por β -catenina/Tcf7 es activo en varias etapas de la reparación ósea, particularmente en condrocitos y osteoblastos en proliferación, pero no en condrocitos hipertróficos o células inflamatorias. Además, diversos mRNAs para los genes blanco de este complejo se incrementan en los sitios de reparación de fracturas.^{15,26,28}

Se ha sugerido que la β -catenina realiza diversas contribuciones a la compleja regulación de los eventos celulares de la reparación ósea y desarrolla un papel importante en la expresión de marcadores específicos de osteoblastos, ya que su suplementación en cultivos de células mesenquimales arresta la diferenciación osteoblástica y favorece la condrogénesis y en osteoblastos comprometidos resulta en osteopenia. En contraste, la activación de esta vía aumenta la expresión del promotor osteogénico Runx2.^{15,26,28}

La administración del inhibidor Dkk1 en el sitio de fractura en ratones, reduce los niveles de expresión de la β -catenina en el callo de reparación, evitando la condrogénesis, además de que también se dejaron de expresar los genes fundamentales de la condrogénesis y la osteogénesis (Sox9 y Runx2 respectivamente). En estos animales las fracturas no repararon, observándose tejido mesenquimal no diferenciado, como dato adicional, no se observaron alteraciones en la angiogénesis.²⁸ Por otra parte el nivel de expresión de las Sfrps ha sido relacionada de manera directa con la cantidad de osteoblastos en apoptosis.¹⁵

2.4.4.1.2. Interacción de Wnt con otras vías

En el complejo proceso de la regeneración ósea continúa existiendo gran desconocimiento de las cascadas de eventos biológicos que la regulan, particularmente en las interacciones entre las diferentes vías de señalización intracelular y extracelulares. Muchas vías de señalización están involucradas en la regeneración ósea, entre estas, son de particular importancia la vía BMP/Smad y Wnt/ β -catenina. Debido a la gran importancia de las BMPs en estimular la formación de hueso, su interacción con las Wnt durante la diferenciación condrogénica y osteogénica es de gran interés.²⁸

Se ha observado que existe una sobreposición funcional entre estas dos vías, pues la estimulación con BMP2 en osteoblastos induce la expresión del RNA de diversos ligandos de Wnt (Wnt-7a, 10b) y sus receptores (Fz-1, LRP-10),

así como la transcripción dependiente de TCF como consecuencia del incremento en los niveles de β -catenina.¹⁵ Además, los niveles intranucleares de Smad4 así como la interacción entre Smad4 y β -catenina se incrementan por el efecto de BMP2, lo que podría sugerir el mecanismo de la interacción entre las vías Wnt/BMP2. Estos datos muestran que las vías WNT/BMP interactúan por diversos mecanismos.¹⁵

2.4.4.2. Vía de señalización de la MAPK

La vía de la MAPK es activada por una gran variedad de Factores de crecimiento involucrados en la osteogénesis, entre los que se incluyen el FGF, PDGF, TGF- β y los IGFs. El estímulo extracelular de estas moléculas lleva a la activación de la cascada intracelular de señalización compuesta por la MAP cinasa, MAP cinasa cinasa (MKK o MAP2K) y la MAP cinasa cinasa cinasa (MKKK o MAP3K). Esta vía cumple funciones de regulación en la proliferación y diferenciación celular.²⁶

2.4.4.3 Vía de señalización de Hedgehog

Los miembros de la familia de señalización Hedgehog (Hh) proveen información de posición durante la esqueletogénesis e inician o mantienen programas de diferenciación celular que regulan la formación de cartílago o hueso. Esta molécula de señalización es producida por los condrocitos prehipertróficos y sus señales parecen actuar de manera directa en los progenitores osteoblásticos localizados en el pericondrio. La unión de la proteína Hh a su receptor (Patched) activa la proteína transmembranal smoothed (Smo). En consecuencia, la transducción de la señal activa al factor de transcripción GliA (proteína dedo de zinc de la familia Kruppel), el cual es translocado al núcleo para regular la proliferación de las células madre y activar genes blanco. Datos experimentales sugieren la señalización por Hh actúa de manera previa al Wnt y se limita a la etapa inicial del compromiso a la diferenciación osteoblástica.²⁶

2.4.4.4 Señalización por Notch

Es bien aceptado que la señalización por Notch determina el destino celular. Debido a que tanto los receptores de Notch (δ 1,3,4 y Jagged 1,2) como sus ligandos son proteínas transmembranales, se requiere una interacción célula-célula para la activación de la vía de señalización. Notch 1 y 2 son expresados en osteoblastos y se ha observado que pueden tener una función dimórfica:

favorecer la proliferación de osteoblastos inmaduros o reprimir la maduración de osteoblastos asociada a BMPs al inhibir la activación de Runx2.²⁶

2.5. Factores de transcripción activados en la diferenciación osteoblástica

Las vías de señalización mencionadas llevan a la activación de factores de transcripción que ejercen efectos positivos y negativos en la regulación de la expresión de genes que controlan la adquisición del fenotipo osteoblástico, y en consecuencia, regulan la formación de hueso en la reparación ósea.^{12,26}

Runx 2 es considerado un encendedor maestro esencial en la regulación de la diferenciación osteoblástica. Es un miembro de la familia Runx de genes, la cual incluye a runx1, runx2 y runx3, y es expresado de manera abundante en el cartílago calcificado y en el hueso ya que se requiere para mantener la función de los osteoblastos.¹⁹ La expresión de runx2 en las células mesenquimales (MSCs) induce la sobreexpresión de genes específicos de osteoblastos, incluyendo la osteocalcina, la fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea y la colágena tipo I α 1 (coll α 1).¹² Runx2 es esencial para la formación endocondral e intramembranosa de hueso, ya que su inactivación resulta en la inhibición total de formación de hueso. Muchos factores de transcripción interactúan con Runx2, ya sea como señales coestimuladoras o reprimiéndolo al afectar su unión al DNA o su potencial de trasactivador.²⁶

Osterix (Osx) es expresado de manera específica por los osteoblastos como consecuencia de la expresión de Runx2.¹² Sin embargo, también puede ser inducido por vías de señalización independientes o paralelas a Runx2, como la vía de la MAPK inducida por BMPs.²⁶ La cooperación entre Osx y el factor nuclear activado de las células T incrementa el promotor de coll α 1 o la vía de señalización de Wnt, y en consecuencia acelera la diferenciación osteoblástica y la formación de hueso de manera independiente a Runx2.^{12,26}

La vía de señalización de Wnt- β -catenina tiene como resultado la translocación de la β -catenina al interior del núcleo y la activación de genes, incluyendo runx2, el cual lleva a la diferenciación de los osteoblastos. Además, el factor activador de la transcripción 4 (ATF4) y homeobox 5 también desempeñan un papel importante en la osteoblastogénesis.¹² El ATF4 es necesario para la diferenciación terminal de los osteoblastos e intercatúa con Runx2 para regular la expresión de sialoproteína ósea y OC.²⁶

También se han demostrado una gran cantidad de factores de transcripción específicos de líneas celulares que han demostrado inducir la diferenciación de las MSCs en líneas celulares específicas. Por ejemplo, la sobreexpresión del core binding factor1 (CBFA1/Runx2, osterix (Osx) y el receptor relacionado a lipoproteínas 5 (Lpr5) inducen la diferenciación de osteoblastos; mientras que el PPAR- γ_2 y Sox9 inducen la diferenciación de adipocitos o condrocitos, respectivamente.²⁶

2.6. Secuencia de los eventos moleculares que se presentan durante la reparación ósea

A pesar de que existen limitaciones en la extrapolación de resultados de modelos animales al humano, en este caso la rata, tales modelos son útiles para entender el proceso como tal. Es importante tomar en cuenta que las fases se desarrollan aproximadamente el doble de rápido que en el humano.^{4,7,11}

El orden cronológico de los eventos moleculares que regulan la osteogénesis se ha descrito mediante el análisis “transcripcional” y “proteómico” de la reparación ósea y su comparación entre modelos animales con fractura y sanos. En fases tempranas después de la lesión al hueso, se ha observado sobreexpresión de genes relacionados con el ciclo celular y la señalización célula-célula, lo que apoya la teoría de que estos dos procesos son esenciales para iniciar la reparación ósea. Los genes relacionados al control del crecimiento y la sobrevivencia celular son sobre expresados de manera constante, mientras que los asociados con la diferenciación de los precursores osteogénicos y la formación de matriz ósea son expresados de manera temporal durante el proceso. De manera particular, la expresión de IGF-I y II, PDGF, FGFR, fibronectina, metaloproteinasas de matriz, glicano, biglicano, osteomodulina, osteonectina, tenascina C, colágenas del cartílago (VI y XI) y hueso (I, V, VI, XII) se incrementa hasta el momento en que el osteoide inmaduro sintetizado por los progenitores osteoblásticos es posible de ser detectado mediante técnicas histológicas.²⁶ Aunque varias vías de señalización determinan el inicio de la osificación endocondral, la vía de la protein cinasa activada por mitógeno (p38/MAPK) posee un papel esencial en llevar el proceso de reparación hasta esta etapa.²⁶

En cuanto a la inducción osteogénica de las MSCs se ha observado que en las etapas iniciales de la diferenciación, la mayoría de los genes sobreexpresados están relacionados con la proliferación celular, mientras que en las etapas más avanzadas son los genes relacionados con funciones biológicas relevantes para la osteogénesis, como las vías de señalización de factores de crecimiento, genes asociados a tejido óseo y moléculas de adhesión, los que se incrementan de manera gradual.²⁶

2.7.1. Etapa de Inflamación

La respuesta de reparación ósea, de la misma manera que otros procesos de reparación en el organismo, se inicia por medio de la activación del sistema inmune.^{4,5} Una fractura se asocia con daño local de la integridad del tejido blando, alteración de la función vascular normal y alteración de la arquitectura ósea. Estas alteraciones inducen la activación de los mecanismos de reparación inespecíficos del hueso.¹¹

Como primer evento y a consecuencia del sangrado en el sitio de fractura, contenido por los tejidos blandos circundantes, se forma un hematoma en las primeras horas después de ocurrida una fractura, el cual consiste de células de la sangre periférica e intramedular, así como de células de la médula ósea.^{4,5,8,10,11,14} EL daño a la microvasculatura origina hipoperfusión regional y una caída en la tensión de oxígeno y en el transporte de nutrientes, en consecuencia, los osteocitos quedan sin nutrición, lo que ocasiona necrosis ósea local. Además, el daño al periostio y al músculo contribuyen a la formación de tejido necrótico.¹⁴ El tejido óseo muerto será removido por los osteoclastos, células que ejercen su actividad desde momentos muy tempranos en el proceso y la mantienen así durante todo el desarrollo del mismo.²⁹ Estas condiciones de hipoxia promueven la expresión del factor 1 alfa inducido por hipoxia (HIF1 α) en los macrófagos, el cual presenta efectos angiogénicos al inducir la expresión de VEGF.^{16,27} Además, con el trauma óseo, las proteínas de la matriz y los factores de crecimiento y diferenciación almacenados en la matriz ósea se vuelven solubles y activos por la liberación de sus dominios de unión heparínicos a través de las hidrolasas de heparina liberada por las plaquetas.¹⁶

La respuesta inflamatoria iniciada en el sitio de lesión juega un papel importante en el inicio de la cascada de reparación, por lo que las células inflamatorias son esenciales para el proceso. Dichas células ejercen efectos quimiotácticos para el reclutamiento de más células inflamatorias y mesenquimales, estimulan la angiogénesis e incrementan la síntesis de matriz.⁹ Entre las células que infiltran el hematoma formado entre los bordes de fractura se encuentran las plaquetas, macrófagos, granulocitos, linfocitos y monocitos. Estas células se encargarán de combatir la infección, secretar citocinas y factores de crecimiento y ocasionar que el hematoma se coagule entre y alrededor de los bordes de fractura, formando un molde para la formación del callo. Con el tiempo, una gran concentración de fibronectina permitirá la adherencia de fibroblastos a través de las integrinas¹⁶ y los capilares invadirán el tejido, el cual será reorganizado como tejido de granulación rico en fibrina.^{10,14,27} La respuesta de estas células es coordinada por la secreción de diversas citocinas y factores de crecimiento que favorecerán el reclutamiento de células inflamatorias adicionales, así como la

migración e invasión de células mesenquimales multipotenciales (MSCs) desde el periostio, médula ósea, circulación y tejidos blandos circundantes.¹¹

Entre las moléculas secretadas por las células inflamatorias presentes en el sitio de fractura se encuentran las interleucinas (IL-1, IL-6, IL-11, IL-18) y el TNF- α que inducen la quimiotaxis de otras células inflamatorias y el reclutamiento de células mesenquimales; estos factores también promueven la angiogénesis.^{4,26} Por su parte, las plaquetas, activadas por la trombina y la colágena subendotelial, liberan PDGF y TGF- β , factores de crecimiento que juegan un papel esencial en el inicio de la reparación. El efecto de estos factores también es inducir la migración, activación y proliferación de células mesenquimales, la angiogénesis, así como la quimiotaxis de más células inflamatorias y la agregación de más plaquetas.^{4,5,7,16}

Al mismo tiempo, los macrófagos expresan IL-1, la cual induce la expresión de IL-6 en los osteoblastos, promueve la producción del callo cartilaginoso y la angiogénesis. Por su parte, la IL-6 estimula la angiogénesis, la producción del VEGF y la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos.¹⁰ En relación a los macrófagos, el fenotipo M1 es necesario en el proceso pro-inflamatorio temprano, sin embargo, es necesario un cambio al fenotipo M2, que suprimirá las reacciones inflamatorias e iniciará la angiogénesis al secretar factores de crecimiento angiogénicos y fibrogénicos (FGFb, PDGF)¹⁸; este cambio en el fenotipo de los macrófagos es importante en la transición de la fase de inflamación a la fase proliferativa.^{9,16}

Simultáneamente, las BMPs son liberadas desde la matriz ósea y expresadas por las células mesenquimales reclutadas.^{4,5,7} Estas proteínas inducirán angiogénesis, quimiotaxis, mitogénesis, así como proliferación y diferenciación celular.⁷ Las células blancas de la sangre desempeñan un papel crucial en este punto, ya que son la principal fuente de citocinas que inducirán la expresión de BMPs en las células del estroma de la médula ósea. Además, la generación de las condiciones de hipoxia local han mostrado inducir la expresión de BMP2 en osteoblastos así como la vía de señalización de las Smads 1/5 en células endoteliales.¹³

Para comenzar con la resorción de los detritos óseos, en el sitio de fractura se presenta activación de los osteoclastos, mientras que para comenzar a transformar el hematoma en tejido de granulación, se observa la migración de fibroblastos que median la síntesis de una red de fibrina.⁶

Cabe señalar que la máxima respuesta de la reacción inflamatoria aguda se observa en las primeras 24 horas pero que es casi indetectable a partir de los 3-7 días; sin embargo algunas moléculas proinflamatorias son expresadas en etapas posteriores.^{4,5,8,10}

2.7.2. Angiogénesis

Durante los siguientes días, las células mesenquimales proliferan y se diferencian hacia la línea condrogénica u osteoblástica. Durante esta fase de eventos tempranos se lleva a cabo la angiogénesis, para que una red nueva de vasos capilares invada el tejido de granulación, este proceso es un prerrequisito para que continúe la progresión de la cascada de eventos de reparación, además proporciona una vía para la migración posterior de células mesenquimales y una fuente de moléculas de señalización.^{4,5, 6,9}

El crecimiento de vasos sanguíneos hacia el interior del callo en formación es regulado por el FGF y el VEGF, así como por las angiopoyetinas 1 y 2.^{4,5,8} Se ha sugerido que la angiopoyetina 1 es inducida durante las fases iniciales de la reparación, estimulando el crecimiento vascular desde los vasos sanguíneos del periostio; mientras que el VEGF se induce en fases más tardías, principalmente durante la calcificación del cartílago y el inicio de su resorción durante la osificación endocondral.^{4,6,7}

Se sabe que los dos modos de formación de vasos sanguíneos (vasculogénesis y angiogénesis) contribuyen a la reparación ósea. La vasculogénesis es la formación *de novo* de vasos sanguíneos por medio del reclutamiento y diferenciación de células endoteliales progenitoras (EPCs) y se ha demostrado que las BMPs inducen la quimiotaxis de las mismas, además de inducir la expresión en las células madre mesenquimales del VEGF, el más potente inductor de migración y proliferación endotelial. Se ha observado el efecto sinérgico de la BMP4 y el VEGF-A para reclutar a las MSCs e inducir la formación de cartílago y más adelante, la remodelación del mismo durante la osificación endocondral. En las células pre-osteoblásticas, el VEGF-A es un objetivo transcripcional de la señalización por BMPs.¹³

La diferenciación local inicial de EPCs para formar un plexo vascular primitivo es continuada con el segundo mecanismo para la formación de vasos, la angiogénesis. En este proceso, se forman ramificaciones nuevas a partir de vasos preexistentes en respuesta a señales quimiotácticas, como el VEGF; una célula endotelial es seleccionada y activada para migrar por medio de la activación de su receptor VEGFR a consecuencia de los gradientes de VEGF. Se ha visto que la BMP4 aumenta los niveles de expresión y la fosforilación del VEGFR2 en células endoteliales en asociación a la formación de callo, por lo que se piensa que las BMPs favorecen la angiogénesis.¹³

2.7.3. Generación de callo cartilaginoso y óseo (*periostial*)

La reparación indirecta de las fracturas se lleva a cabo tanto por la osificación intramembranosa como por la endocondral, aunque la formación de un callo cartilaginoso, que posteriormente pasará por un proceso de mineralización,

resorción y será reemplazado por hueso, es el proceso que representa el mayor porcentaje.¹⁰

2.7.3.1. Formación intramembranosa de hueso

Las células que contribuyen a este tipo de osificación provienen del hueso cortical subyacente, el periostio cercano a los bordes de fractura y la médula ósea involucrada en el sitio de fractura.^{4,5} Este proceso genera un callo duro central, que unirá los bordes de los fragmentos óseos y proveerá a la fractura de una estructura semirrígida que permitirá al hueso soportar la carga por apoyo.¹⁰

Durante las primeras 24 horas después de la fractura, células de la médula ósea se diferencian hacia el fenotipo osteoblástico, observándose un incremento en los niveles de expresión de las BMPs 2, 4 y 7, cuyo objetivo es el de inducir la diferenciación de las células osteoprogenitoras en osteoblastos.^{4,5,7,10}

Para el día tres, los osteoblastos de la corteza y las células osteoprogenitoras derivadas del cámbium en el periostio se dividen y diferencian para comenzar a formar hueso trabecular. La osteonectina, una molécula de adhesión, comienza a ser evidente.^{4,5,7} En los días 7-10 se observa el pico máximo de proliferación, el cual disminuye cerca del día 14, aunque la actividad osteoblástica se mantiene. Mientras tanto, se comienza a expresar la osteocalcina y la osteopontina en las células osteoprogenitoras y osteocitos cercanos a las zonas de osificación endocondral.^{4,5,7} Los osteoblastos periostiales sintetizan colágena tipo I, lo que resulta en la generación directa de tejido calcificado.⁶

Del día 11 al 20 cesa la proliferación celular; predominando la colágena tipo II, sin embargo la expresión de su mRNA está ausente. Los niveles de fibronectina disminuyen en el día 14.⁷ Finalmente, para el día 25 no hay más proliferación celular y la zona lesionada está formada por completo por hueso trabecular.

2.7.3.2. Formación endocondral de hueso

Cuando se mantiene una estabilidad mecánica adecuada, este tipo de osificación se presenta en el área entre los bordes de fractura (o también llamada línea de fractura) Se desarrolla a partir del periostio adyacente al sitio de fractura y se ve favorecida por los tejidos blandos de la zona.^{4,5,6}

2.7.3.2.1. Formación de callo blando

Las células que predominan en este proceso son los fibroblastos y los condrocitos, aunque la proporción relativa de los diferentes tipos celulares varía entre las fracturas. Estas células producirán un callo suave semirrígido que es capaz de proporcionar soporte mecánico a la fractura, así como de actuar como molde para el callo óseo que lo sustituirá. El callo cartilaginoso es predominantemente avascular, aunque su posterior substitución por hueso trabecular involucra la invasión por vasos sanguíneos.¹¹

Después del tercer día de ocurrida la fractura, como paso inicial, las células mesenquimales son reclutadas y comienzan a proliferar, posteriormente se diferencian hacia condroblastos (condrogénesis) y entre los días 7-21 estos nuevos condrocitos proliferan dando lugar a la formación del callo blando.^{4,5,7,10,14} Los condrocitos sintetizan y secretan la matriz específica del cartílago (colágena tipo II y proteoglicanos) hasta que todo el tejido fibrinoso y de granulación es reemplazado por cartílago.^{4,5,7,10} La expresión de *col2a* indica que la colágena tipo II está siendo sintetizada.¹⁴ Si se presentan zonas con producción deficiente de cartílago, los fibroblastos ocuparán la región produciendo tejido fibroso.¹¹

El IGF-1 y el TGF β -1 regulan la proliferación y la diferenciación de las células mesenquimales del periostio durante la condrogénesis. El IGF-1 se ha involucrado en la inducción de la diferenciación temprana y el mantenimiento de la proliferación y el fenotipo; el TGF β -1 aunque participa en inducción de la diferenciación temprana y la proliferación hacia la condrogénesis, en las últimas etapas de la condrogénesis periostial, podría no tener un efecto potente en la proliferación y expresión de colágena tipo II.²⁹ También se ha observado que la adición durante las etapas tempranas de FGF-2, en conjunto con el TGF β -1, incrementa la proliferación celular, lo que en etapas más avanzadas contribuye a incrementar la formación de cartílago nuevo. También se encontrado que aunque el FGF de tipo básico puede estimular la proliferación de condrocitos este podría inhibir la diferenciación terminal de estas células.²⁹

En resumen, en esta etapa la proliferación de los fibroblastos y la proliferación/diferenciación de los condrocitos son estimuladas por la expresión coordinada de TGF- β 2 y TGF- β 3, PDGF, FGF-1 e IGF; de forma adicional, las BMPs 2, 4, 5 y 6 ayudan a promover la proliferación celular y la condrogénesis.^{10,11, 27}. Observándose además, en fibroblastos, condrocitos y osteoblastos, la presencia de moléculas de adhesión y migración, particularmente de fibronectina.⁷

2.7.3.2.2. Transición de cartílago a hueso

Una vez que se ha alcanzado la rigidez mecánica suficiente, los condrocitos sufren hipertrofia y comienzan a sintetizar colágena tipo X y mineralizan la matriz cartilaginosa de forma organizada.^{4,7,11}

En la reparación ósea, el VEGF es requerido para la vascularización directa del callo, y son los condrocitos hipertrofiados los que al expresar este factor estimulan la invasión de vasos sanguíneos hacia el cartílago, así como la resorción del mismo.^{8,10,25} Por otra parte, tanto los condrocitos hipertrofiados, como los osteoblastos expresan MMP13 para degradar los proteoglicanos del cartílago y permitir la invasión de vasos sanguíneos y células de resorción. De manera alterna e independiente, los condroclastos expresan MMP9 para continuar con la degradación enzimática de la matriz y la liberación del VEGF almacenado en ella.²⁵

Es la BMP2 la que estimula en los condrocitos hipertrofiados la síntesis de VEGF-A, B y C y la expresión del VEGFR2. El VEGF-A induce la osteoclastogénesis en el pericondrio y estimula la migración de osteoclastos hacia el interior de las regiones hipertróficas. Como mecanismo de sobrevivencia los condrocitos hipertrofiados presentan una secreción autocrina, y una secreción paracrina, como mecanismo de reclutamiento para las células endoteliales necesarias para la neovascularización de la región hipertrófica.^{13,27} Además, los condrocitos hipertrofiados expresan el FGFR1 y su activación influye en la maduración de osteoblastos, al estimular la diferenciación a célula osteoprogenitora o arrestar la maduración de los osteoblastos diferenciados.²⁶

2.7.3.2.3. Formación de callo duro

Conforme los vasos sanguíneos comienzan a invadir la matriz, los condrocitos hipertrofiados entran en apoptosis y son removidos por los condroclastos, dando lugar a la formación de hueso trabecular. Se piensa que la apoptosis de los condrocitos en esta fase está programada genéticamente.^{4,5}

La resorción del cartílago mineralizado se produce en asociación con el aumento de la expresión de M-CSF, RANKL, OPG y TNF- α , factores que además ayudan en el reclutamiento de células óseas y osteoclastos.^{8,10,27} El TNF- α promueve el reclutamiento de células mesenquimales con potencial osteogénico y de manera más importante se piensa que induce la apoptosis de los condrocitos hipertrofiados.¹⁰ La expresión de las BMPs 3, 4, 7 y 8 también se incrementa en asociación con la resorción del cartílago, promoviendo el reclutamiento de células de la línea osteoblástica.⁸ El principal efecto de las BMPs es sobre las células osteoprogenitoras, induciendo su proliferación y diferenciación. De esta forma, las células precursoras óseas producen entre otras moléculas a la fibronectina insoluble, la cual es necesaria

para la adhesión celular; ya que después de que la célula osteoprogenitora se adhiere firmemente a la matriz se vuelve secretoriamente activa y es llamada osteoblasto; además, comienza a expresar marcadores moleculares como osteocalcina y fosfatasa alcalina.¹⁶

De manera importante, la estimulación (osteoinducción) de las células mesenquimales no diferenciadas y de las osteoprogenitoras para diferenciarse a osteoblastos es un evento morfogenico que involucra discretas transiciones celulares. Este proceso está regulado por la interacción compleja entre múltiples señales locales (paracrinas y autocrinas) contenidas en el ambiente natural de las células mesenquimales. Las BMPs se consideran como mediadores críticos de este proceso y han mostrado ser suficientes para inducir la formación de hueso *de novo*.¹¹ Estas proteínas son sintetizadas por las células mesenquimales e inducen la diferenciación de células osteoprogenitoras a osteocitos. Las BMPs 2, 6 y 9 inducen la diferenciación de MSCs osteoprogenitoras, y las BMPs 2, 4, 7 y 9 llevan su diferenciación a osteoblastos. No obstante, la mayoría de estas BMPs son capaces de inducir la diferenciación de los osteoblastos a osteocitos.^{4,7}

Otros reguladores de crecimiento óseo son el TGF- β y el grupo del IGF; el TGF- β parece actuar predominantemente en las células diferenciadas, promoviendo su proliferación y la síntesis de matriz ósea.¹² Adicionalmente, se ha encontrado que los miembros de esta última familia presentan patrones temporales de expresión diferentes, sugiriéndose un papel único para cada uno de estos.^{4,5}

Una vez que el callo blando es reemplazado por hueso inmaduro, este es remodelado de manera importante antes de poder soportar carga mecánica.⁴ Esta etapa representa el periodo de osteogénesis más activo. Se caracteriza por un nivel elevado de actividad osteoblástica y la formación de matriz ósea mineralizada, la cual se origina en áreas de estabilidad mecánica de la región periférica del callo. La matriz inicial del hueso inmaduro, la cual esta mineralizada y posee una composición proteínácea, es sintetizada por osteoblastos maduros, diferenciados a partir de osteoprogenitores, en presencia de factores osteogénicos¹¹, y contiene colágena tipo 1, osteocalcina y fosfatasa alcalina.²⁷

Además, en el mecanismo de calcificación está involucrada la mitocondria, la cual durante el ambiente hipóxico de la fractura acumula gránulos de calcio, los cuales después de ser enviados hacia el citoplasma de los condrocitos, son transportados a la matriz extracelular donde precipitan con el fosfato y forman los depósitos minerales iniciales. Estos depósitos de calcio y fosfato se convertirán en el foco para la nucleación homogénea y la formación de cristales de apatita.¹⁰

2.7.4. Remodelación ósea

Cuando la unión ha ocurrido, dentro del hueso que ha sido formado, las fibras de colágena presentan una orientación aleatoria, en contraste a la orientación observada en el hueso laminar, por lo que este tipo de hueso se conoce como inmaduro. En un inicio, conforme las fibras de colágena se mineralizan, la orientación de los componentes del hueso sintetizado se encuentra desorganizada, lo que afecta de manera importante las propiedades mecánicas del hueso, reduciendo su fuerza y rigidez.^{14,16} Por esta razón, el callo duro de hueso trabecular deberá ser removido para formar hueso laminar y eventualmente recuperar la estructura original del hueso laminar con una cavidad medular central.^{4,7,10,11} El proceso de remodelación implica la actividad coordinada del proceso de resorción seguido de la formación de hueso laminar.^{11,16}

El osteoclasto, el cual se forma por la diferenciación y fusión de precursores hematopoyéticos, es la célula con la función clave en la resorción del hueso mineralizado.^{4,8,12,13} Para llevar a cabo la remodelación, los osteoclastos se polarizan y se adhieren a la superficie mineralizada, formando un borde ondulado a través del cual bombean ácido hidrociorhídrico y proteasas como la catepsina K, cisteína lisosomal, que degrada colágena tipo I y fosfatasa ácida.^{11,14} El ambiente ácido desmineraliza la matriz, mientras las proteasas degradan los componentes orgánicos. Los productos de degradación son removidos desde el borde ondulado a un dominio secretorio y los osteoclastos son inducidos a apoptosis o a regresan a una forma no resortiva. Es así que se crea un pozo erosivo o "laguna de Howship" por donde los osteoblastos migran y sintetizan hueso nuevo sobre la superficie.¹¹

Además, los osteoblastos secretan dos citocinas que son primordiales para la inducción, sobrevivencia y competencia de los osteoclastos, el M-CSF y una citocina del grupo del factor de necrosis tumoral (TNF), el activador del receptor del ligando del factor nuclear κ B (RANKL). El M-CSF es importante para la inducción primaria de la diferenciación de las células madre hematopoyéticas hacia la línea osteoclástica. RANKL es un factor producido por los osteoblastos maduros que estimula la diferenciación de preosteoclastos, aumenta la actividad de los osteoclastos maduros e inhibe la apoptosis de los osteoclastos.^{5,12,30} La actividad de RANKL se regula por medio de dos receptores, la osteoprotegerina (OPG) y RANK. Los precursores de osteoclastos expresan RANK y su activación ejerce los efectos fisiológicos mencionados, la OPG es un receptor soluble que es un importante regulador de la señalización de RANKL ya que antagoniza la diferenciación de los osteoclastos.^{12,16,30} La proporción RANK/OPG determina la regulación final de la osteoclastogénesis, en la cual están involucradas la IL-1, IL-3, IL-6.^{10,12,16}

En adición a estos factores pro-osteoclasticos especializados, otra gama amplia de citocinas y factores de crecimiento están presentes en la reparación de fracturas donde actúan como promotores de la osteoclastogénesis, entre los que se encuentran el TNF- α , BMPs y el TGF- β .¹¹

Aunque los eventos celulares que se presentan durante la reparación ósea parecen estar regulados predominantemente por factores locales y citocinas, las hormonas sistémicas (hormona tiroidea/paratiroidea, hormona del crecimiento, vitamina D, esteroides sexuales) podrían modular estos eventos.¹¹

3. Falta de unión

En humanos, la mayoría de las fracturas de huesos largos progresan de manera exitosa hacia la reparación, sin embargo, la falta de unión es una complicación que puede presentarse en un 5 a 10% de los casos³¹. En algunos casos, tal complicación puede representar hasta un 16% de los casos cuando las fracturas son expuestas y con un gran daño de los tejidos blandos circundantes, o hasta un 46% cuando la irrigación sanguínea de la zona se ve comprometida³². De los huesos largos, la tibia es aquél que se fractura con más frecuencia y que además presenta los índices más altos de desarrollo de falta de unión, sobre todo cuando su diáfisis se ve afectada; bajo estas circunstancias, la incidencia puede variar entre el 5 y 41% de los casos^{33, 34}.

3.1 Concepto

La falta de unión se define como una fractura en la que la evidencia clínica y radiográfica demuestra que la reparación ósea se detuvo en las condiciones presentes al momento del diagnóstico, por lo que la fractura no se repara y es poco probable que lo haga a menos que algún protocolo terapéutico adicional se establezca.^{35,36} Además, se observa la formación de tejido fibroso o cartilaginoso que requiere de la intervención quirúrgica para promover la reparación ósea y lograr la unión de la fractura.³⁷

De forma general se considera como falta de unión cuando una fractura no ha reparado en un periodo de seis a ocho meses.³⁸ En 1986, la Food and Drug Administration (FDA) especificó el periodo para el establecimiento de la falta de unión en un mínimo de nueve meses a partir de la lesión; de manera adicional, la fractura no debe mostrar signos progresivos de reparación ósea durante los tres últimos meses. Aunque, esta definición debe ser aplicada con criterio, debido a que el tiempo de reparación en cada hueso es diferente, pero si una fractura no repara dentro del tiempo que normalmente se requiere en un hueso en particular, se puede considerar como falta de unión.^{35,38,39}

3.2 Clasificación

Existen varios criterios para la clasificación de la falta de unión ósea, el más utilizado es el que considera la capacidad de los bordes de los fragmentos óseos para generar una respuesta biológica. De la viabilidad de los bordes de los fragmentos óseos, depende la elección del tratamiento para corregir la falta de unión. Basados en lo anterior, se distinguen dos tipos principales de falta de unión: falta de unión viable (hipertrófica o hipervascular) y falta de unión no viable (atrófica o avascular)^{35,36,38, 39-43}.

3.3 Causas

Se desconocen las causas específicas que llevan al desarrollo de una falta de unión, pero se sospecha que intervienen factores tanto locales como sistémicos³⁵. La falta de irrigación, el daño severo al periostio, la destrucción ósea que provoca grandes defectos, o bien, una estabilización inadecuada de la fractura son factores que favorecen su presentación⁴⁴⁻⁴⁶. La patogénesis de la falta de unión puede dividirse de manera estricta en dos categorías principales: (1) falla biológica (de origen primario o sistémico), que consiste en la conservación de las condiciones adecuadas para que ocurra la reparación, pero los mecanismos biológicos no pueden llevarla a cabo; y la (2) falla técnica, en la que no se crean las condiciones adecuadas para que el hueso se repare. Tanto en medicina veterinaria como humana, la mayoría de los casos de falta de unión se relacionan con la segunda categoría, frecuentemente asociada a una técnica quirúrgica o inmovilización inadecuadas o al desarrollo de una infección.⁴⁷

3.4 Diagnóstico

Un diagnóstico presuntivo de falta de unión se establece cuando ha pasado un tiempo prolongado desde que se presentó la fractura y se puede confirmar con hallazgos clínicos y radiográficos como los siguientes^{35,36,48}

3.4.1 Criterios clínicos

1. Inestabilidad y falta de rigidez en el sitio de fractura.
2. Pérdida de la capacidad del miembro para apoyar.
3. Crepitación en la zona de fractura.
4. Deformidad de la zona, el miembro se desvía del eje axial normal.
5. El callo en la zona de fractura puede ser abundante o ausente, dependiendo del tipo de falta de unión.
6. Dolor de grado variable.
7. Atrofia de la musculatura de la zona por falta de uso.

3.4.2 Criterios radiográficos

1. No hay contacto de los bordes de los segmentos de la fractura y se observa aún la línea de fractura donde el hueso debería estar unido por un callo. En el caso de haber formación de callo, este no une los extremos de la fractura.
2. Los bordes de la fractura se observan bien definidos sin actividad aparente, al menos no con señal de mineralización, y pueden encontrarse escleróticos.
3. En los extremos cercanos a la fractura puede verse la formación de un tapón de callo endosteal obliterando el canal medular.
4. Disminución de la densidad del hueso circundante (osteopenia), como consecuencia de la falta de la actividad.
5. Angulación.

3.5 Tratamiento

La clasificación de la falta de unión determina la o las técnicas que el tratamiento debe incluir para su corrección, por lo tanto, existen infinidad de terapias tanto conservadoras como quirúrgicas. Es bien aceptado que el protocolo adecuado para el tratamiento de la falta de unión debe incluir la estabilización del sitio, así como la resección del tejido de la zona y el retiro de la corteza ósea de los bordes de fractura y la colocación de un injerto óseo^{40, 49-53}.

Adicionalmente, se sabe que el tejido en el sitio de falta de unión puede servir como un reservorio de células progenitoras mesenquimales. Estas, en respuesta a un estímulo específico (eléctrico, mecánico, biológico o una combinación de todos ellos) son capaces de continuar el proceso osteogénico. Por esta razón, diversas estrategias que utilizan métodos biológicos o físicos han mostrado resultados satisfactorios en el tratamiento de la falta de unión^{45,46, 54,55}.

4. Efectos de la estimulación mecánica en el hueso

El hueso es un tejido compuesto por una matriz de colágena e hidroxiapatita que contiene una red compleja de lagunas y canalículos donde los osteoblastos y osteocitos, en conjunto con sus procesos citoplasmáticos, se encuentran inmersos en líquido intersticial. Uno de los primeros científicos en sentar las bases de la influencia de la estimulación mecánica en la estructura del hueso fue el anatomista Julius Wolff, quien en 1892, con base en sus observaciones estableció que la estructura del hueso (cortical y trabecular) es capaz de adaptarse a las cargas a las que se ve sometida de manera continua. Actualmente, se acepta que el estímulo mecánico tiene un gran efecto en la velocidad y la eficiencia del proceso de reparación de una fractura; por esta razón es de gran importancia comprender el efecto del ambiente mecánico en una fractura sobre su reparación, así como el mecanismo por el que las señales mecánicas modulan la reparación ósea.⁵⁶

El ambiente mecánico dentro del callo de una fractura en reparación está determinado por parámetros múltiples como la estabilidad de la fijación, la geometría de la fractura y el tipo de carga. La carga mecánica que recibe una fractura es consecuencia del apoyo del peso sobre el miembro afectado y sus efectos sobre la reparación ósea dependen de la frecuencia, tipo y magnitud de la carga, así como del tamaño de la línea de fractura⁵⁷. En trabajos en los que se ha evaluado el efecto de la dinamización de la línea de fractura, se encontró que la aplicación de desplazamientos compresivos cíclicos puede aumentar la reparación al aumentar la cantidad de callo formado y la velocidad de osificación. En contraste, aunque se ha observado que la aplicación de desplazamientos por tensión sucesivos también estimula la formación de hueso, en este caso se favorece la osificación intramembranosa⁵⁸. Estas grandes diferencias en los efectos de la aplicación de cargas compresivas y de tensión sobre el tipo de osificación demuestran tanto la complejidad como el potencial para utilizar las cargas mecánicas para favorecer la formación de hueso.

En los primeros trabajos en los que se consideró la aplicación de estimulación mecánica por vibración, Rosenberg⁵⁹ encontró que al aplicar este tipo de estímulo a cultivos de células similares a osteoblastos estas activaban vías de señalización intracelular, modificando el metabolismo de las mismas⁵⁹. Evaluando los efectos del estímulo mecánico por vibración, pero en un modelo animal, en este caso el borrego, Goodship y Kenwright observaron que la reparación ósea de defectos segmentales en tibia se vio favorecida por la vibración aplicada a través de un fijador esquelético externo, pues indujo la formación de un callo óseo más extenso⁶⁰.

De manera práctica, la aplicación de un estímulo mecánico durante la reparación de fracturas o de defectos segmentales óseos, induce la diferenciación y formación de los componentes del tejido óseo^{57, 61}. Adicionalmente, cuando se aplica compresión cíclica a través del sitio de fractura, se observa que la estimulación mecánica tiene un efecto positivo sobre la respuesta osteogénica del hueso, resultando en la formación de un callo óseo más extenso^{62, 63}.

Desafortunadamente, debido a que aún no se definen los parámetros ideales para aplicar una carga, la estimulación mecánica no se ha consolidado como un método estándar de tratamiento. Sin embargo, la estimulación mecánica sigue representando un tratamiento potencial en el manejo de las fracturas óseas y sus complicaciones como la falta de unión⁶³.

Adicionalmente, existe evidencia que apoya la posibilidad de que los cambios en presión del líquido intersticial son uno de los mecanismos mediante el cual se transmite un estímulo mecánico externo hacia las células óseas. En consecuencia, la presión del líquido intersticial podría ser modificada al deformar al tejido mediante la aplicación de estrés mecánico ocasionado por el incremento de la presión intramedular o por estimulación mecánica externa⁶⁴.

4.1 Mecanotransducción

A pesar de que se desconoce el mecanismo mediante el cual el hueso responde a un estímulo mecánico convirtiéndolo en una señal química para las células, se ha sugerido que los osteocitos son las células responsables de llevar a cabo este proceso de mecanotransducción. La mecanotransducción involucra tres procesos: 1) la mecanodetección (acoplamiento bioquímico), 2) la transducción de la señal y 3) la respuesta de la célula efectora. La mayoría de los estudios en el campo de la reparación ósea se han enfocado en la respuesta de las células efectoras (condrocitos y osteoblastos), observándose que los cambios en el ambiente mecánico del sitio de la reparación afectan la expresión de morfógenos y de proteínas de la matriz extracelular.⁶⁵

Por otra parte, tampoco se sabe mucho sobre los mecanismos de mecanodetección y de las vías de señalización activas durante la reparación de la fractura. En particular, se sabe poco sobre la identidad de los tipos celulares que actúan como mecanodetectores durante cada una de las fases del proceso de reparación, de cómo estas células detectan el ambiente mecánico, y de cómo esta detección se transforma en una respuesta de las células efectoras.⁶⁵

Estudios en osteocitos, osteoblastos y progenitores osteoblásticos, permitieron proponer a diferentes moléculas como parte del mecanismo de mecanodetección. Entre éstas se encuentran los canales iónicos activados mecánicamente, las integrinas, las proteínas G y la asociación entre el citoesqueleto y algunas isoformas de la fosfolipasa C⁶⁶. Recientemente se ha involucrado a la cinasa de adhesión focal (FAK) como un mediador clave en la formación de hueso. Por otra parte, mediante estudios in vitro y en modelos óseos se identificaron varias vías de mecanotransducción, sin embargo, todavía no se ha logrado determinar cuáles vías de señalización participan durante las diferentes fases de la reparación ósea.⁵⁸

Una de las vías de señalización más importante en la reparación ósea normal⁶⁶ es la de las BMPs. . Por este motivo, en diversos trabajos se ha analizado la relación entre la estimulación mecánica y la expresión de estas proteínas durante la reparación ósea. De esta manera, Kristy y colaboradores reportaron que los patrones de expresión génica son diferentes en la osteogénesis por distracción respecto a los encontrados en una fractura en reparación no sometida a tensión, observándose un aumento en la expresión tanto de BMPs-2 y -4 así como de diversas proteínas de matriz extracelular.⁵⁷

4.2. Estimulación mecánica y expresión de las BMPs

Diversas investigaciones sugieren que el estrés mecánico induce la expresión de las BMPs. Por ejemplo, en la osteogénesis por distracción se observó formación

de hueso al ejercer fuerzas de tensión graduales entre los fragmentos de una fractura. En tales casos se demostró la presencia del RNAm de las BMPs -2 y -4 en el callo sometido a distracción, lo que sugiere que el gen responsable de expresarlas es inducido por las fuerzas de tensión. Por esto, la vía de señalización de las BMPs podría actuar como un mediador en el proceso de reparación ósea inducido por estrés mecánico.⁶⁷ Datos recientes indican que uno de los factores moduladores en la expresión de BMPs y sus receptores consiste en la aplicación de cargas mecánicas. Además, existen trabajos donde se ha observado que la estimulación con BMPs promueve la activación *in vitro* de células obtenidas a partir de procesos de falta de unión; estos datos sugieren que la estimulación mecánica de la falta de unión podría estimular la producción de BMPs, lo que a su vez reactivaría el proceso de osteogénesis en el hueso⁶⁸.

5. Modelos animales de falta de unión ósea

El modelo de falta de unión ósea es un tipo especial de modelo de fracturas, ya que representa una reparación ósea anormal. Se emplea con el propósito de estudiar las condiciones fisiopatológicas que llevan al desarrollo de tal complicación en la reparación de las fracturas, así como para generar nuevos tratamientos para su resolución.⁶⁹

5.1 Características generales

Diversos modelos de falta de unión ósea se han descrito en especies como la rata, conejo y el perro. El principio básico para crear una no unión ósea consiste en la modificación de los elementos osteoconductivos y osteoinductivos en el sitio de fractura. Los métodos más comunes para lograrlo incluyen la resección de 3 a 10 milímetros del hueso diafisario o metafisario y escisión o cauterización extensa del periostio; esto puede ir acompañado de la separación de los bordes de fractura mediante barreras de silicón. La fijación de la osteotomía se ha realizado mediante fijadores esqueléticos externos (AFEE) o clavos intramedulares.^{48, 68, 70-75}

5.2 Modelos de falta de unión generados a partir de defectos segmentales

Los modelos de defectos segmentales óseos han proporcionado un excelente modelo *in vivo* para el desarrollo y estudio de la falta de unión. De todas las especies utilizadas, los roedores⁷⁶⁻⁸⁸ y los perros⁸⁹⁻⁹⁴ son las más frecuentemente utilizadas, sin embargo, estos modelos no son comparables con la talla del cuerpo humano. En relación a esto, el uso de un modelo segmental óseo no crítico en tibia de borrego, presenta como ventaja la gran similitud con la talla del humano, lo que en adición al estudio de los eventos celulares, permitirá la evaluación de procedimientos quirúrgicos e implantes similares a los que se usarían en humanos.⁹⁵

Un campo de gran interés es la evaluación de los efectos de la vibración mecánica en la reparación de las fracturas óseas, esto debido a que la tibia es uno de los

huesos largos que se fractura con mayor frecuencia en humanos y también uno de los que tiene gran riesgo de desarrollar complicaciones en la reparación de las fracturas como falta de unión ósea.^{3, 33,34} Uno de los implantes más eficientes en la fijación de fracturas y que es utilizado con regular frecuencia en la reparación de fracturas de tibia es el clavo bloqueado.⁹⁶ Por estas razones, en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) se decidió diseñar un clavo bloqueado dinámico (CBD), por medio del cual se pueda administrar estimulación mecánica por vibración.

La ventaja del diseño de este CBD es que su colocación en un paciente es idéntica a la de cualquier clavo bloqueado estándar, evitando así problemas relacionados con el aprendizaje de una nueva técnica quirúrgica por parte del cirujano, y si sus efectos reportan beneficio, se podría proponer como un tratamiento innovador que mejore la reparación ósea en la falta de unión.

4. HIPÓTESIS

Si la estimulación mecánica es capaz de inducir la osteogénesis, su aplicación en un proceso de falta de unión por medio de un clavo bloqueado intramedular percutor podría ser capaz, a través del incremento en la expresión de las BMPs, de reactivar la reparación ósea y favorecer la consolidación de fractura.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la respuesta tisular y la expresión de las BMP's ante un estímulo mecánico por vibración, para determinar sus efectos en la reparación ósea en un proceso de falta de unión ósea en tibia de borrego.

.

Objetivos particulares

Evaluar el grado de reparación óseo obtenido como resultado de la vibración en un modelo de falta de unión ósea mediante:

1.- Seguimiento radiográfico del proceso

1. Evaluar la reparación ósea durante el periodo de 12 semanas
2. Determinar el grado radiográfico de unión ósea a las 12 semanas

2.- Estudios de histomorfometria

2. Describir la etapa de progreso de la reparación ósea de acuerdo a las características histológicas encontradas a las 12 semanas

3.- Evaluar la expresión de las BMPs- 2 y -4 mediante inmunodetección

1. Describir que tipos celulares expresan las BMPs -2 y 4
2. Determinar si se inducen diferencias en la expresión de las BMP's

6. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales

El estudio se llevó a cabo en 3 borregos machos de la raza Suffolk, de un año y medio de edad. Los animales se obtuvieron del CEIEPO (Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

A todos los animales se les generó un proceso de falta de unión ósea por medio de un modelo de un defecto segmental óseo no crítico previamente establecido⁸³. Posteriormente, a dos de los individuos experimentales se les administró estimulación mecánica por vibración mediante un clavo intramedular bloqueado diseñado en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Al tercer individuo experimental se le colocó un clavo bloqueado estándar y se utilizó como grupo control.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en las instalaciones del bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación, México; y fueron aprobados por la Comisión Interna para el Cuidado de los Animales de Experimentación (SICUAE) de la FMVZ-UNAM.

2. Inducción del proceso de falta de unión por medio de un modelo de defecto segmental óseo no crítico

2.1 Procedimiento Anestésico

Previo a la inducción de la anestesia, los animales se mantuvieron en ayuno de sólidos por 36 horas y de líquidos por 8 a 12 horas. Para la anestesia de los animales, se colocaron catéteres intravenosos en ambas venas cefálicas y se realizó la inducción anestésica con propofol (4 mg/kg IV). La vía aérea se mantuvo permeable mediante la colocación de una sonda endotraqueal con globo, de 12 mm de diámetro externo y 56 cm de largo. La anestesia se mantuvo mediante la inhalación de halotano, a una concentración entre el 2 y el 3%.

2.2 Procedimiento Quirúrgico

El animal se colocó en decúbito lateral izquierdo y el miembro pélvico izquierdo se preparó de manera aséptica para cirugía. Para determinar el sitio de osteotomía en el tercio distal de la tibia, se midió la longitud de esta desde la porción más

proximal de la cresta tibial a la más distal del maléolo medial, dividiéndola en tres regiones de la misma longitud. En la región comprendida entre los dos últimos tercios se hizo una incisión de aproximadamente 7 cm en piel y tejido subcutáneo de la cara medial de la tibia. Posteriormente, para exponer los músculos tibial craneal y flexor digital medial se incidió y elevó la fascia crural sobre la cara medial del hueso. Con el uso de un elevador de periostio se desinsertaron los músculos para exponer la totalidad de la circunferencia ósea.

El modelo de falta de unión se preparó, mediante el uso de una sierra de Lis, una osteotomía de diámetro completo en la zona comprendida entre el tercio medio y distal del cuerpo de la tibia, humedeciendo de forma continua con solución salina fisiológica estéril para evitar la necrosis térmica del hueso. Desde cada borde óseo de la osteotomía, hasta una longitud equivalente al valor del diámetro del cuerpo tibial, se elevó y retiró el periostio del diámetro completo de la tibia. Mediante distracción se estableció una línea de fractura de 5 mm de separación entre los segmentos óseos y se colocó de manera temporal una placa de aluminio de 5 mm de ancho para mantener la separación establecida al colocar el sistema de fijación.

A continuación se realizó un abordaje a la articulación de la rodilla mediante una incisión curva en piel y tejido subcutáneo de la región parapatelar medial, abarcando desde la inserción del ligamento patelar hasta 4 cm por encima de la patela. Enseguida se incidió la fascia lata a lo largo del borde craneal del bíceps femoral, mientras que la fascia retinacular lateral de la rodilla fue incidida de forma paralela a la patela y al ligamento patelar. Finalmente, se incidió la cápsula articular. Con la articulación extendida se luxó lateralmente la patela y se retrajo el cojinete adiposo para lograr una exposición adecuada de la porción craneal de la meseta tibial.

Una vez realizada la artrotomía de la rodilla, para ampliar el canal medular y comunicarlo con la articulación, se utilizó una broca de 9 mm de diámetro de forma retrograda para perforar la meseta tibial. Posteriormente, a través de la articulación de la rodilla, se colocó de forma normógrada en el canal medular de la tibia, un clavo bloqueado de 9 mm de diámetro con dos orificios de 4.5 mm en cada extremo del implante. Enseguida el clavo se acopló a la guía de fijación, y con la rodilla en hiperflexión, se introdujo a través de la perforación en la meseta tibial y se desplazó distalmente por el canal medular hasta visualizarlo en el borde proximal de la osteotomía. Para la coaptación de la fractura, y mantener la línea de fractura, mientras se fijaba el implante, primero se colocó una placa de aluminio y después se bloquearon todos los orificios del clavo con tornillos 4.5, verificándose su posición correcta mediante el uso de un fluoroscopio portátil.

Cuando la osteotomía se estabilizó, se retiró la placa espaciadora de aluminio y se colocó un disco de silicón biocompatible de 5 mm de grosor, cuya función fue simular la interferencia de tejido blando en la línea fractura.

Finalmente, se procedió al cierre de la artrotomía y del abordaje al tercio distal de tibia empleando para ello material de sutura absorbible. Se colocó un vendaje de Robert-Jones para evitar edema e inflamación de la zona.

La utilización de este modelo demostró generar un proceso de falta de unión en un periodo de 8 semanas.⁹⁷

3. Tratamiento de la falta de unión

3.1 Tratamiento quirúrgico

Una vez que se determinó como establecido el proceso de falta de unión, a las 8 semanas, se administró el tratamiento aceptado como estándar para el manejo de la falta de unión a todos los animales experimentales. Este consistió en resección del tejido dentro de la línea de fractura, aposición de los bordes óseos y estabilización de la fractura. En uno de los animales (control) se colocó un clavo bloqueado estándar de 9 mm de diámetro con dos orificios para tornillos de 4.5 mm en cada extremo; en los otros dos animales se colocó un clavo bloqueado de 9 mm de diámetro con un dispositivo interno para generar vibración.

3.2 Estimulación mecánica

1. Características del clavo

Se utilizó un prototipo de clavo bloqueado, fabricado con acero quirúrgico 316LS. EL implante se construyó con una cuerda interna en el extremo proximal para acoplarse a la guía de inserción y con dos orificios de bloqueo en cada extremo. La geometría del clavo fue recta a lo largo de todo su eje longitudinal y con un diámetro externo de 9 mm e interno de 7 mm. En su interior se insertó un dispositivo electromecánico (7.0 x 31 mm) el cual fue energizado por una fuente de poder externa (Tektronix PS 280). El clavo puede producir una aceleración controlada de 0.35 – 10 g en un rango de frecuencia de 10 – 150 Hz.

2. Características del tratamiento

Se permitió que los animales se recuperaran, durante una semana, del procedimiento quirúrgico estándar para iniciar el tratamiento de la falta de unión. En el día 8 posterior a la lesión, se inició la estimulación mecánica con el clavo percutor. Dicha estimulación se administró una vez al día por periodos de 20 minutos continuos. El estímulo se administró por un periodo total de 12 semanas en uno de los animales (EM12) y por 3 semanas en el otro (EM3). Los animales fueron mantenidos en evaluación por un periodo total de 12 semanas.

4. Evaluación

4.1 Examen ortopédico

A lo largo del tratamiento, se realizó un examen clínico ortopédico cada semana para seguir la evolución de los animales y detectar cualquier complicación con el procedimiento quirúrgico.

4.2 Radiográfica

Para evaluar el proceso de reparación ósea y su respuesta al tratamiento con estimulación mecánica, se realizaron estudios radiográficos de la tibia, cada dos semanas, después de realizado el proceso y hasta cumplir un periodo de 12 semanas de evolución.

4.3 Análisis del tipo de tejido presente en la zona de falta de unión

Al finalizar el periodo de evaluación de 12 semanas, se abordó quirúrgicamente el sitio de falta de unión y se obtuvieron biopsias tanto del tejido formado dentro de la línea de fractura como de los bordes óseos.

La identificación de cada muestra se realizó de acuerdo a la zona de donde se obtuvo, las cuales fueron las siguientes:

1. Corteza craneal, caudal, medial o lateral (proximal y distal)
2. Tejido de la línea de fractura (craneal, caudal, medial o lateral)

Las muestras se fijaron en formol al 10%(v/v) y el tejido óseo se descalcificó con ácido clorhídrico. Las muestras se incluyeron en parafina y para evaluar el tipo de tejido presente en los cortes obtenidos, éstos se tiñeron con HE y con la técnica tricrómica de Masson. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss). Para realizar la medición del área correspondiente a cada tejido, el

material procesado mediante la tinción tricrómica de Masson se digitalizó mediante el uso de un microscopio óptico adaptado con cámara digital Motic BS Profesional Series, empleando el Software de análisis de imagen Sigma Scan Pro 5 (Jandel Scientific).

4.4 Expresión de las BMP's en el sitio de falta de unión

1. Descalcificación

Las muestras obtenidas se conservaron en paraformaldehído al 4% (p/v) y después fueron colocadas en EDTA al 10% (p/v). Por cada 100 ml de aguadestilada se utilizaron 14.5 gr de EDTA, 1.25 gr de hidróxido de sodio y 15 ml de glicerol. Las muestras se mantuvieron a 5°C y la solución descalcificadora se cambió cada tercer día, hasta que se alcanzó una descalcificación total de las muestras en un periodo tres semanas en promedio. Una vez descalcificadas las muestras, se lavaron en PBS y se incluyeron en parafina.

2. Inmunodetección

Se establecieron dos protocolos para la detección de la expresión de las BMP's:

2.1 Inmunofluorescencia

La detección de la proteína BMP-2 y 4 se realizó empleando el anticuerpo anti BMP-2 y BMP-4 de ratón (Chemicon Internacional, USA) en una dilución 1:5 y teniendo como control positivo cortes de embrión de ratón de 13-15 días de gestación. Los detalles del protocolo se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Protocolo de inmunofluorescencia (Anticuerpo Chemicon Anti BMP-4)				
Día 1				
Proceso	Equipo o reactivo	Temperatura	Tiempo (min)	Especificaciones
1) DESPARAFINACIÓN				
a)	Estufa	64°C	120	
b)	xilol I		10	
c)	xilol II		10	
d)	Et OH absoluto		10	
e)	Et OH 96%(v/v)		10	
f)	Et OH 90%(v/v)		10	
g)	Et OH 80%(v/v)		10	
h)	Et OH 70%(v/v)		10	
i)	H2O destilada		10	
2) Recuperación antigénica	Autoclave	115-120°C	15	Amortiguador: citrato de Na 0.01 M; pH 6 Colocar vasos de precipitados con buffer y muestras, encender autoclave. Cuando alcance la temperatura calentar por 15 min y apagar
3) Enfriado		Ambiente	30	Abrir autoclave y sacar muestras a enfriar por inmersión de vasos en agua a temperatura ambiente. Cambiar amortiguador por agua destilada a temperatura ambiente
4) Lavado	PBS		2,5 3 s	4 lavados "por inmersión", retirar amortiguador con aspiración 2 lavados por decantación
5) Bloqueo	BSA 10%(p/v) en PBS	Ambiente	120	Colocar en cámara húmeda
6) Lavado	PBS		2,5 3 s	4 lavados "por inmersión", retirar amortiguador con aspiración 2 lavados por decantación
7) Incubación Anticuerpo Primario		4°C	Toda la noche	Colocar en cámara húmeda y guardar en refrigerador toda la noche. Dilución 1:5

Tabla 1. Protocolo de inmunofluorescencia (Anticuerpo Chemicon Anti BMP-4) Continuación.					
Día 2					
8)	Lavado	PBS TWEEN 20 0.1% (v/v) PBS PBS	2,5 2,5 3 s	4 lavados "por inmersión", retirar amortiguador por aspiración 2 lavados "por inmersión", retirar amortiguador por aspiración 2 lavados por decantación	
9)	Bloqueo	BSA 10%(p/v)	Ambiente	120	Colocar en cámara húmeda
10)	Lavado	PBS TWEEN 20 0.1% (v/v) PBS PBS	2,5 2,5 3 s	4 lavados "por inmersión", retirar amortiguador por aspiración 2 lavados "por inmersión", retirar amortiguador por aspiración 2 lavados por decantación	
11)	Incubación anticuerpo secundario	Antiratónbiotinilado	Ambiente	60	Cámara húmeda Dilución: 1/400 En BSA al 5%(p/v)
12)	Lavado	PBS TWEEN 20 0.1% (v/v) PBS PBS	2,5 2,5 3 s	4 lavados "por inmersión", retirar amortiguador por aspiración 2 lavados "por inmersión", retirar amortiguador por aspiración 2 lavados por decantación	
13)	Incubación con fluorocromo	Streptavidina-FITC	Ambiente	30	Mantener en cámara oscura Dilución: 1:1000 en PBS
14)	Lavado	PBS TWEEN 20 0.1% (v/v) PBS PBS	2,5 2,5 3 s	4 lavados "por inmersión", retirar amortiguador por aspiración 2 lavados "por inmersión", retirar amortiguador por aspiración 2 lavados por decantación Mantener en cámara oscura	
15)	Montaje	Medio de montaje DAKO			Mantener en cámara oscura

2.2 Inmunohistoquímica

La detección de la proteína BMP-4 se realizó mediante la técnica de la peroxidasa, empleando el anticuerpo Anti BMP-4 (Santa Cruz Biotechnologies, SC-6896) en una dilución 1:50 y teniendo como control positivo cortes de embrión de ratón de 13-15 días de gestación. El protocolo se describe a continuación:

Inmunohistoquímica en parafina

A) Identificar las laminillas con lápiz de punta diamante.

I. Desparafinación

1. Incubar las laminillas a 57-60°C en durante 1 hora
2. Sumergir las laminillas en xilol durante 10 min.

II.- Hidratación: Sumergir las laminillas en concentraciones descendentes de alcohol durante 10 minutos en cada paso.

III Recuperación antigénica

Reactivo: Antigen Retrieval Citra Plus 10X (500 ml) cat. HK080-9K Biogenex. Preparación amortiguador de citratos 1X (DakoCytomation, Target Retrieval Solution). Para recuperación: 10 ml en 100 ml de agua destilada (se puede reusar 3 ó 4 veces).

1.- En un vaso de Coplin con amortiguador de recuperación colocar las laminillas (que la solución cubra las laminillas) y se introducen en baño maría en autoclave casera (20 a 25 lbs de presión/121°C/5min).

2. Se tapa la autoclave y se espera a que inicie la salida de vapor por la válvula, entonces, se coloca el tapón de la válvula y una vez alcanzada la presión se deja durante 5 min y se apaga. Se espera a que se elimine la presión y se deja enfriar durante 20 min. (Se recupera el amortiguador de citratos).

3. Se colocan las laminillas en agua destilada (3 min)

4. Delimitar la zona de la muestra con lápiz marcador (Dako cytomaton Pen) previo secado de la zona con una gasa.

IV. Bloqueo con peróxido de hidrógeno

Se agrega peróxido de hidrógeno al 1% por 10 min y posteriormente se lava con PBS-T.

V. Bloqueo de proteínas

Reactivo: Universal Blocking Reagent 10X. Biogenex cat. HK0855K.

Se prepara una mezcla al 1X (10 ml del reactivo en 100 ml de PBS+Tween-20 o Tritón al 0.1%(v/v). Incubar 10 min, decantar y lavar con PBS Tween-20 tres veces.

VI. Reacción antigénica I.

Preparación de la dilución del anticuerpo. El Anticuerpo primario se diluye en solución diluyente de anticuerpo (DakoCytomation, Antibody Diluyente cat. S0809).

1. Una vez que se decante la solución de lavado, agregar PBS-BSA al 1% al control negativo.

2. A los positivos agregar el Anticuerpo primario e incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente por toda la noche.

Posteriormente:

3. Se realizan 3 lavados con PBS-T

4. Se realizan 3 lavados con TBS-T (50 mM)

VII. Reacción antigénica II. (kit LSAB+Sys-HRP, Dako-Cytomation, cat K0679)

1.- Bloqueo con peróxido de hidrógeno por 10 min.

2.- Lavar 3 veces con PBS-T

3.- Lavar 3 veces con TBS-T

4.- Adicionar 1 gota de link-anticuerpo secundario e incubar 30 min a temperatura ambiente.

5- Lavar 3 veces con PBS-T

6- Lavar 3 veces con TBS-T

7- Adicionar 1 gota de estreptavidina e incubar 30 min a temperatura ambiente.

8- Lavar 3 veces con PBS-T

9- Lavar 3 veces con TBS-T

10- Adicionar el cromógeno (se prepara 10 gotas de diluyente x 1 gota de cromógeno, usar guantes) se adicionan 100µl por laminilla y se incuba por 5 min.

8.- Lavar colectando los desechos en un frasco (Reactivo tóxico)

9.- Colocar en agua destilada para hacer la contra tinción

VIII. Contratinción.

1. Se colocan las laminillas en un vaso de Coplin con hematoxilina, por 20 segundos y se lava con agua destilada.

2. Deshidratar por pase rápido en concentraciones ascendentes de alcohol y al final xilol.

3. Agregar dos gotas de Entellan (medio de montaje Merk)

4. Colocar el cubreobjetos (se limpian previamente, con etanol absoluto) y esperar 2 horas aproximadamente a que se seque para ver al microscopio; para secado completo 24 horas colocados en posición horizontal.

7. RESULTADOS

La técnica quirúrgica en la tibia izquierda para el tratamiento de la falta de unión se llevó a cabo sin complicaciones en los tres borregos en estudio. La evolución clínica se desarrolló sin complicaciones en todos los animales. Los individuos del grupo experimental (EM3 y EM12) no mostraron ningún signo de dolor o incomodidad al poner en marcha el dispositivo de vibración del clavo bloqueado para administrar la estimulación mecánica.

7.1 Evaluación ortopédica

1. Examen ortopédico en dinámica

Desde el primer día, posterior a la cirugía, hasta el término de la primera semana los animales presentaron claudicación grado I. Durante la segunda semana los animales dejaron de presentar anomalías en la marcha, manteniéndose así hasta concluir el periodo de evaluación de 12 semanas.

2. Examen ortopédico a la manipulación

Los animales mostraron dolor ligero a la manipulación en la zona de la falta de unión durante la primera semana, por lo que se dio tratamiento con analgésicos (butorfanol 0.2 mg/Kg, cada 12 horas y ketorolaco 100 mg totales, cada 24 horas ambos por cinco días). En el resto del periodo de evaluación los animales no presentaron signos clínicos de dolor.

7.2 Evaluación Radiográfica

Al realizar el estudio radiográfico posquirúrgico, inmediato al desbride del tejido de falta de unión (Figura 3), se observó en los 3 animales que a pesar de que se continuaba observando una línea de fractura, los bordes de la misma estaban en contacto en la cuatro cortezas óseas (Cr, Cd, M y ML). Este mismo estudio mostro que la colocación del clavo bloqueado se realizó de manera adecuada. (Clavo bloqueado estándar en grupo control y clavo bloqueado percutor en los animales experimentales EM3 y EM12).

En el animal experimental EM3 a las 2 semanas de progresión se continuó observando radiográficamente una línea de fractura, sin embargo, se observó la formación de un callo de reparación que comenzaba a poner en contacto los bordes de los segmentos óseos (Figura 4). En la semana 4 de progresión, se observó la mayor formación de callo óseo de reparación y la continuidad en las cuatro cortezas óseas fue prácticamente restablecida, además, ya no se observó la presencia de la línea de fractura (Figura 5). A partir de la semana 6, se hizo evidente una disminución del tamaño del callo, así como un incremento en su mineralización. A las 12 semanas, al finalizar el periodo de evaluación, el callo de reparación estuvo prácticamente mineralizado en su totalidad y en proceso de remodelación (Figura 6; E, F).

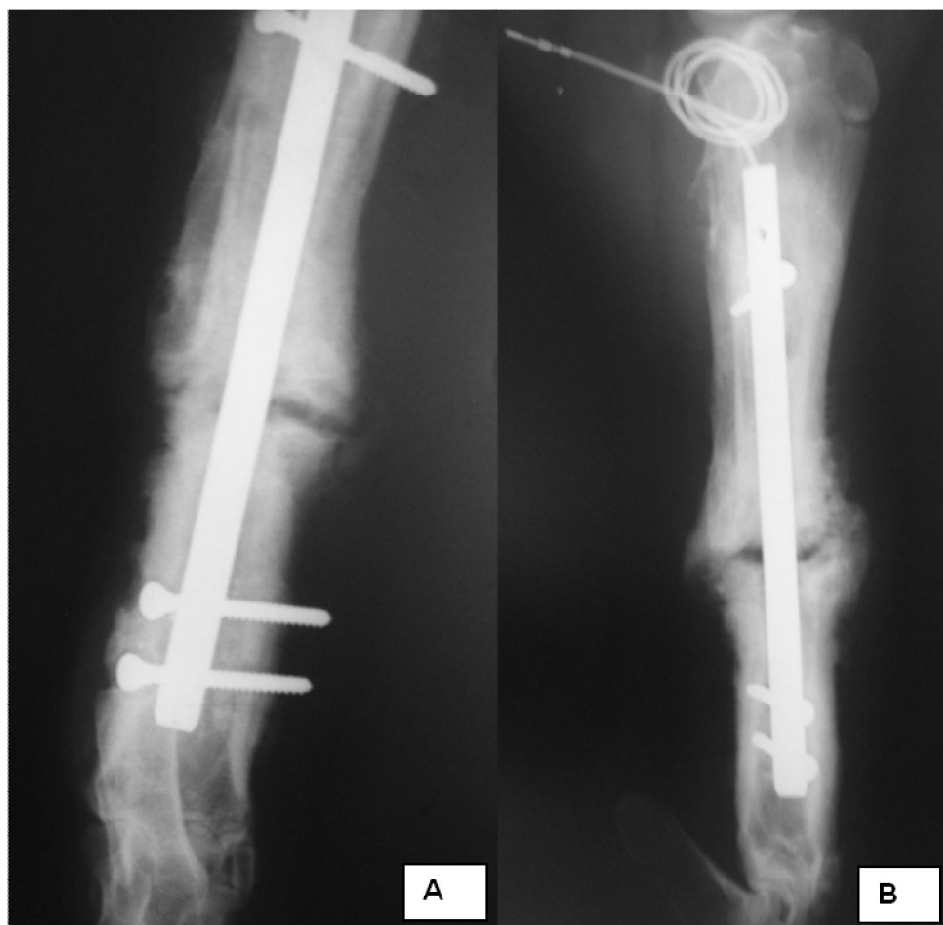


Figura 3.- Radiografías representativas obtenidas en el periodo postquirúrgico inmediato al tratamiento de la falta de unión (desbride de tejido de falta de unión y estabilización). A) Proyección cráneo-caudal. B) Proyección medio-lateral. En ambas proyecciones se observa la aposición de los bordes óseos y la colocación correcta del clavo bloqueado. Se puede observar la persistencia de una línea de fractura entre los segmentos óseos.

Por otra parte, en el animal experimental EM12, se observaron características radiográficas asociadas a un proceso de falta de unión ósea, como son la

persistencia de una línea de fractura y ausencia de callo óseo que pusiera en contacto los bordes óseos. Estas características se mantuvieron desde la primera semana hasta cumplir el periodo de evaluación de 12 semanas. Es importante mencionar que en este grupo, de manera subjetiva, la línea de fractura se observó con claridad en el estudio radiográfico a las 12 semanas de evaluación (Figura 6; C, D).

Finalmente, en el animal control, las características radiográficas asociadas a un proceso de falta de unión ósea, se mantuvieron desde la primera semana hasta cumplir el periodo de evaluación de 12 semanas (Figura 6; A, B).

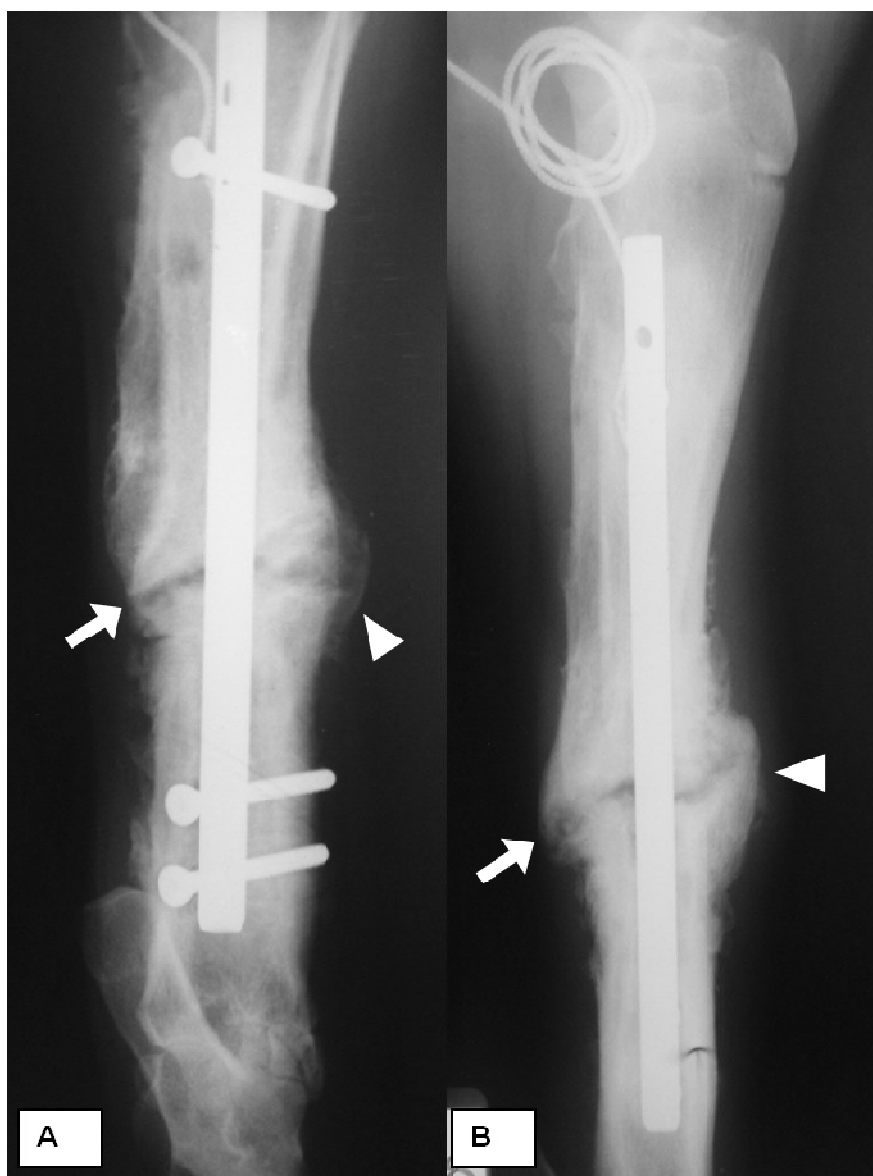


Fig. 4.- Radiografías del animal EM3 obtenidas a las dos semanas después del procedimiento quirúrgico. A) Proyección cráneo-caudal. B) Proyección medio-lateral. En ambas proyecciones se observa la presencia de la línea de fractura (flechas), sin embargo, la formación de callo de reparación ha comenzado a unir los bordes de los segmentos óseos (puntas de flecha).

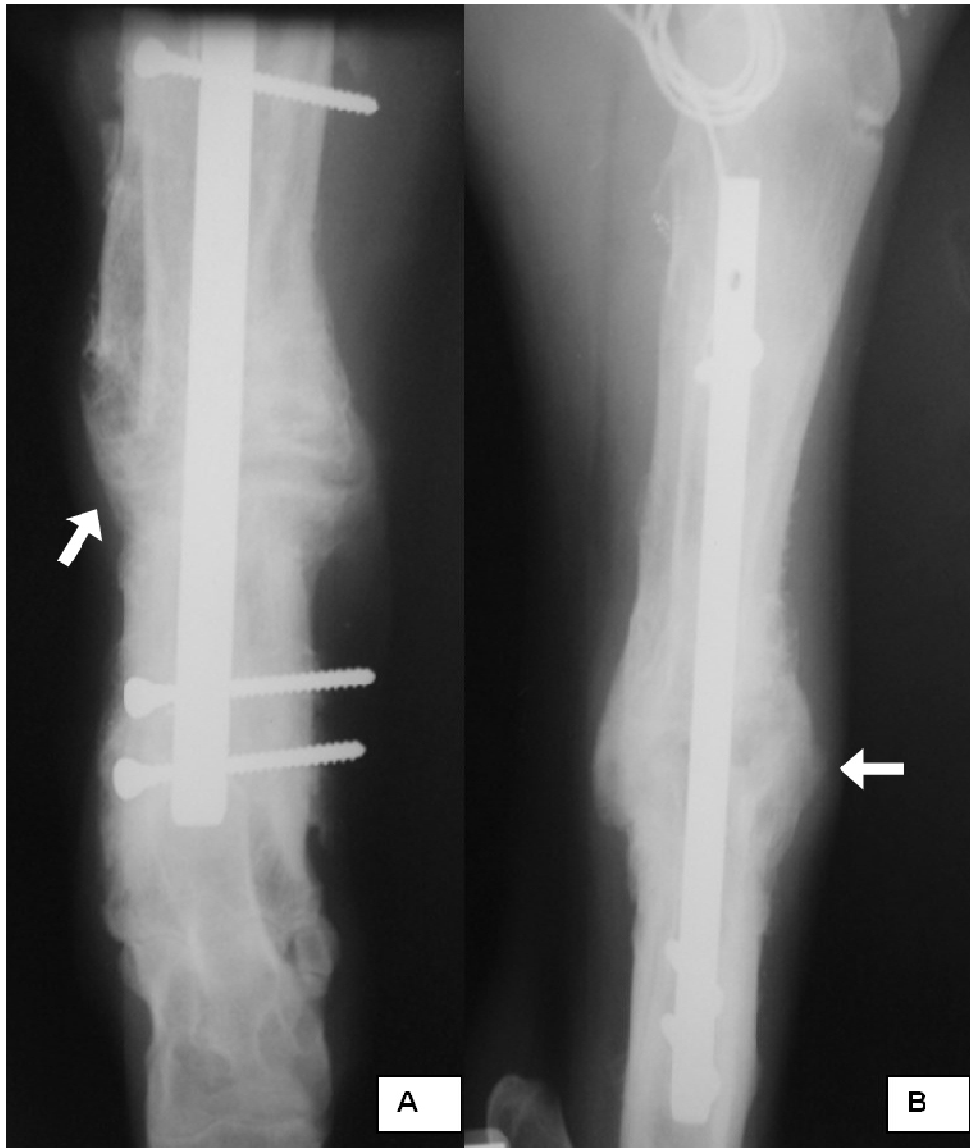


Fig. 5.- Estudio radiográfico del animal EM3 a las cuatro semanas. A) Proyección cráneo-caudal. B) Proyección medio-lateral. En ambas proyecciones se observa el restablecimiento de la continuidad entre las cortezas óseas y ya no se observa la presencia de la línea de fractura (flechas).



Fig. 6.- Radiografías de los animales de experimentación y control a las 12 semanas de evaluación después del proceso quirúrgico. Se observa la persistencia de un proceso de falta de unión tanto en el animal control (A, B) como en el animal EM12 (C, D), siendo más evidente en este último la línea de fractura. En el animal EM3 (E, F) se observa la reparación de la fractura en fase de remodelación.

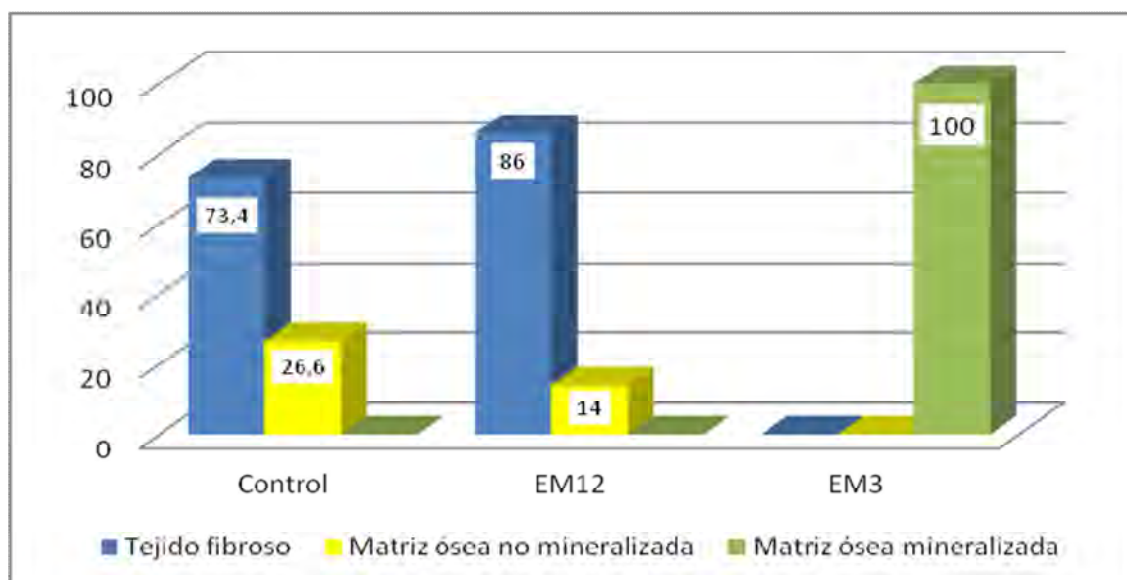
7.3 Análisis del tipo de tejido presente en la zona de falta de unión.

En el momento de retirar los tornillos distales del clavo bloqueado, durante la toma de biopsias, se observó que el segmento distal de la tibia operada presentaba movilidad, tanto en el animal control como en el animal EM12. En contraste, el animal EM3 no presentó ninguna evidencia de movimiento.

El análisis histológico, tanto del animal control como del animal experimental EM12, mostró que el tejido predominante fue el tejido fibroso (73.4% y 86%, respectivamente), además, se observaron pequeños porcentajes de matriz ósea no mineralizada (26.6% y 14%, respectivamente). Por otra parte, en el animal experimental EM3, la totalidad del tejido observado correspondió a matriz ósea mineralizada (100%). Los resultados se muestran en la tabla 2 y gráfica 1.

Tabla 2. Área tisular total y por tipo de tejido observado en el tratamiento de la falta de unión con estimulación mecánica (EM12 y EM3) y en el control.

Animal	Superficie tisular total (Píxeles)	Tejido fibroso		Matriz ósea no mineralizada		Matriz ósea mineralizada	
		Píxeles	%	Píxeles	%	Píxeles	%
Control	1536293	55664028	73,4	20182056	26,6		0
EM12	1649944	231747	86	1418197	14		0
EM3	1582784	0	0	0	0	1582784	100



Gráfica 1.- Porcentaje de los diferentes tejidos observados en el tratamiento de la falta de unión mediante estimulación mecánica por vibración (EM12 y EM3) y en el control.

7. 4 Expresión de las BMP's

1. Inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica

En la figura 7 se muestra el control positivo para las BMPs, en el cual se emplearon cortes de embrión de ratón de 13-15 días de gestación tanto en inmunofluorescencia como en inmunohistoquímica.

En el animal experimental EM3 los osteocitos y osteoblastos observados no mostraron una tinción positiva en ellos; tampoco se observó tinción específica en la matriz ósea. En el animal experimental EM12 y el control tampoco se observó tinción específica ni en los fibroblastos ni en la matriz extracelular (datos no mostrados).

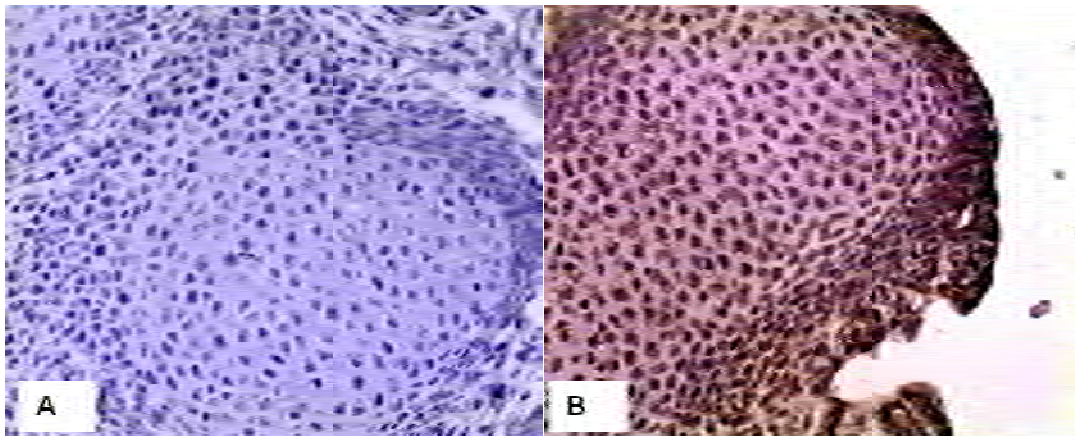


Fig. 7.- Tinción por inmunohistoquímica de BMP4. Embrión de ratón de 13.5 días de gestación. A) Control negativo. B) Control positivo con Ac. Anti BMP-4 (Santa Cruz Biotechnologies, SC-6896) Dilución 1/50.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el tratamiento de la falta de unión ósea, que es una complicación del proceso de reparación ósea, se han propuesto diversas estrategias que se clasifican de manera general como métodos biológicos, físicos o quirúrgicos. De éstos, la estimulación mecánica se encuentra en la categoría de los métodos físicos. En el presente trabajo, por medio de la aplicación de un estímulo mecánico, se logró estimular la reparación ósea en un proceso de falta de unión inducido en un modelo de defecto segmental no crítico. Dicho estímulo mecánico resultó en el desarrollo de un callo mineralizado y la reparación de la fractura con falta de unión en un periodo de 12 semanas.

Entre los métodos biológicos, el uso de un injerto autólogo de hueso esponjoso, se considera como el estándar de oro para el tratamiento de la falta de unión. En éste, la reparación se obtiene hasta después de 7 meses en promedio; además una de sus desventajas consiste en que su uso se relaciona con una gran cantidad de complicaciones, siendo la más común la presentación de dolor en el sitio de obtención del injerto hasta siete años después del procedimiento⁹⁸. Por otra parte, con el uso de BMPs, la reparación de fracturas con falta de unión se ha logrado en periodos de 5.5 a 9 meses, sin embargo, su uso se encuentra limitado por los altos costos de su producción⁹⁹. Entre los métodos físicos se han estudiado los efectos del uso del ultrasonido de baja frecuencia y de la estimulación con pulsos electromagnéticos, observando tiempos de reparación de la falta de unión en periodos de 11¹⁰⁰ y 10.5¹⁰¹ meses en promedio, respectivamente. Con lo que respecta a los métodos quirúrgicos, se han obtenido tiempos de reparación de 3.5 y 4.2 meses cuando el sistema de fijación utilizado inicialmente es sustituido por la colocación de un clavo intramedular bloqueado^{102, 103}. En contraste técnicas más complejas como la osteogénesis por distracción, han permitido la reparación ósea en un periodo de 10 meses, aunque es importante mencionar que esta técnica está relacionada con un gran número de complicaciones como dolor crónico y artrosis.¹⁰⁴

Hasta la fecha no se tiene conocimiento de trabajo previo relacionado con el uso de la estimulación mecánica por vibración para el tratamiento de la falta de unión, modalidad empleada en el presente estudio. Al comparar nuestro tratamiento con las modalidades biológicas, físicas y quirúrgicas mencionadas, hemos demostrado la reparación completa de la fractura en un periodo de tiempo de tres meses, resultado menor al observado en otros tipos de tratamiento. Aunque la administración del estímulo mecánico en nuestro modelo implica la colocación de un clavo bloqueado con el procedimiento quirúrgico asociado, el método no representa una mayor manipulación quirúrgica si se compara con otros tratamientos, ya que la mayoría de los protocolos establecidos combinan el cambio en el sistema de fijación junto con alguna modalidad de tratamiento físico o biológico.⁹⁸⁻¹⁰³

Se sabe que el estrés mecánico cíclico es un factor esencial en el desarrollo del esqueleto y en la remodelación ósea; y que su presencia estimula la formación de hueso, mientras que su ausencia resulta en resorción ósea.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶

De igual forma, la reparación ósea es un fenómeno biomecánico, en donde la morfología del hueso puede ser regenerada aún después de una fractura multifragmentaria, y en la que el proceso de reparación puede continuar conforme la carga mecánica se incrementa. Por esta razón, existen trabajos donde se ha demostrado que el microambiente mecánico es un potente factor extracelular que regula la actividad celular; se ha observado que la carga aplicada al hueso es un factor clave en la regulación del metabolismo que controla la remodelación, crecimiento y mineralización ósea.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸ En estudios *in vitro*, también se ha encontrado, que a nivel celular los estímulos mecánicos tienen una función clave en la regulación de la actividad osteogénica, tanto de los osteoblastos y de los osteocitos.^{109,110}

Adicionalmente, trabajos recientes demostraron que la estimulación mecánica también desempeña una función importante en la diferenciación celular, puesto que su aplicación a células mesenquimales resulta en la transcripción de marcadores osteoblásticos.^{111,112} Se ha visto que las células estromales de la médula ósea de rata responden a señales mecánicas; cuando éstas son aisladas y sometidas a un modelo de privación de carga esquelética, se observa una disminución significativa en su capacidad de proliferación y diferenciación¹¹³⁻¹¹⁵ pero al restablecer la carga mecánica al hueso, se corrige de manera parcial el déficit en proliferación y diferenciación.¹¹⁶

Estos resultados permitieron postular la hipótesis de que tanto las células mesenquimales como las estromales de la médula ósea son capaces de responder a señales mecánicas en una forma similar a como lo hacen los osteoblastos y osteocitos. Por esto, este tipo de estímulo podría ser utilizado en la optimización de los procesos terapéuticos.¹¹⁷⁻¹²¹ En diversos trabajos experimentales *in vivo*, se demostró el efecto de la carga mecánica sobre la diferenciación de los tejidos óseos. Goodship y Kenwright (1985) observaron que la estimulación temprana mediante ciclos diarios de micromovimientos estimula la formación del callo periostial, incrementando la tasa de reparación ósea⁶⁰. De manera similar, se obtuvieron tiempos menores en la reparación de fracturas cuando el movimiento interfragmentario se controló mediante la dinamización de un fijador externo.^{122, 123}

Sin embargo, en los modelos mencionados no se pudieron determinar los efectos específicos de la carga mecánica sobre las células y en consecuencia, es difícil generalizar los resultados de la mecano regulación sobre la diferenciación tisular. Por tal razón, se ha propuesto una teoría para explicar la diferenciación de los tejidos a través de la mecano regulación, basada en dos estímulos biofísicos: la tensión aplicada a la matriz extracelular y el flujo del líquido intersticial. Esta teoría postula que la presión del fluido extracelular incrementa el estrés biomecánico y la

deformación de las células por encima del rango normal de deformación al que son sometidas por la matriz de colágena.¹²⁴

En general, se sugiere que durante el proceso de mecano transducción, en una primera etapa se generan señales químicas a partir de un estímulo mecánico y en una segunda, las señales químicas son convertidas en respuestas biológicas. Por ejemplo, se ha visto que cuando el cartílago es estimulado, las señales mecánicas generadas por la deformación cíclica de la matriz inducen en los condrocitos la expresión del gen Indian hedgehog (Ihh) por encima de la activación de otros genes. Posteriormente, Ihh induce la expresión de las BMPs que participan en la estimulación del crecimiento del cartílago si las condiciones ambientales son adecuadas.¹²⁵

Se ha demostrado que los estímulos mecánicos externos son transducidos a las células a través de la deformación de la matriz extracelular, sin embargo, las vías de señalización que participan continúan sin determinarse¹²⁶. Recientemente se demostró que entre los factores moleculares involucrados en la regulación de la reparación de las fracturas se encuentran morfógenos y factores de crecimiento como las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento fibroblastoide (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y la prostaglandina E2.¹²⁷⁻¹²⁹ Si bien el mecanismo molecular que regula la respuesta anabólica de los osteoblastos ante la estimulación mecánica no está determinado, se ha sugerido que las vías de señalización de las BMPs juegan un papel esencial tanto en la regulación de la osteogénesis como en la remodelación ósea, mediante la modulación de la proliferación y diferenciación de los osteoblastos.^{130, 131.}

Con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre el mecanismo de mecanotransducción en respuesta a la carga mecánica dinámica, diversos estudios in vivo reportan la alteración en la expresión de genes relacionados con la síntesis de prostaglandina E2, de la diferenciación osteoblástica (BMP2) y la mineralización.^{132, 133} Otros trabajos demostraron un incremento en la expresión de BMPs como respuesta a la estimulación mecánica por tensión o por cargas cíclicas.^{125, 134} De igual forma, se observó que la aplicación de compresión dinámica a osteoblastos en cultivo, induce la fosforilación de las proteínas SMAD 1, 5 y 8 (vía BMPs); promoviendo la inducción de genes osteogénicos. Adicionalmente, en estos estudios no se observó la fosforilación de la SMAD 2 (vía TGF- β), la cual es considerada como un inhibidor de la osteogénesis pues suprime la diferenciación osteoblástica¹³⁵. Estos hallazgos refuerzan la teoría de que la estimulación mecánica podría ser mediada por la vía de señalización de las BMPs activando los genes osteogénicos en los osteoblastos. De manera contraria, en osteoblastos aislados de una cepa de ratón mutante para BMP5, se observó que las células no son capaces de responder a la estimulación mecánica de manera normal, lo que resalta una vez más el papel determinante de las BMPs en la transducción de la señal mecánica.¹³⁶

Los trabajos mencionados previamente confirman que la expresión de BMPs durante la reparación ósea es un buen indicador de los efectos de la estimulación mecánica sobre el proceso. En nuestro trabajo no se observó la expresión de las BMPs 2/4 en ninguno de los animales evaluados, lo cual posiblemente podría explicarse a que la expresión de estas proteínas se realiza tempranamente durante el proceso de reparación, lo que nos lleva a la conclusión de que el tiempo de muestreo elegido en nuestro estudio no fue el adecuado (ya que este fue en la etapa de remodelación ósea). Es decir, que en dicha etapa posiblemente las proteínas ya habían ejercido su efecto y por ende, no se encontraban presentes o que su cantidad era tan baja para ser detectada por el método empleado para su detección. Esto lo suponemos con base en resultados que sugieren que la expresión de éstas ocurre entre la primera y sexta semanas posteriores al procedimiento quirúrgico de estabilización¹³⁷ y que disminuyen durante las fases avanzadas de la reparación ósea¹³⁸. Posiblemente, estas proteínas se expresaron de manera particular en el animal EM3, puesto que la reparación ósea ocurrió de manera normal.

En lo que respecta al animal EM12, en el que persistió la falta de unión, suponemos que las proteínas se encontraban en niveles muy bajos para ser detectadas. Si bien existen estudios que reportan su expresión en procesos de falta de unión¹³⁹, su presencia no se ha reportado en situaciones de estimulación mecánica continua. Adicionalmente, se ha observado que cuando se aplica estimulación mecánica en fases avanzadas, la expresión de las BMPs 2/4 disminuye mientras que BMP3 aumenta. De manera particular, BMP3 antagoniza los efectos osteoinductivos de la BMP2,^{57, 140} lo que podría explicar la falta de inducción de osteogénesis en el animal EM12 y pone de manifiesto la importancia de evaluar la expresión de estas proteínas en estudios posteriores.

Por otra parte, también se ha reportado que las señales mecánicas activan otras vías de señalización en los osteoblastos, como la vía del IGF-I y de Wnt, por lo que no se descarta la posibilidad de que los genes activados por las SMADs en respuesta a BMPs puedan activarse por otras vías^{135, 141}, las cuales deberán ser consideradas en trabajos posteriores.

En otro aspecto, la estimulación mecánica es esencial para dirigir la diferenciación y arquitectura tisular durante el desarrollo del tejido conectivo, por lo que el ambiente mecánico puede determinar entre la formación de cartílago, hueso o tejido fibroso, además de regular la arquitectura de estos tejidos.^{142, 143} Otros trabajos enfocados en entender la manera en que la estimulación mecánica mejora la reparación ósea de las fracturas, han encontrado la formación de un callo de reparación más abundante o la mineralización y formación de hueso maduro en periodos más cortos de tiempo. Así, se ha sugerido que el ambiente mecánico también promueve la formación de otros tejidos. Por ejemplo, Kristy *et al* observaron que la estimulación mecánica por movimientos de flexión favorece de manera preferencial la formación de cartílago⁵⁷. Un resultado similar fue descrito por Cullinane *et al* quienes indujeron la formación de cartílago a través de la estimulación mecánica por flexión, en un modelo de fractura simple.¹⁴² De manera

similar, otros autores demostraron que la estimulación mecánica sin la adición de factores de crecimiento específicos, induce de manera predominante la diferenciación de células mesenquimales hacia ligamento.^{140, 144} Todo esto sugiere que el tipo de carga mecánica aplicada regula de manera selectiva la inducción de la osteogenesis, la condrogenesis o la formación de otros tejidos.⁵⁷

Estos resultados hacen evidente que falta mucho trabajo de investigación para determinar el mecanismo de acción de la estimulación mecánica sobre las células del tejido óseo, así como las características ideales de frecuencia, intensidad y duración del estímulo para inducir la diferenciación de tejido óseo. Nuestros resultados demostraron que se puede inducir la osteogénesis en un proceso de falta de unión, mediante la estimulación mecánica por vibración durante las primeras semanas posteriores al procedimiento quirúrgico para el cambio de fijación y desbridación del tejido. Además, demostramos que cuando el estímulo se administra por tiempos prolongados (12 semanas), el resultado es contrario a lo esperado, es decir, la osteogénesis se inhibe y se favorece la persistencia en la diferenciación hacia la formación de tejido fibroso.

Entre los aspectos que deben analizarse en trabajos futuros se encuentran las características del ambiente mecánico, ya que éstas afectan de manera directa el curso posterior de la reparación ósea. Entre dichas características se pueden mencionar a la magnitud de la carga aplicada a través del sitio de fractura, el tamaño del espacio de fractura, el movimiento relativo de la fractura y su consecuente tensión, así como el momento de la reparación ósea en que se aplica la estimulación.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Se ha señalado que un incremento en la duración de la estimulación mecánica no necesariamente lleva a un incremento proporcional en la masa ósea, sugiriendo que la sensibilidad celular a los estímulos mecánicos disminuye rápidamente una vez que el umbral inicial para una respuesta ha sido superado^{148, 149}. Por ejemplo, en ratas, la actividad física por medio de saltos promovió la hipertrofia del fémur cuando se aplicó con una frecuencia específica; no obstante, cuando ésta se incrementó no se observó un incremento adicional en la masa ósea¹⁵⁰.

En otro estudio, un estímulo mecánico cíclico por medio de micromovimientos interfragmentarios indujo la formación de una gran cantidad de callo periosteal, sin embargo, cuando el mismo estímulo se aplicó en etapas más avanzadas de la reparación ósea, el progreso se inhibió de manera significativa. En este caso, los autores asocian el beneficio de aplicar la estimulación en etapas tempranas a las características viscoelásticas de los tejidos conectivos presentes en el callo endocondral, donde se presenta una mayor deformación de los fragmentos de la fractura y por lo tanto una respuesta biológica mayor¹⁵¹. Por otro lado, empleando como modelo a la rata, Weaver y colaboradores observaron que el tiempo de aplicación de un estímulo mecánico durante la reparación de fracturas tiene efectos determinantes en la progresión del callo (características morfológicas y mecánicas), así cuando el estímulo se administró en los primeros días después de establecida la fractura (fase de inflamación), o bien, durante las fases tardías del proceso, el callo óseo mostró bajas cantidades de tejido mineralizado, mientras

que cuando el estímulo se aplicó en el tiempo correspondiente a la fase de reparación (10 días), el callo que se desarrolló estuvo compuesto predominantemente por tejido mineralizado de gran resistencia a la torsión.¹⁵²

Estos datos sugieren que la estimulación mecánica podría no aportar beneficio cuando se aplica durante la fase inicial de la reparación ósea, ya que en este momento la irrigación sanguínea es un factor importante para el éxito de la reparación, siendo necesario que la neovascularización progrese en el sitio de fractura antes de que cualquier carga mecánica sea aplicada^{153, 154}. En consecuencia, el movimiento temprano en el sitio de fractura podría causar que se rompan de manera constante los capilares de neoformación, necesarios para favorecer al tejido óseo, por lo que al ocurrir esto, se promueve la formación de fibrocartílago que requiere menos vascularización¹⁵⁵. Por esta razón, el permitir que se formen vasos sanguíneos en el sitio de fractura antes de aplicar el estímulo mecánico podría ser de beneficio para un mejor desarrollo posterior del proceso de reparación ósea.¹⁵⁶

Otra razón para iniciar el estímulo mecánico después de la fase de inflamación, consiste en que la zona de fractura ya ha sido poblada por células como los condrocitos, capaces de responder a estímulos mecánicos mediante un aumento en la formación de hueso en el sitio de reparación¹⁵⁷. En cuanto al momento de aplicación del estímulo mecánico, también se ha observado que su administración en fases avanzadas de la reparación, tiene un efecto negativo sobre la mineralización y resistencia a la carga mecánica.¹⁵²

Nuestros resultados sugieren que el momento más adecuado para inducir la osteogénesis en un proceso de falta de unión, tratado con estimulación mecánica, corresponde al lapso de una semana posterior al procedimiento quirúrgico para el cambio de fijación y desbride del tejido. Asimismo, cuando la estimulación se mantiene por tres semanas tiene un efecto más beneficioso. Tiempos de estimulación posteriores, durante fases avanzadas de la reparación ósea (12 semanas continuas), parecen inhibir la osteogénesis y promover la persistencia del proceso de falta de unión.

Si bien se ha mostrado el efecto positivo de la estimulación mecánica en la reparación de fracturas, hasta donde tenemos conocimiento, no existe información sobre su efecto en un proceso de falta de unión; sin embargo, se sabe que el tejido presente en un proceso de falta de unión está bien vascularizado¹⁵⁸ y que las células presentes son capaces de diferenciarse hacia condrocitos y osteocitos¹⁵⁹. Nuestros resultados sugieren que los tejidos óseos en un proceso de falta de unión son capaces de responder a un estímulo mecánico de la misma manera que lo hacen en la remodelación o en una fractura reciente, teniendo como resultado final la regeneración ósea.

Entre las limitantes de nuestro trabajo se encuentra el hecho de que la reparación ósea se evaluó únicamente en una fase avanzada (callo óseo-remodelación). Aunque este periodo se eligió de manera arbitraria, la decisión se tomó con el

objetivo específico de analizar las diferencias en la fase final de la reparación ósea como resultado de la estimulación mecánica por vibración. Debido a que no pudimos detectar la expresión de las BMPs, es importante considerar la evaluación de estas proteínas durante las fases tempranas de la reparación ósea, y determinar si presentan el mismo comportamiento que se observa en la reparación de una fractura reciente.

Finalmente, a pesar que es importante tomar en consideración que el tamaño de muestra es pequeño, los resultados son relevantes y permiten establecer antecedentes sobre los efectos positivos de la estimulación mecánica en la inducción de la ontogénesis en un proceso de falta de unión. Asimismo permiten proponer algunas de las características que dicho estímulo debe cumplir (tiempo, frecuencia y amplitud). El establecimiento de estos parámetros del estímulo mecánico permitirá desarrollar estudios posteriores con una muestra de tamaño significativo y que permitan confirmar datos obtenidos y examinar los efectos a largo plazo de la modalidad de tratamiento propuesta en este trabajo.

En conclusión, demostramos que la estimulación mecánica por vibración, administrada por medio de un clavo bloqueado percutor, puede reactivar el proceso de osteogénesis y llevar a la reparación de una fractura cuando se aplica en un proceso de falta de unión ósea.

9. LITERATURA CITADA

- 1.- Hulse D, Hyman B. Biomechanics of fracture fixation failure. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice.* 1991, 21: 647- 667.
- 2.- Piermattei DL, Flo GL. Fractures: Clasification, diagnosis, and treatment. In: *Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair.* USA: Saunders Elsevier, 2006: 25-159.
- 3.- Coles CP, Gross M. Closed tibial shaft fractures: management and treatment complications. A review of the prospective literature. *Can J Surg.* 2000,43: 256-62
- 4.-Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules? *Injury, Int. J. Care Injured.* 2007: 38 S1: S11—S25
- 5.-Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury, Int. J. Care Injured.* 2005, 36: 1392—1404.
- 6.-Al-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res.* 2008, 87 (2): 107–118.
- 7.-Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury, Int. J. Care Injured.* 2005: 36S, S5—S7.
- 8.-Fazzalari NL. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int.* 2011, 22:2003–2006.
- 9.-Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgerit F, et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res.* 2012, 347:567–573.
- 10.- Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury, Int. J. Care Injured.* 2011, 42:551–555.
- 11- Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG.. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars Cell Develop Biol.* 2008, 19: 459-466.
- 12-** Pneumaticos SG, Triantafyllopoulos GK, Basdra EK, Papavassiliou AG. Segmental bone defects: from cellular and molecular pathways to the development of novel biological treatments. *J Cell Mol Med.* 2010, 14 (11): 2561-2569.
- 13.- Ruschke K, Hiepen C, Becker J, Knaus P. BMPs are mediators in tissue crosstalk of the regenerating musculoskeletal system. *Cell Tissue Res.* 2012, 347:521–544.
- 14.- Harwood PJ, Newman JB, Michael AL. An update on fracture healing and non-union. *Orthopaedics Trauma.* 2010, 24 (1): 9-23.
- 15.- Chen Y, Alman BA. Wnt Pathway, an Essential Role in Bone Regeneration. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2009, 106: 353–362.
- 16.- Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, Stadlinger B. Osseointegration – communication of cells. *Clin. Oral Impl. Res.* 2012, 23: 1127–1135.
- 17.- Solheim E. Growth factors in bone. *International Orthopaedics (SICOT).* 1998, 2: 410–416.
- 18.- Yamashita, H. Bone Morphogenetic Protein Receptors. *Bone.* 1996, 19 (6): 569-574

- 19.- Gaggero, E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006, 7: 51–65.
- 20.- Patel A. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma: recent clinical findings with human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Current Medical Research and Opinion.* 2006, 22: S1-S5.
- 21.- Nakase, T. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J Bone Miner Metab.* 2006, 24: 425–433.
- 22.- Sakou, T. Bone Morphogenetic Proteins: From Basic Studies to Clinical Approaches. *Bone.* 1998, 22(6): 591–603.
- 23.- Dijke P. Bone morphogenetic protein signal transduction in bone. *Current Medical Research and Opinion.* 2006, 22: S7.
- 24.-Kloen, P. Expression and Activation of the BMP-Signaling Components in Human Fracture Nonunions. *The Journal of Bone & Joint Surgery.* 2002, 84-A (11): 1909-1919
- 25.- Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury.* 2011, 42: 556–561.
- 26.- Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenni E, Gomez-Barrena E, et al. Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med.* 2011, 15 (4): 718-746.
- 27.- Mehta M, Schmidt-Bleek K, Duda GN, Mooney DJ. a Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2012, 64:1257–1276.
- 28.- Secreto FJ, Hoepfner LH, Westendorf JJ. Wnt Signaling During Fracture Repair. *Curr Osteoporos Rep.* 2009, 7 (2): 64–69.
- 29.- Malizos KN, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum Molecular aspects. *Injury, Int J Care Injured.* 2005, 36S: S13—S19.
- 30.-Schell H, Lienau J, Epari D, Seebeck P, Exner C, Muchow S, et al. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone.* 2006, 38: 547–554.
- 31.-Giannoudis PV, Atkins R. Management of long-bone non-unions. *Injury* 2007; 38 Suppl 2:S1-2.
- 32.-Kanakaris NK, Giannoudis PV. The health economics of the treatment of long-bone non-unions. *Injury* 2007; 38 Suppl 2:S77-84.
- 33.- Tzioupis C, Giannoudis PV. Prevalence of long-bone non-unions. *Injury* 2007; 38 Suppl 2:S3-9.
- 34.- Soucacos PN, Dailiana Z, Beris AE, Johnson EO. Vascularised bone grafts for the management of non-union. *Injury* 2006; 37 Suppl 1:S41-50.
- 35.- Campbell A. *Cirugía Ortopédica.* España: Hartcourt, 1991.
- 36.- Summer-Smith G. Delayed unions and nonunions. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 1991, 21: 745-760
- 37.- Goldhahn S, Moser R. Treatment, methods and outcomes of tibial shaft fractures in Switzerland. A prospective multicenter study of the Swiss AO. *Swiss Surg.* 2000, 6: 315-22.
- 38.-Rodriguez-Merchan C, Forriol F. Nonunion: General Principles and Experimental Data. *Clin Orthop.* 2004, 419:4–12.

- 39.- Weber BG, Cech O: Pseudarthrosis: pathology, biomechanics, therapy, results. Hans Huber Medical, 1976
- 40.- Blaeser L, Gallagher J. Treatment of biologically inactive nonunions by a limited en bloc ostectomy and compression plate fixation: a review of 17 cases. *Veterinary Surgery*. 2003, 32: 91-100.
- 41.- Brownlow H, Simpson A. Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits. *Journal of Orthopaedic Research*. 2000,18:438.
- 42.- Frölke JP, Patka P. Definition and classification of fracture non-unions. *Injury* 2007; 38 Suppl 2:S19-22.
- 43.- Wu CC, Chen WJ. A revised protocol for more clearly classifying a nonunion. *J Orthop Surg* 2000; 8(1): 45-52.
- 44.-Calori G, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L. Risk factors contributing to fracture non-union. *Injury* 2007; 38 Suppl 2:S11-18
- 45.-Iwakura,T, Miwa M, Sakai Y, et al. Human hypertrophic nonunion tissue contains mesenchymal progenitor cells with multilineage capacity in vitro. *J Orthop Res* 2009; 27(2): 208-15.
- 46.-Grupta AK, Srivastava KP, Avasthi S. Pulsed electromagnetic stimulation in nonunion of tibial diaphyseal fractures
- 47.-Carrol J. Morphology of fracture nonunion and osteomyelitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 1991, 21: 813-844.
- 48.-Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res* 2003; 21(3):503-10.
- 49.-Barquet A, Fernández A, Luvizio J, Masliah R. A combined therapeutic protocol for aseptic non-union of the humeral shaft: A report of 25 cases. *J Trauma* 1989, 29: 95-8.
- 50.-Blatter G, Weber BG. Wave plate osteosynthesis as a salvage procedure. *Arch Orthop Trauma*, 1990, 109: 330-3.
- 51.-Brunner CF, Weber BG. Special techniques in internal fixation. Springer Verlag. 1982; 145-61.
- 52.-Cervelatti C, Montanari G, Masetti G, Carpanelli F. The Ilizarov method for the treatment of non-union in the humerus. *Chir Organi Mov*. 1990, 75: 115-20.
- 53.-Foster RJ, Watch AW, Green TM. Internal fixation of fractures and non-union of the humeral shaft. *J Bone Joint Surg*. 1985, 67-A: 857-64.
- 54.-Sen MK, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury*. 2007, 38 Suppl (1):S75-80.
- 55.-Kanakaris NK, Paliobeis C, Manidakis N, Giannoudis PV. Biological enhancement of tibial diaphyseal aseptic non-unions: the efficacy of autologous bone grafting, BMPs and reaming by-products. *Injury*. 2007, 38 Sppl. (2):S65-75.
- 56.-Wolff J. The law of bone remodeling. Berlin: Springer; 1986.

- 57.-Kristy T. Salisbury Palomares, Ryan E. Gleason, Zachary D. Mason, et al. Mechanical Stimulation Alters Tissue Differentiation and Molecular Expression during Bone Healing. *J Orthop Res* 2009;
- 58.-Morgan, E. Mechanotransduction and Fracture Repair. *J Bone Joint Surg Am*. 2008, 90(Suppl. 1): 25–30
- 59.-Rosenberg N. Experimental model for stimulation of cultured human osteoblast-like cells by high frequency vibration. *Cytotechnology*. 2002, 39: 125–130.
- 60.-Goodship, Kenwright. The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *J Bone Surg*. 1985, 67-B (4): 650-655.
- 61.-Soon Jung Hwang, Svetlana Lublinsky, Young-Kwon Seo, In Sook Kim, Stefan Judex. Extremely Small-magnitude Accelerations Enhance Bone Regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467:1083–91
- 62.-Elise F. Morgan, Ryan E. Gleason, BS, Lauren N. M. Hayward, BS, Pui L. Leong, BS, and Kristy T. Salisbury Palomares, Mechanotransduction and Fracture Repair *Bone Joint Surg Am* 2008; 90 Suppl. 1: 25–30.
- 63.-Michael J. Gardner, Benjamin F. Ricciardi, Timothy M. Wright, Mathias P. Bostrom, Marjolein C. H. van der Meulen. Pause Insertions During Cyclic In Vivo Loading Affect Bone Healing *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466:1232–1238).
- 64.-Letchipia JE, Alessi A, Rodriguez G, Asbun J. Would increased interstitial fluid flow through in situ mechanical stimulation enhance bone remodeling? *Med Hypotheses* 2010;75(2):196-8.
- 65.-Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 1995; 57:344–58.
- 66.-Gerstenfeld, L. Fracture Healing as a Post-Natal Developmental Process: Molecular, Spatial, and Temporal Aspects of Its Regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003, 88:873–884
- 67.-Nakase, T. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J Bone Miner Metab*. 2006, 24: 425–433.
- 68.-Kloen, P. Expression and Activation of the BMP-Signaling Components in Human Fracture Nonunions. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2002, 84-A (11): 1909-1919
- 69.-Yuehuei H, Friedman R. Animal models in Orthopaedic Research. CRC Press.1999, USA.
- 70.-Atesok K, Li R, Stewart DJ, Schemitsch EH. Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *J Orthop Res* 2010; 28(8): 1007-14.
- 71.-Hak DJ, Makino T, Niikura T, Hazelwood SJ, Curtiss S, Reddi AH. Recombinant human BMP-7 effectively prevents non-union in both young and old rats. *J Orthop Res* 2006; 24(1): 11-20.
- 72.-Kaspar K, Matziolis G, Strube P, Sentürk U, Dormann S, Bail HJ, et al. A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by external fixator. *J Orthop Res* 2008; 26(12):1649-55.

- 73.-Oetgen ME, Merrell GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA. Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury* 2008; 39(10): 1119-26.
- 74.-Oni OO. A non-union model of the rabbit tibial diaphysis. *Injury* 1995; 26(9): 619-22.
- 75.-Schmidhammer R, Zandieh S, Mittermayr R, Pelinka LE, Leixnering M, Hopf R, et al. Assessment of bone union/non-union in an experimental model using microcomputed technology. *J Trauma* 2006; 61(1):199-205.
- 76.-Fujita M, Matsui N, Tsunoda M, Saura R. Establishment of a non-union model using muscle interposition without osteotomy in rats. *Kobe J Med Sci* 1998; 44(56): 217-33.
- 77.-García P, Holstein J, Maier S, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, et al. Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 2008; 147(1): 84-91.
- 78.- Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS. Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res* 2007; 25(1): 51-61.
- 79.- Choi P, Ogilvie C, Thompson Z, Miclau T, Helms JA. Cellular and molecular characterization of a murine non-union model. *J Orthop Res* 2004; 22(5): 1100-7.
- 80.- Alt V, Lips KS, Henkenbehrens C, Muhrer D, Cavalcanti-Garcia M, Sommer U, et al. A new animal model for implant-related infected non-unions after intramedullary fixation of the tibia in rats with fluorescent *in situ* hybridization of bacteria in bone infection. *Bone* 2011; 48(5): 1146-53.
- 81.-Dickson GR, Geddis C, Fazzalari N, Marsh D, Parkinson I. Microcomputed tomography imaging in a rat model of delayed union/non-union fracture. *J Orthop Res* 2008; 26(5): 729-36.
- 82.-Reed AA, Joyner CJ, Isefuku S, Brownlow HC, Simpson AH. Vascularity in a new model of atrophic nonunion. *J Bone Joint Surg Br* 2003; 85(4):604-10.
- 83.-Harrison LJ, Cunningham JL, Strömberg L, Goodship AE. Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model. *J Orthop Trauma* 2003; 17(1):11-21.
- 84.-Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. Growth factor expression during the development of atrophic non-union. *Injury* 2001; 32(7): 519-24.
- 85.-Brownlow HC, Simpson AH. Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits. *J Orthop Res* 2000; 18(3): 438-42.
- 86.-Eckardt H, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, Hall DW, Hvid I. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of non-union. *Injury* 2005; 36(4):489-94.
- 87.-Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg* 2005; 87(10):1434-8.

- 88.-Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. The vascularity of atrophic non-unions. *Injury* 2002; 33(2): 145-50.
- 89.-Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB, Abbott JT. The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 1991; 73(5): 750-64.
- 90.-Markel MD, Bogdanske JJ, Xiang Z, Klohnen A. Atrophic nonunion can be predicted with dual energy x-ray absorptiometry in a canine osteotomy model. *J Orthop Res* 1995; 13(6): 869-75.
- 91.-Kraus KH, Kadiyala S, Wotton H, Kurth A, Shea M, Hannan M, et al. Critically sized osteo-periosteal femoral defects: a dog model. *J Invest Surg* 1999; 12(2): 115-24.
- 92.-Heckman JD, Ehler W, Brooks BP, Aufdemorte TB, Lohmann CH, Morgan T, et al. Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor- β enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg Am* 1999; 81(12):1717-29.
- 93.-Saifzadeh S, Pourreza B, Hobbenaghi R, Naghadeh BD, Kazemi S. Autogenous greater omentum, as a free nonvascularized graft, enhances bone healing: an experimental nonunion model. *J Invest Surg* 2009; 22(2):129-37.
- 94.-Johannes EJ, Kaulesar Sukul DM, Matura E. High-energy shock waves for the treatment of nonunions: an experiment on dogs. *J Surg Res* 1994; 57(2):246-52.
- 95.-Caerio P J, Da Costa RJ, Capela e Silva F, Rlavas C, Silverio CA, Simoes JA. The Sheep as an Animal Model in Orthopaedic Research. *Experimental Pathology and Health Sciences*. 2008; 2 (1):29-32. [database on the internet]. Available from: http://www.patolex.org/revista/Experimental_Pathology/20082_files/6%20SHEEPcomp.pdf
- 96.-Yih-Shiunn L, Ting-Ying L, Hui-Ling H. Intramedullary fixation of tibial shaft fractures: a comparison of the unlocked and interlocked nail. *International Orthopaedics (SICOT)*. 2008, 32:69–74.
- 97.- Lozada G AR. Establecimiento de un modelo de no unión ósea en tibia de borrego. 2008, México (DF): Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- 98.-Dahabreh Z, Calori G, Kanakaris N, Nikolaou V, Giannoudis P. A cost analysis of treatment of tibial fracture nonunion by bone grafting or bone morphogenetic protein-7. *International Orthopaedics*. 2009, 33:1407–1414.
- 99.-Friedlaender G, Perry C, Cole D, Cook S, Cierny G, Muschler G. Osteogenic protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am*. 2001, 83-A Suppl 1: S151–S158.
- 100.-Uchiyama Y, Nakamura Y, Mochida J, Tamaki T. Effect of low-intensity pulsed ultrasound treatment for delayed and non-union stress fractures of the anterior mid-tibia in five athletes. *Tokai J Exp Clin Med*. 2007, 32 (4): 121-125.
- 101.-Gupta AK, Srivastava KP, Avasthi S. Pulsed electromagnetic stimulation in nonunion of tibial diaphyseal fractures. *Indian J Orthop*. 2009, 43(2): 156–160.

- 102.-Chalidis B, Petsatodis G, Sachinis N, Dimitriou C, Christodoulou A. Reamed interlocking intramedullary nailing for the treatment of tibial diaphyseal fractures and aseptic nonunions. Can we expect an optimum result? *Strat Traum Limb Recon.* 2009, 4:89–94.
- 103.- Wu C. Reaming bone grafting to treat tibial shaft aseptic nonunion after plating. *J Orthop Surg.* 2003, 11(1): 16–21.
- 104.- Saleh M, Royston S. The management of nonunion of fractures by distraction with correction of angulation and shortening. *J Bone Joint Surg.* 1996, 78-B (1).
- 105.- Kim YJ, Sah RL, Grodzinsky AJ, Plaas AH, Sandy JD. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli. *Arch. Biochem Biophys.* 1994, **311**:1–12.
- 106.-Turner CH. Homeostatic control of bone structure: an application of feedback theory. *Bone.* 1991, **12**: 203–217
- 107.-Dehority W, Halloran BP, Bikle DD, Curren T, Kostenuik PJ. Bone and hormonal changes induced by skeletal unloading in the mature male rat. *Am J Physiol.* 1999, 276: E62–E69.
- 108.-Triplett JW, O'Riley R, Tekulve K, Norvell SM, Pavalko FM. Mechanical loading by fluid shear stress enhances IGF-1 receptor signaling in osteoblasts in a PKCzeta-dependent manner. *Mol Cell Biomech.* 2007, 4 (1): 13-25.
- 109.-Kim CH, You L, Yellowley CE, Jacobs CR. Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling. *Bone.* 2006, 39:1043–1047.
- 110.-Malone AM, Batra NN, Shivaram G, Kwon RY, You L, et al. The role of actin cytoskeleton in oscillatory fluid flow-induced signaling in MC3T3-E1 osteoblasts. *Am J Physiol.* 2007, 292: C1830–C1836.
- 111.-Friedl G, Schmidt H, Rehak I, Kostner G, Schauenstein K, Windhager R. Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain: transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007, 15 (11): 1293-1300.
- 112.-Kreke MR, Huckle WR, Goldstein AS. Fluid flow stimulates expression of osteopontin and bone sialoprotein by bone marrow stromal cells in a temporally dependent manner. *Bone.* 2005, 36:1047–1055.
- 113.-Machwate M, Zerath E, Holy X. Skeletal unloading in rat decreases proliferation of rat bone and marrow-derived osteoblastic cells. *Am J Physiol.* 1993, 264: E790–E799.
- 114.-Zhang R, Supowit SC, Klein GL.. Rat tail suspension reduces messenger RNA level for growth factors and osteopontin and decreases the osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 1995,10: 415–423.
- 115.-Grano M, Mori G, Minielli V. Rat hindlimb unloading by tail suspension reduces osteoblast differentiation, induces IL-6 secretion, and increases bone resorption in ex vivo cultures. *Calcif Tissue Int.* 2002, 70: 176–185.

- 116.-Sakata T, Sakai A, Tsurukami H, et al. Trabecular bone turnover and bone marrow cell development in tail-suspended mice. *J Bone Miner Res.* 1999, 14: 1596–1604.
- 117.-Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147.
- 118.-Sikavitsas VI, Bancroft GN, Lemoine JJ, et al. 2005. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann Biomed Eng* 33:63–70. Bancroft GN,
- 119.-Sikavitsas VI, van den Dolder J, et al. 2002. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12600–12605.
- 120.- Holtorf HL, Sheffield TL, Ambrose CG, et al. 2005. Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Ann Biomed Eng* 33:1238–1248.
- 121.- Ryan C. Riddle,¹ Henry J. Donahue. From Streaming Potentials to Shear Stress: 25 Years of Bone Cell Mechanotransduction. *J Orthop Res* 27:143–149, 2009.
- 122.-Kenwright J, Gardner T. Mechanical influences on tibial fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998, 355S: 179-190.
- 123.- Prendergast PJ, Huiskes R, Soballe K. Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces. *J Biomech.* 1997, 30(6): 539–548.
- 124.-Lacroix D, Prendergast PJ. A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading. *J Biomech.* 2002, 35 (9):1163–1171.
- 125.-Wu Q, Zhang Y, Chen Q. Indian hedgehog is an essential component of mechanotransduction complex to stimulate chondrocyte proliferation. *J Biol Chem.* 2001, 276 (38): 35290–35296.
- 126.- Tavernarakis N, Driscoll M. Molecular modeling of mechanotransduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Physiol.* 1997, 59: 659–689.
- 127.- Reddi AH Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol.* 1998, 16:247–252.
- 128.- Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2002, 84:1032–1044.
- 129.- Li M, Ke HZ, Qi H, Healy DR, Li Y, Crawford DT, Paralkar VM. A novel, non-prostanoid EP2 receptor-selective prostaglandin E2 agonist stimulates local bone formation and enhances fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2003,18: 2033–2042.
- 130.- Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004, **22**: 233–241.
- 131.- Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res.* 1999, **17**: 269–278.

- 132.- Forwood MR. Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. *J Bone Miner Res.* 1996,11: 1688–1693.
- 133.-Kesavan C, Mohan S, Oberholtzer S, Wergedal JE, Baylink DJ. Mechanical loading-induced gene expression and BMD changes are different in two inbred mouse strains. *J Appl Physiol.* 2005, 99:1951–1957.
- 134.- Ikegame M, Ishibashi O, Yoshizawa T, Shimomura J, Komori T, Ozawa H, Kawashima H. Tensile stress induces bone morphogenetic protein 4 in preosteoblastic and fibroblastic cells, which later differentiate into osteoblasts leading to osteogenesis in the mouse calvariae in organ culture. *J Bone Miner Res.* 2001, 16: 24-32.
- 135.- Rath B, Namb J, Deschner J, Schaumburger J, Tingart M, Grassel S, Grifka J, Agarwal S. Biomechanical forces exert anabolic effects on osteoblasts by activation of SMAD 1/5/8 through type 1 BMP receptor. *Biorheology.* 2001, 48:37–48.
- 136.- Ho A, Marker P, Peng H, Quintero A. Dominant negative *Bmp5* mutation reveals key role of BMPs in skeletal response to mechanical stimulation. *BMC Dev Biol.* 2008, 1(8):35.
- 137.- Kloen P, Di Paola M, Borens O, Richmond J, Perino G, Helfet D, Goumans M. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone.* 2003, 33: 362–371.
- 138.- Al-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction. *J Dent Res.* 2008, 87(2):107-118.
- 139.-Kloen P, Doty S, Gordon E. Expression and activation of the BMP-signaling components in human fracture nonunions. *J Bone Joint Surg.* 2002, 84-A, (11).
- 140.- Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet.* 2001, 27(1):84–88.
- 141.-Lau K, Kapur S, Kesavan C, Baylink D. Up-regulation of the Wnt, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in C57BL/6J osteoblasts, as opposed to C3H/HeJ osteoblasts, in part contributes to the differential anabolic response to fluid shear. *J. Biol. Chem.* 2006, 281: 9576–9588.
- 142.- Cullinane DM, Fredrick A, Eisenberg SR, Pacicca D, Elman MV, Lee C, Salisbury K, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Induction of articular-like cartilage and a joint-like structure by controlled motion in an experimental mid-femoral defect. *J. Orthop. Res.* 2002, 20: 579-586.
- 143.- Cullinane DM, Salisbury K, Alkhiary Y. Effects of the local mechanical environment on vertebrate tissue differentiation during repair: does repair recapitulate development? *J of Experimental Biol.* 2003, 206: 2459-2471
- 144.- Altman G, Horan R, Martin I, Farhadi J. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J.* 2002, 16(2):270-272.
- 145.-Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res.* 1998, 355: S132–147.

- 146.- Duda GN, Sollmann M, Sporrer S, Hoffmann JE, Kassi JP, Khodadadyan C, Raschle M. Interfragmentary motion in tibial osteotomies stabilized with ring fixators. *Clin Orthop Relat Res.* 2002, 396:163–172.
- 147.- Egger EL, Gottsauner-Wolf F, Palmer J, Aro HT, Chao EY. Effects of axial dynamization on bone healing. *J Trauma.* 1993, 34:185–192.
- 148.- Cullen DM, Smith RT, Akhter MP. Bone-loading response varies with strain magnitude and cycle number. *J Appl Physiol.* 2001, 91:1971–1976.
- 149.-Robling AG, Burr DB, Turner CH. Recovery periods restore mechanosensitivity to dynamically loaded bone. *J Exp Biol.* 2001, 204:3389–3399.
- 150.- Umemura Y, Ishiko T, Yamauchi T, Kurono M, Mashiko S. Five jumps per day increase bone mass and breaking force in rats. *J Bone Miner Res.* 1997, 12:1480–1485.
- 151.-Goodship AE, Cunningham JL, Kenwright J. Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998, 355: S105–115.
- 152.- Weaver A, Su Y, Begun D, Miller J, Alford A, Goldstein S. The effects of axial displacement on fracture callus morphology and MSC homing depend on the timing of application. *Bone.* 2010, 47(1): 41–48.
- 153.- Claes L, Eckert-Hubner K, Augat P. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res.* 2002, 20:1099–1105.
- 154.- Wallace AL, Draper ER, Strachan RK, McCarthy ID, Hughes SP. The vascular response to fracture micromovement. *Clin Orthop Relat Res.* 1994, 301: 281–290.
- 155.- Rhinelander FW. Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1974, 105: 34–81.
- 156.- Gardner MJ, van der Meulen MC, Demetrakopoulos D, Wright TM, Myers ER, Bostrom MP. In vivo cyclic axial compression affects bone healing in the mouse tibia. *J Orthop Res* 2006, 24(8):1679–86.
- 157.- Case ND, Duty AO, Ratcliffe A, Muller R, Guldberg RE. Bone formation on tissue-engineered cartilage constructs in vivo: effects of chondrocyte viability and mechanical loading. *Tissue Eng.* 2003, 9(4):587–96.
- 158.- Reed A, Joyner C, Brownlow H, Simpson A. Human atrophic fracture non-unions are not avascular. *J Orthop Res,* 2002 2D, 593-599.
- 159.- Iwakura T, Miwa M, Sakai Y, Niikura T, Lee SY, Oe K, Hasegawa T, Kuroda R, Fujioka H, Doita M, Kurosaka M. Human hypertrophic nonunion tissue contains mesenchymal progenitor cells with multilineage capacity in vitro. *J Orthop Res.* 2009, 27 (2): 208-215.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.JournalofSurgicalResearch.com

Development of a bone nonunion in a noncritical segmental tibia defect model in sheep utilizing interlocking nail as an internal fixation system

Angel R. Lozada-Gallegos, MSc,^a Jorge Letechipia-Moreno, DC,^b Icela Palma-Lara, DC,^a Aldo Alessi Montero,^b Gerardo Rodríguez, MSc,^b Federico Castro-Muñozledo, PhD,^c Miguel A. Cornejo-Cortés, DC,^d and M. Lourdes Juárez-Mosqueda, DC^{a,*}

^a Department of Morphology, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^b Rehabilitation Engineering Department, Instituto Nacional de Rehabilitación, Mexico City, Mexico

^c Department of Cell Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

^d Department of Biological Sciences, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2012

Received in revised form

20 February 2013

Accepted 28 February 2013

Available online xxx

Keywords:

Sheep

Large animal model

Bone nonunion

Noncritical segmental defect

Interlocking nail fixation

ABSTRACT

Background: The bone nonunion is an important complication of bone fracture repair. The existing models developed on small animal species prevent using osteosynthesis materials designed to be implanted in human bones. The goal of this study was to develop a nonunion process in a noncritical segmental tibial defect in sheep, a species analogous in size to humans.

Materials and methods: The animals were divided into two groups of four animals each. In Group 1 (experimental), the defect was created by surgically stripping the periosteum from the edges of a distal tibial osteotomy, keeping the edges 5 mm apart, and placing an incomplete O-shaped silicone ring in the gap. Group 2 (control) was intervened with a simple fracture at the distal end of the tibia. In both groups an interlocking nail was used as a fixation system. Over 8 wk after surgery, radiographs and histologic and histomorphometric analyses were performed.

Results: The control group showed a typical bone repair process. In contrast, the experimental group showed a fracture line with rounded edges and a scarce callus formation. The bone callus showed reduced amount of bone formation and large content of fibrous tissue ($P = 0.001$).

Conclusions: These results indicate that our model developed an atrophic nonunion in sheep, a species having multiple similarities to humans, such as weight, size, bone structure, and bone remodeling process.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In humans, most long bone fractures are successfully repaired; however, nonunion is a complication that may arise in 5%–10% of cases [1], with the incidence rising to 16% in those cases

of exposed fractures with severe soft tissue damage, or up to 46% when the injury involves blood vessels in the area [2]. Significantly, the tibia is a long bone that, besides its high frequency of fracture, presents the highest percentage of nonunion when the fracture affects the tibial diaphysis. Under

* Corresponding author. Department of Morphology, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico, D.F., Mexico. Tel.: +52 56225910; fax: +52 56225902.

E-mail address: luerfco@unam.mx (M.L. Juárez-Mosqueda).

0022-4804/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2013.02.060>

such circumstances, the incidence of nonunion may vary between 5% and 41% depending on the fixation system used [3,4].

In general terms, bone nonunion is due to the arrest of the repair of fractures; in such cases the union of bone edges is unlikely unless an additional treatment is implemented. Although specific events leading to bone nonunion are unknown, its main causes include alterations in blood flow, severe damage to the periosteum, bone destruction accompanied by extensive segmental defects, or inadequate stabilization of the fracture [5–7]. The tibial diaphysis, due to limited coverage of muscular masses on the anteromedial face, is the anatomic site with the highest appearance of segmental bone defects [8].

To date, several animal models of bone nonunion have been established to study the pathophysiologic conditions that lead to this alteration and to develop treatments that may offer a solution [9–17]. Segmental bone defects in rodents [16–25] and dogs [26–29] offer an excellent model to analyze nonunion.

Alternatively, the sheep is a species frequently used in orthopedic studies, because of its similarity with human bones in terms of size, weight, bone and joint structure, and the bone remodeling process [30,31]. Consequently, sheep are very useful to analyze the biomechanical, biochemical, and histologic characteristics of bone and its injury [32].

As an additional advantage, sheep possess long bones of a size suitable for the placement of prostheses and orthopedic implants for human use [31].

In order to create an animal model for evaluation of surgical procedures and implants to be used in humans for the treatment of bone nonunion, in this work we used sheep to establish a nonunion process in a noncritical segmental tibial defect, which could be helpful to develop treatments for this severe complication.

2. Material and methods

2.1. Animals

The study was conducted in eight 1.5-y-old male sheep of the Suffolk breed, weighing approximately 50 kg. Animals were obtained from the UNAM Center for Teaching, Research, and Extension of Ovine Production (Morelos, Mexico). They were divided into two groups of four individuals each. The procedure to induce nonunion was performed on the first group and in the second (control group) a model of simple fracture was established. All procedures were conducted on the premises of the Animal Facility of the National Institute of Rehabilitation (Mexico City, Mexico) and were approved by the Internal Committee for Care of Experimental Animals of the UNAM Faculty of Veterinary Medicine (Mexico City, Mexico), which adheres to the principles established in Official Mexican Standard 062-ZOO-1999 and NIH recommendations for care and use of laboratory animals.

2.2. Surgical procedure and noncritical segmental bone defect model

Surgery was performed under general anesthesia and under sterile conditions in accordance with the following protocol:

induction was effected with propofol (4 mg/kg intravenous Diprivan; Astra Zeneca, London, United Kingdom), and isoflurane (Forane; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) was administered by endotracheal catheter (2%–3%) in 100% oxygen to maintain surgical anesthesia. Analgesic management was achieved with presurgical administration of butorphanol (0.2 mg/kg; Torbugesic; Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA) and ketorolac (50 mg/animal; Onemer; Pisa, Mexico City, Mexico); this analgesia protocol was prolonged for 5 d. Enrofloxacin (5 mg/kg; Enroxil; Senosiain, Mexico City, Mexico) was administered perioperatively and maintained for 5 d as prophylactic treatment. We did not follow the standard protocol of antibiotic use for fracture care [33]. Instead, we extended antibiotic treatment due to the high risk of post-surgical infection [34]. It is important to remark that we did not observe any of the complications associated with this practice [35].

With the animal in left lateral decubitus, a medial incision approximately 7 cm long was made on the medial and distal third of the left tibial diaphysis, extending from the skin to the periosteum. By means of blunt dissection, soft tissue was lifted circumferentially to separate it from the periosteum, separating the muscles from the lateral and caudal regions. Then, an osteotomy was performed with a gigli saw while constantly bathing the area with sterile saline solution. When the diaphysis fractured, periosteum was removed from each end of the sectioned bone; the length of removed periosteum was equivalent to 1.5× the diameter of the tibial diaphysis at the cut area.

Osteotomy was stabilized with a 9-mm-diameter standard intramedullary interlocking nail (Manufacturas Solco SA de CV, Mexico City, Mexico). This procedure was performed with a medial parapatellar approach to the knee. With the joint in hyperflexion, a portal was created in the tibial plateau by introducing a 9-mm bit with a backward movement in the medullary canal of the tibia. Then the interlocking nail was introduced with a backward movement through the knee joint. While blocking the nail with two 4.5-mm screws at each end, a 5-mm gap between the bone sections was maintained by placing an aluminum plate between the edges of the osteotomy (Fig. 1A). Then the aluminum plate was replaced with an incomplete O-shaped ring made of biocompatible silicone (Silastic Medical Adhesive silicone Type A; Dow Corning Corporation, Midland, MI) 5 mm thick (Fig. 1B), which was slipped around the intramedullary nail until its presence blocked the lateral region in the fracture line, in order to interfere with the possible formation of blood vessels from the tibial musculature, which would favor bone repair. Finally, the surgical wound was closed routinely. In the control group only osteotomy of the tibial diaphysis was performed, and the bone edges of the bone segments were put in contact using the same fixation system used in the experimental group.

2.3. Radiographic evaluation

After surgery and every 2 wk, for an 8-wk follow-up period, radiographic studies were carried out on the left tibia (craniocaudal and mediolateral projections) to evaluate the bone repair process. We considered that the bone nonunion process

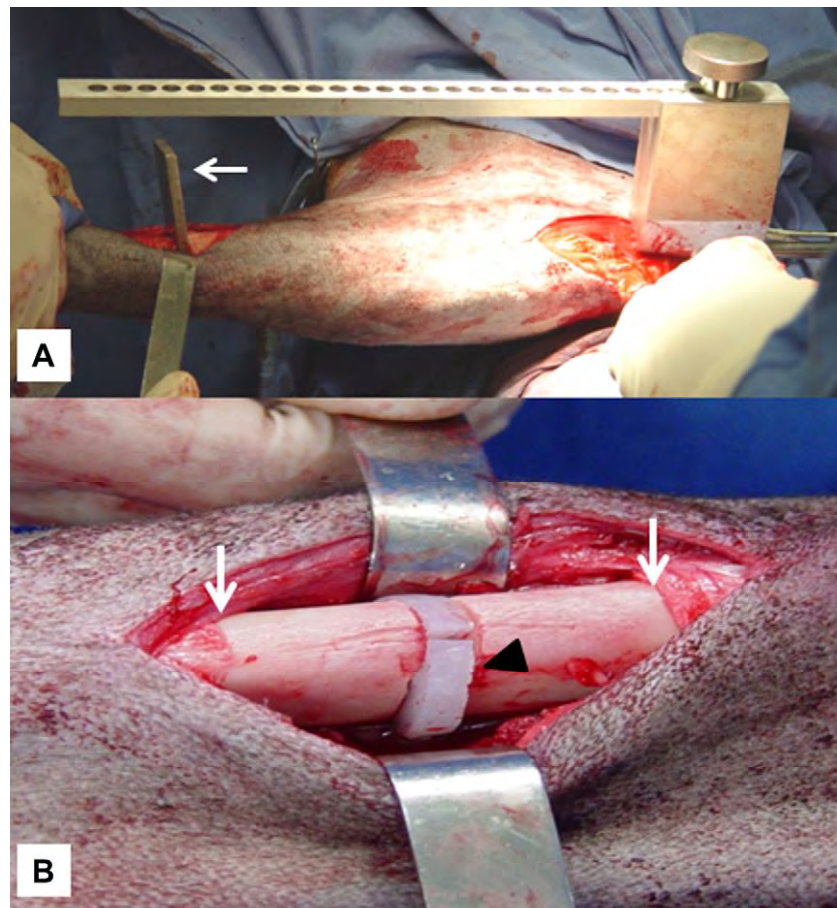


Fig. 1 – (A) Aluminum plate used to maintain 5-mm fracture space (arrow). (B) U-shaped silicone ring in the fracture space (black arrow tip); excision of the periosteum in each segment of the osteotomy, from the edge to approximately the equivalent to $1.5 \times$ the diameter of the tibia, can also be seen (arrows).

was established at 8 wk, when the fracture line was evident and showed well-defined edges, with a significant absence of a repair callus. In such cases, the four cortices at the edges of the osteotomy (medial, lateral, cranial, and caudal) were not in contact, showing an evident sclerosis of the cortices [6,10,11,14].

2.4. Histologic procedure and histomorphometric analysis

After 8 wk, all the animals were anesthetized as above to obtain biopsies of the nonunion sites by surgery.

During manipulation, it was observed that all the animals in the noncritical segmental defect group presented mobility of the distal segment when the distal screws were removed from the interlocking nail. Also, when tissue samples were taken from the nonunion zone, the silicone disc was located in the lateral region of the fracture line, while formation of fibrous tissue was found at the area of the osteotomy. Due to the large quantity of fibrotic tissue on the lateral face of the bone in some animals, it was impossible to take samples from the area; hence, we decided to analyze only tissue samples from the cranial, caudal, and medial faces and from

a single region on the fracture line in all the animals. Tissue samples were fixed in 10% (vol/vol) formalin; before inclusion in paraffin they were decalcified in hydrochloric acid (5% vol/vol). Histologic sections 4 μ m thick were made, and the tissue types present in the biopsies were determined in tissue sections stained with the Masson trichrome technique. Observations were made in an optical microscope (Axio Lab; Carl Zeiss, Mexico City, Mexico). The tissues observed in the histologic analysis were classified in two categories: (1) bone repair tissue (bone trabeculae and hyaline cartilage) and (2) bone nonunion tissue (fibrous connective tissue and fibrocartilage) [5,6,10]. For the histomorphometric analysis, all the histologic sections obtained from the biopsies were digitized using a digital camera coupled to an optical microscope (Motic BA210 Digital; Motic, British Columbia, Canada). Sigma Scan Pro 5.0 (Jandel Scientific, Corte Madera, CA) software was used to measure the total surface area of the tissue observed on each slide and the surface area corresponding to each tissue type. The proportion of each tissue type was determined for each face of the osteotomy edges. The obtained values were added and analyzed as a single sample. The evaluations corresponding to the fracture line were examined independently.

A bone nonunion process was considered when fibrous tissue was predominant, whereas bone and cartilage were minimal or absent [5,6,10].

2.5. Statistical analysis

A Kolmogorov-Smirnov test was performed to determine whether the sample presented a normal distribution. Then a Student t-test for paired samples was performed to compare tissue composition in nonunion with tissue organization in bone union. In all cases a 95% confidence interval and a 0.05 level of significance were considered.

3. Results

All the animals recovered from anesthesia and surgery without complications. During the first week after surgery, we observed in some animals an obvious mild lameness of the left forelimb when walking (lameness score 2), but it progressed favorably to score 1 (animals stood normally, with barely detectable lameness when walking) in the course of the second week [36,37]. The gait was normal from the third week to the end of the experimentation period. Pain was detected only when deep palpation was carried out in the area of the osteotomy during the first week of evaluation.

3.1. Radiographic evaluation

In the group of animals with a noncritical segmental bone defect, the immediate postsurgical radiographic study showed both the four screws placed correctly and the silicone ring placed on the 5-mm fracture gap (Fig. 2A and B). At the fourth week of evaluation, we observed in this group the beginning of the formation of repair callus at the lateral and caudal cortices from the periosteum near the osteotomy area; the formation of callus at the cranial cortex was not observed until the sixth week.

Although at the sixth week we found the greatest formation of bone callus, we never found any contact between the edges of the osteotomy. At this time, the radiographic studies showed a reduction in bone density and bone resorption at the osteotomy edges. At the eighth week, the last for radiographic evaluation, the bone edges of the osteotomy were clearly rounded and the fracture line remained evident; in other words, the formed callus was not adequate to create a contact between the bone fragments, clearly establishing a bone nonunion process (Fig. 2C and D). At this final stage of evaluation, we also observed that the space of the fracture line was reduced at its lateral face, as well as observing the displacement of the interlocking nail in the medullar channel. Despite these findings, the fracture edges never made contact.

In contrast, the radiographic analysis of the control group showed the start of formation of periosteal callus from the second week and the bone repair process progressed normally, with a clear union of bone edges visible at 8 wk (data not shown).

3.2. Histologic evaluation and histomorphometric analysis

We found that in those animals that underwent the bone nonunion process, the predominant tissue at the fracture site was fibrous connective tissue (Fig. 3A) and, in a lesser quantity, fibrous cartilage (Fig. 3B). Although we observed the formation of hyaline cartilage (Fig. 3C) and bone trabeculae with different degrees of mineralization in some areas, these were always limited to those regions near the bone edges and were isolated by a large quantity of fibrous tissue. Histomorphometric analysis revealed that 81%–93% of tissue on fracture edges was consistent with a bone nonunion process and was significantly more extended ($P \leq 0.001$) than the tissue associated with bone repair (6%–18%) (Table 1). Likewise, when the fracture line was evaluated, the highest percentage of fibrotic tissue corresponded to a bone nonunion process, with values of 75%–100%, significantly more extended ($P = 0.006$) than that observed for bone repair (4%–25%) (Table 1). In the animals in the control group, only tissues associated with a normal bone repair process were observed; in other words, we mainly found the presence of hyaline cartilage and trabecular bone tissue with mineralization of the matrix (Table 2).

4. Discussion

In orthopedic research, the use of sheep as an animal model is extensively documented, with considerable advantages with regard to other animal species [38,39]. In this study, we developed a bone nonunion process in a model of noncritical segmental bone defect in sheep tibia, thereby reproducing one of the complications that arise during treatment of fractures in humans. In general, bone nonunion processes are associated with fractures in which bone loss, periosteum damage at the site of injury, and instability of fragments have been observed [7]. In our study, these phenomena were induced and mimicked by excision of the periosteum and creation of a 5-mm fracture gap, followed by insertion of an incomplete O-shaped silicone ring among the fracture edges on the lateral face of the osteotomy. This approach permitted us to induce characteristics associated to a nonunion process, such as the persistence of fracture line due to the limited formation of repair callus, the mobility at the osteotomy site, and the presence of fibrous tissue with limited formation of cartilage or bone [5,6]. The clinical, radiographic, and histologic evidence showed that the process was established at 8 wk and, according to several authors, the nonunion produced in this animal model can be classified as atrophic [5,6,40,41].

In order to establish nonunion models, several authors have utilized species such as rodents [13,17], dogs [27], and rabbits [14], employing various techniques such as creation of large segmental defects, periosteum excision, or periosteal damage, as well as the interposition of muscular tissue or silicone barriers between the edges of the fracture. All these techniques have shown different rates of success, giving rise to widely varying opinions about their clinical resemblance to or divergence from the causes of the process in humans [6,13,16,17].

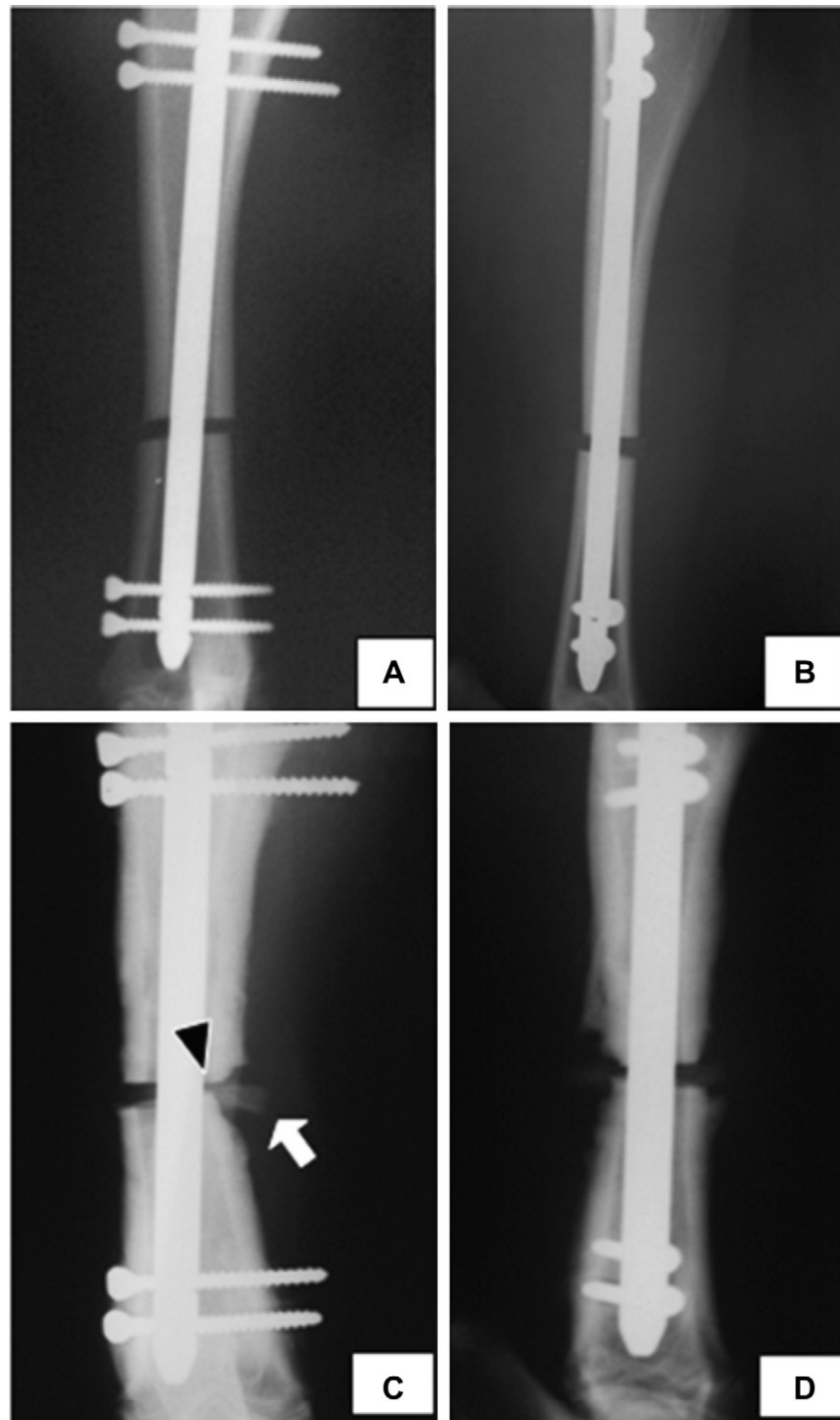


Fig. 2 – Immediate postsurgical radiographic study of the treated animals: craniocaudal (A) and mediolateral (B) projections showing establishment of the segmental defects. Radiographic study at 8 wk: craniocaudal (C) and mediolateral (D) projections. Both projections show reabsorption of the edges of the osteotomy and persistence of the fracture line, and the silicone ring in the lateral region of the fracture line (arrow). A reduction of the fracture space between bone edges of the lateral face is also observed (arrow tip).

In our study, after an 8-wk period, the radiographic analysis showed that following the approach we described above, the animals developed an evident fracture line that persisted, with minimal formation of repair callus (limited to the lateral

face of the osteotomy area). Several authors report that the finding of fibrocartilaginous tissue in the gap between fracture edges, instead of bone, is a criterion to consider nonunion established as a result of an alteration of the osteogenesis [7].

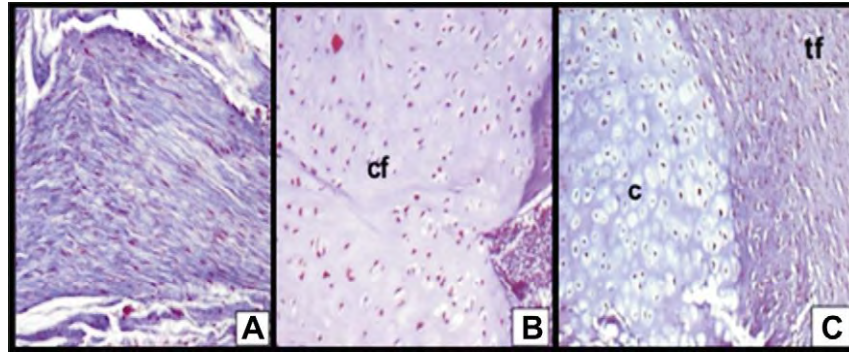


Fig. 3 – Masson staining of tissue obtained from fracture edges in the nonunion area, 40×. The predominant tissue observed was (A) fibrous tissue; (B) fibrous cartilage (cf) and (C) hyaline cartilage (c) were also observed, both tissues surrounded by fibrous tissue (tf).

Accordingly, our histologic findings validate the establishment of bone nonunion in our sheep model. Although these findings coincide with previous reports that used smaller species [17–20,26–29], our work shows for the first time the design of a reproducible bone nonunion model in a larger species. In this regard, the sheep is a species with a rate of bone repair closer to that reported for humans. In addition, sheep and human tibias share similar geometric proportions, anatomic position, and load-bearing patterns [32,38].

In this study, the larger formation of bone tissue on the fracture edges of the lateral cortex may be explained as a result of the spatial reduction of the fracture line starting at the third week of the study. It is possible that in such areas, a smaller separation between the edges of the fracture may have stimulated the bone repair process, although this effect was not sufficient to bring the edges into contact through the formation of the repair callus. We know that, in order to repair a fracture, the edges of the bone segments must remain in contact on at least 50% of their surface [42] and that, depending on the position of the fracture edges and the amount of motion between fragments, the mesenchymal stem cells will differentiate into chondrocytes or osteoblasts [43]. Although at the end of the study, the callus of the experimental animals presented characteristics of fibrous

tissue with little calcification, the result did not coincide with the normal repair process, given that a normal repair would have conducted to a predominantly calcified tissue [44].

Previously, other researchers who used the sheep as their model obtained only 65% of nonunion in animals subjected to a surgical procedure that created a 2-cm space on the fracture line. This low rate of success could be explained as a consequence of leaving the periosteum intact at the osteotomy site [45]. On the other hand, it was observed that in this species bone repair is extraordinary, occurring even when bone loss is extensive [46]. This evidence highlights the advantages of our model, where excision of the periosteum and the presence of the silicone ring were sufficient to compromise bone repair capacity [10,23,47,48], thereby avoiding the need to establish an extensive segmental defect to obtain its success [10,12–15,17,21,23]. Also, although a space of 5 mm was maintained on the fracture line, it was less than three times the diameter of the tibial diaphysis (22–25 mm). This width excludes the possibility that the fracture would not be repaired merely due to extensive bone loss [49], being classified as a critical segmental defect in sheep.

In this study, an incomplete O-shaped silicone ring was used to interfere with neovascularization from the tibial muscles at the site of osteotomy and avoiding

Table 1 – Number of pixels and percentage of tissue area by tissue type in treated animals.

Animal no.	Fracture edges				Fracture gap			
	Bone union		Bone nonunion		Bone union		Bone nonunion	
	Pixels	%	Pixels	%	Pixels	%	Pixels	%
1	83,587,092	19	361,500,677	81	17,101,588	25	51,109,067	75
2	45,049,722	13	297,814,382	87	2,326,624	5	47,192,700	95
3	29,845,143	12	215,830,218	88	0	0	47,435,057	100
4	19,888,847	6	295,711,424	94	930,888	1	106,185,744	99

Comparison between the observed proportion of nonunion tissue and bone union tissue on the edges and fracture gap of the experimental animals.

The nonunion tissue was significantly more extended in all the animals ($P \leq 0.001$).

Bone union: hyaline cartilage, bone trabeculae.

Bone nonunion: fibrous tissue, fibrocartilage.

Table 2 – Number of pixels and percentage of tissue area by tissue type in the control animals.

Animal no.	Mineralized bone matrix		Nonmineralized bone matrix	
	Pixels	%	Pixels	%
1	844,428	67.12	413,506	32.87
2	1,313,753	60.6	854,103	39.39
3	549,365	63.35	317,770	36.64
4	542,160	56.09	424,281	43.9

Tissue organization in bone union on control animals.

neovascularization influence on bone repair in the lateral region of the area. In principle, this method is similar to that used by Oni [14], which placed a silicone sheet between the tibial diaphysis and the soft tissues. Although it is possible that the presence of the ring could additionally interfere with the formation of the repair callus from the bone edges of the lateral face of the tibia, such possibility is discarded by the fact that we did not observe the formation of callus at the medial face, an area where the disc did not interfere with the contact between the edges of the osteotomy. Therefore, we assume that the effect of the disc was not crucial for the development of nonunion. In subsequent studies it will be necessary to establish whether osteotomy and periosteal excision are sufficient to induce nonunion. Conversely, a study conducted by Lu *et al.* [50] suggested that the alteration of blood flow in the tibia, without affecting the integrity of the periosteum, may only lead to a delayed union process.

In addition, we used an interlocking nail as a fixation system, which has shown a high mechanical efficiency during treatment for fracture repair and reduced the incidence of nonunion processes of the tibia [4]. Such a fixation system has even permitted bone union when used to repair large segmental defects [46]. In our study, the interlocking nail did not prevent nonunion, suggesting that our model is suitable to analyze the mechanisms underlying this pathology. In other studies, the use of external fixation permitted the establishment of nonunion processes in only 50% of cases [23,24]. Also, the use of the interlocking nail represents a more practical option in terms of management and hygiene of the experimental animals, when compared with the external fixation system used in fracture repair models in ovines [34].

On the other hand, when a model of segmental bone defect is established, a major concern for experimentalists is related to the activity and size of the animals, since the fixation system must support the full mechanical load produced without any failure. Examples of such complications are numerous. Previously, in a study using sheep as a model for noncritical segmental bone defects of 10 mm in the tibia, researchers obtained the development of nonunion after stabilizing the fracture with a plate and screws and placing the animals in a suspension system to prevent excessive loads on the operated limb [51]. Similarly, Sarkar *et al.* [52] created a 25-mm critical segmental defect in the sheep tibia, stabilized with an interlocking nail and combined with the use of a metal plate to reduce the mechanical stress on the bone-implant interface. However, because these models do not expose the bone to physiologic loads, they do not reflect the normal load

conditions to which a fracture is exposed during repair, and therefore their results may not be representative. Thus, the fixation system used for our animal model proved to be efficient, as it permitted normal support of the operated limbs during the time between the first days after surgery and the last day of the evaluation period.

Although our sample size is small, we propose that the model presented in this study may be a standard to induce bone nonunion in future investigations in the field. Some authors suggest that samples of at least two sheep may be statistically significant for evaluation of bone implants [31]. On the other hand, a major criticism for our model could be the use of a silicone ring to separate the fracture edges, a fact that could be argued as a difference with nonunion etiology in humans. However, most animal assays are subject to similar criticisms [10,12–17]. Nevertheless, animal models represent our best opportunity to analyze and understand the mechanisms underlying bone repair and osteogenesis. In spite of this, our future studies should also analyze the effect of periosteum resection on bone repair in the absence of the silicone ring. Moreover, although our work was carried out taking into account the bone repair ability in ovines [53–56], and the time to consider the nonunion establishment was chosen on this basis [53–56], in future analysis ovine bone repair capabilities should consider that in humans the time for establishment of a nonunion process is either near to 6 mo after injury [41] or when bone repair is delayed according to the average time for repair of a specific bone [57]. In this regard, considering a longer follow-up period may be more important in the hypertrophic nonunion models [54,57]. Finally, in this study we have discounted the possible alteration of bone repair by the antibiotics and analgesics. We can suggest this on the basis of the short period for application of these compounds on both groups and the normal development of bone repair in our control group. In contrast, it was reported that either high doses or the prolonged use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs may alter bone repair [58–65], although the negative effects of these compounds may be reversible after suspension of treatment [66] or are absent in some species, such as goats [67].

In conclusion, in this study we succeeded in inducing the development of a bone nonunion process in sheep tibias using a noncritical segmental defect model, which allowed us to reproduce clinical factors related to the development of that complication in humans. To the best of our knowledge, it is the first model that has been established in sheep using an interlocking nail as a fixation system. This study provides a new and reliable tool that can be used in the future to develop and evaluate surgical procedures and implants similar in size to those used in surgical practice in humans.

Acknowledgment

This work was supported by CONACyT Grant number 2003-C01-90.

We thank Mr Francisco E. López López for the performing of histologic procedures.

REFERENCES

- [1] Giannoudis PV, Atkins R. Management of long-bone non-unions. *Injury* 2007;38(Suppl 2):S1.
- [2] Sen MK, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury* 2007; 38(Suppl 1):S75.
- [3] Kanakaris NK, Giannoudis PV. The health economics of the treatment of long-bone non-unions. *Injury* 2007; 38(Suppl 2):S77.
- [4] Tzioupis C, Giannoudis PV. Prevalence of long-bone non-unions. *Injury* 2007;38(Suppl 2):S3.
- [5] Frölke JP, Patka P. Definition and classification of fracture non-unions. *Injury* 2007;38(Suppl 2):S19.
- [6] Wu CC, Chen WJ. A revised protocol for more clearly classifying a nonunion. *J Orthop Surg* 2000;8:45.
- [7] Calori G, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L. Risk factors contributing to fracture non-union. *Injury* 2007; 38(Suppl 2):S11.
- [8] DeCoster TA, Gehlert RJ, Mikola EA, Pirela-Cruz MA. Management of posttraumatic segmental bone defects. *J Am Acad Orthop Surg* 2004;12:28.
- [9] Atesok K, Li R, Stewart DJ, Schemitsch EH. Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *J Orthop Res* 2010;28:1007.
- [10] Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res* 2003; 21:503.
- [11] Hak DJ, Makino T, Niikura T, Hazelwood SJ, Curtiss S, Reddi AH. Recombinant human BMP-7 effectively prevents non-union in both young and old rats. *J Orthop Res* 2006; 24:11.
- [12] Kaspar K, Matziolis G, Strube P, et al. A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by external fixator. *J Orthop Res* 2008;26:1649.
- [13] Oetgen ME, Merrell GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA. Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury* 2008;39:1119.
- [14] Oni OO. A non-union model of the rabbit tibial diaphysis. *Injury* 1995;26:619.
- [15] Schmidhammer R, Zandieh S, Mittermayr R, et al. Assessment of bone union/non-union in an experimental model using microcomputed technology. *J Trauma* 2006; 61:199.
- [16] Fujita M, Matsui N, Tsunoda M, Saura R. Establishment of a non-union model using muscle interposition without osteotomy in rats. *Kobe J Med Sci* 1998;44:217.
- [17] García P, Holstein J, Maier S, et al. Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 2008;147:84.
- [18] Choi P, Ogilvie C, Thompson Z, Miclau T, Helms JA. Cellular and molecular characterization of a murine non-union model. *J Orthop Res* 2004;22:1100.
- [19] Dickson GR, Geddis C, Fazzalari N, Marsh D, Parkinson I. Microcomputed tomography imaging in a rat model of delayed union/non-union fracture. *J Orthop Res* 2008;26:729.
- [20] Reed AA, Joyner CJ, Isefuku S, Brownlow HC, Simpson AH. Vascularity in a new model of atrophic nonunion. *J Bone Jt Surg Br* 2003;85:604.
- [21] Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. Growth factor expression during the development of atrophic non-union. *Injury* 2001;32:519.
- [22] Brownlow HC, Simpson AH. Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits. *J Orthop Res* 2000; 18:438.
- [23] Eckardt H, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, Hall DW, Hvid I. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of non-union. *Injury* 2005;36:489.
- [24] Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Jt Surg* 2005;87:1434.
- [25] Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. The vascularity of atrophic non-unions. *Injury* 2002;33:145.
- [26] Markel MD, Bogdanske JJ, Xiang Z, Klohnen A. Atrophic nonunion can be predicted with dual energy x-ray absorptiometry in a canine osteotomy model. *J Orthop Res* 1995;13:869.
- [27] Kraus KH, Kadiyala S, Wotton H, et al. Critically sized osteo-periosteal femoral defects: a dog model. *J Invest Surg* 1999;12:115.
- [28] Heckman JD, Ehler W, Brooks BP, et al. Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor- β enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Jt Surg Am* 1999; 81:1717.
- [29] Saifzadeh S, Pourreza B, Hobbenaghi R, Naghadeh BD, Kazemi S. Autogenous greater omentum, as a free nonvascularized graft, enhances bone healing: an experimental nonunion model. *J Invest Surg* 2009;22:129.
- [30] Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 2001; 51:292.
- [31] Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007;13:1.
- [32] Augat P, Merk J, Ignatius A, et al. Early, full weightbearing with flexible fixation delays fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1996;328:194.
- [33] Hoff WS, Bonadies JA, Cachecho R, Dorlac WC. East Practice Management Guidelines Work Group: update to practice management guidelines for prophylactic antibiotic use in open fractures. *J Trauma* 2011;70:751.
- [34] Krischak GD, Janousek A, Wolf S, Augat P, Kinzl L, Claes LE. Effects of one-plane and two plane external fixation on sheep osteotomy healing and complications. *Clin Biomech* 2002;17:470.
- [35] Barton CA, Mc Millian WD, Crookes BA, Osler T, Bartlett CS. Compliance with the Eastern Association for the Surgery of Trauma guidelines for prophylactic antibiotics after open extremity fracture. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2012;2:57.
- [36] Niehaus AJ, Anderson DE, Samii VF, et al. Effects of orthopedic implants with a polycaprolactone polymer coating containing bone morphogenetic protein-2 on osseointegration in bones of sheep. *Am J Vet Res* 2009;70:1416.
- [37] Impellizzeri JA, Tetrack MA, Muir P. Effect of weight reduction on clinical signs of lameness in dogs with hip osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 2000;216:1089.
- [38] Caerio PJ, Da Costa RJ, Capela e Silva F, Rlavas C, Silverio CA, Simoes JA. The sheep as an animal model in orthopaedic research. *Exp Pathol Health Sci* 2008;2:29.
- [39] Turner AS. Animal models of osteoporosis - necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 2001;1:66.
- [40] Sumner-Smith G. Delayed unions and nonunions. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1991;21:745.
- [41] Weber BG, Cech O. Pseudarthrosis: pathology, biomechanics, therapy, results. Bern: Hans Huber Medical Publisher; 1976.
- [42] Piermattei DL, Flo GL. Fractures: classification, diagnosis, and treatment. In: Duncan L, Fathman L, Stringer S, editors. *Handbook of small animal orthopedics and fracture repair*. St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier; 2006. p. 25–159.
- [43] Boyan BD, Caplan AI, Heckman JD, Lennon DP, Ehler W, Schwartz Z. Osteochondral progenitor cells in acute and chronic canine nonunions. *J Orthop Res* 1999;17:246.

- [44] Márquez R. Biological and clinical characteristics of bone healing in the dog (*Canis familiaris*): a review [dissertation; in Spanish]. México (D.F.): Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2005.
- [45] den Boer FC, Patka P, Bakker FC, et al. New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry. *J Orthop Res* 1999;17:654.
- [46] Tyllianakis M, Deligianni D, Panagopoulos A. Biomechanical comparison of callus over a locked intramedullary nail in various segmental bone defects in a sheep model. *Med Sci Monit* 2007;13:BR125.
- [47] McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Jt Surg Br* 1978;60-B:150.
- [48] Park SH, O'Connor K, Sung R, McKellop H, Sarmiento A. Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model. *J Orthop Trauma* 1999;13:114.
- [49] Gugala Z, Lindsey RW, Gogolewski S. New approaches in the treatment of critical-size segmental defects in long bones. *Macromol Symp* 2007;253:147.
- [50] Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS. Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res* 2007;25:51.
- [51] Meinel L, Zoidis E, Zapf J, et al. Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation. *Bone* 2003;33:660.
- [52] Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials* 2006;27:1817.
- [53] Law HT, Annan I, McCarthy ID, et al. The effect of induced electric currents on bone after experimental osteotomy in sheep. *J Bone Jt Surg* 1985;67:463.
- [54] Schell H, Thompson MS, Bail HJ, et al. Mechanical induction of critically delayed bone healing in sheep: radiological and biomechanical results. *J Biomech* 2008;41:3066.
- [55] Epari DR, Schell H, Bail HJ, Duda GN. Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. *Bone* 2006;38:864.
- [56] Jäger M, Ott CE, Grünhagen H, et al. Composite transcriptome assembly of RNA-seq data in a sheep model for delayed bone healing. *BMC Genomics* 2011;12:158.
- [57] Rodriguez-Merchan EC, Forriol F. Nonunion: general principles and experimental data. *Clin Orthop Rel Res* 2004;419:4.
- [58] Pountos I, Georgouli T, Calori GM, Giannoudis PV. Do nonsteroidal anti inflammatory drugs affect bone healing? A critical analysis. *Scientific World J* 2012;2012:606404.
- [59] Gerstenfeld L, Thiede M, Seibert K, et al. Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Orthop Res* 2003;21:670.
- [60] Deguchi M, Rapoff AJ, Zdeblick TA. Posterolateral fusion for isthmic spondylolisthesis in adults: analysis of fusion rate and clinical results. *J Spinal Disord* 1998;11:459.
- [61] Pradhan BB, Tatsumi RL, Gallina J, Kuhns CA, Wang JC, Dawson EG. Ketorolac and spinal fusion. Does the perioperative use of ketorolac really inhibit spinal fusion? *Spine* 2008;33:2079.
- [62] Sucato DJ, Lovejoy JF, Agrawal S, Elerson E, Nelson T, McClung A. Postoperative ketorolac does not predispose to pseudoarthrosis following posterior spinal fusion and instrumentation for adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2008;33:1119.
- [63] Holtom PD, Pavkovic SA, Bravos PD, Patzakis MJ, Shepherd LE, Frenkel B. Inhibitory effects of the quinolone antibiotics trovafloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin on osteoblastic cells in vitro. *J Orthop Res* 2000;18:721.
- [64] Huddleston PM, Steckelberg JM, Hanssen AD, Rouse MS, Bolander ME, Patel R. Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. *J Bone Jt Surg Am* 2000;82:161.
- [65] Perry AC, Prpa B, Rouse MS, et al. Levofloxacin and trovafloxacin inhibition of experimental fracture-healing. *Clin Orthop* 2003;414:95.
- [66] Gerstenfeld LC, Al-Ghawas M, Alkhiary YM, et al. Selective and nonselective cyclooxygenase-2 inhibitors and experimental fracture-healing. Reversibility of effects after short-term treatment. *J Bone Jt Surg Am* 2007;89:114.
- [67] van der Heide HV, Hannink G, Buma P, Schreurs BW. No effect of ketoprofen and meloxicam on bone graft ingrowth: a bone chamber study in goats. *Acta Orthop* 2008;79:548.