



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA OSTEOSUSTITUCIÓN
CON UNA MEZCLA DE QUITOSAN Y HUESO
DESMINERALIZADO ALOGÉNICO EN LA REPARACIÓN
ÓSEA EN UN MODELO EN CONEJOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

HERNÁNDEZ MENDOZA FABIÁN OCTAVIO

ASESOR DE TESIS:

M. en C. ENRIQUE FLORES GASCA

**Coasesora Dra. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO
CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014**



Universidad Nacional
Autónoma de México



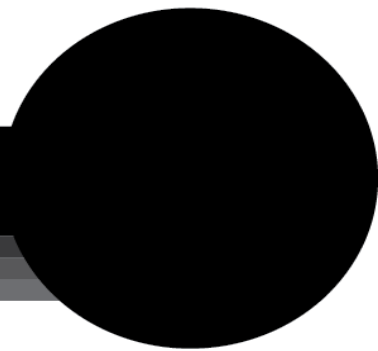
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

A g r a d e c i m i e n t o s



Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis de licenciatura, para mí es un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con aquellas personas que estuvieron involucradas directa o indirectamente en este trabajo, expresándoles mis agradecimientos. De manera especial y sincera agradezco al M. en C. Enrique Flores Gasca por invitarme a formar parte de esta investigación, por su apoyo y confianza en mi trabajo y por su capacidad para guiarme, no solamente en el desarrollo de esta tesis sino también en mi formación como investigador. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de estudiar en sus instalaciones y cumplir mi gran sueño en la vida. . . Ser Médico Veterinario Zootecnista.

A la Dra. Susana Patricia Miranda Castro por su colaboración brindada para la elaboración del biomaterial implantado en este proyecto experimental.

Dr. Jorge Tortora Pérez por su paciencia y apoyo durante la revisión histológica de las laminillas.

Al M. en C. German Garrido Fariña por el apoyo para el procesamiento histológico y al M. en C. Crisóforo Mercado Márquez por su disposición para el cuidado de los sujetos de estudio.

También quiero agradecer al Hospital de Enseñanza en Medicina y Cirugía de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (HEMC-FESC) por facilitarme el uso de las instalaciones y equipo de Rayos X.

A los Sinodales que formaron parte de este trabajo de tesis e hicieron aportaciones importantes para terminarlo. Gracias por su tiempo y atención.

A todos mis amigos que fui conociendo durante la carrera y que nos hemos ayudado en muchas cosas y los he llegado a apreciar demasiado.

Y a unas personas especiales que comenzaron siendo compañeros y se convirtieron en mis mejores amigos y colegas: Arizbeth O., Helen G., Jorge M. y Patricia B. Gracias por todo ese tiempo que pasamos juntos. He aprendido mucho de ustedes.

Dedicatoria

Le dedico este trabajo principalmente a mis padres por ofrecerme la oportunidad de haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. Por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional que he recibido durante este tiempo sin importar nuestras diferencias de opiniones. No es fácil llegar, se necesita ahínco, lucha y deseo. Ahora más que nunca se acredita mi admiración y respeto a ustedes.

Gracias por lo que hemos logrado.

Fabián Octavio Hernández Mendoza

ÍNDICE

Introducción	1
Justificación	5
Capítulo I : Marco Teórico	
1.Biopolimeros	8
1.1 Método de obtención del quitosán	10
1.2.1 Usos y aplicaciones del quitosán	11
1.3 Utilización de implantes inductores en el tratamiento de fracturas	12
1.3.1 Clasificación de los injertos	13
1.4 Fisiología del hueso	14
1.4.1 Matriz o componente orgánico	14
1.4.2 Matriz inorgánica	15
1.4.3 Mecanismo de la calcificación	15
1.4.4 Hueso reticular y hueso adulto	16
1.4.5 Elementos celulares	17
1.4.6 Desarrollo de los huesos	19
1.5 Patogenia y restauración de una fractura	20
Capítulo II	
2.1 Hipótesis	24
2.2 Objetivo General	24
Capítulo III: Materiales y Métodos	
3.1.1 Obtención del biomaterial	26
3.1.2 Sujetos de estudio	26
3.1.3 Cuidados pre-quirúrgicos	29
3.1.4 Cirugía	30
3.1.5 Cuidados post-quirúrgicos	30
3.1.6 Evaluación clínica	31
3.1.7 Evaluación de laboratorio	31
3.1.8 Evaluación radiológica	31
3.1.9 Evaluación histológica	32
3.1.10 Procesamiento histológico	32
Capítulo IV: Análisis e interpretación de resultados	

4.1.1 Evaluación clínica	35
4.1.2 Evaluación de laboratorio	36
4.1.2 Evaluación radiológica	38
4.1.3 Evaluación histológica	43
Capítulo V: Pruebas estadísticas	51
Capítulo VI: Discusión y conclusión	57
Bibliografía	65

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de la quitina	8
Figura 2. Estructura química del quitosán	9
Figura 3. Proceso de obtención del quitosán	10
Figura 4. Injerto de quitosán	26
Figura 5. Conejo canalizado	29
Figura 6. Zona de cirugía	29
Figura 7. Incisión	30
Figura 8. Defectos óseos	30
Figura 9. Evaluación radiológica post-quirúrgica semana 1	40
Figura 10. Evaluación radiológica post-quirúrgica semana 2	40
Figura 11. Evaluación radiológica post-quirúrgica semana 3	41
Figura 12. Evaluación radiológica post-quirúrgica semana 4	41
Figura 13. Evaluación radiológica post-quirúrgica semana 5	42
Figura 14. Evaluación radiológica post-quirúrgica semana 6	42
Figura 15. Corte histológico 10 X. Semana 3	45
Figura 16. Corte histológico 10 X. Semana 3	46
Figura 17. Corte histológico 10 X. Semana 4	47
Figura 18. Corte histológico 10 X. Semana 5	48

Figura 19. Corte histológico 10 X. Semana 6	49
Figura 20. Curva de distribución T	53

Índice de cuadros

Cuadro 1. Criterios de evaluación radiográfica de la respuesta perióstica	31
Cuadro 2. Criterios de evaluación radiográfica de la presencia de material radiopaco en el defecto	31
Cuadro 3. Diámetro latero-medial izquierda y derecha	51
Cuadro 4. Diámetro cráneo-caudal izquierda y derecha	52
Cuadro 5. Diámetro latero-medial izquierda	54
Cuadro 6. Diámetro latero-medial derecha	55
Cuadro 7. Diámetro cráneo-caudal izquierda	55
Cuadro 8. Diámetro cráneo-caudal derecho	56

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Diámetro medio lateral de la tibia control y experimental	35
Gráfica 2. Diámetro cráneo caudal de la tibia control y experimental	36
Gráfica 3. Valoración del conteo leucocitario	37
Gráfica 4. Valoración del conteo total de linfocitos	37
Gráfica 5. Valoración del conteo total de eosinófilos	38
Gráfica 6. Evaluación de la respuesta perióstica	39
Gráfica 7. Evaluación de la respuesta perióstica	39

Introducción



INTRODUCCIÓN

En cirugía ortopédica y traumatología, los injertos óseos se emplean con mucha frecuencia especialmente en el tratamiento de fracturas que no consolidan o tardan en hacerlo y para sustituir defectos en hueso secundarios a traumatismos y tumores. El tratamiento de los defectos óseos han sido objeto de controversia durante siglos. El hueso es capaz de regenerarse al ser dañado por medio de la creación de un tejido igual al original. De esta manera, cuando el hueso presenta soluciones de continuidad, ya sea por fracturas u otros defectos, se ponen en marcha de inmediato los mecanismos osteoformadores con la finalidad de restaurar el tejido óseo en el lugar de la lesión. Habitualmente, la dinámica del hueso es suficiente para reconstruir los defectos comunes, no obstante, en las pérdidas mayores de masa tisular se hace necesario recurrir al aporte de sustitutos óseos para obtener la reparación.^{1,2}

La reparación ósea puede considerarse como un fenómeno regenerativo debido a que se restablece la organización estructural característica, incluida la médula ósea y sus componentes.³ Los injertos y los sustitutos biológicos tienen la capacidad de promover mecanismos de reparación del receptor por lo que se han considerado en términos generales promotores de la osteogénesis y proveer de un soporte mecánico adecuado. La incorporación o integración de estos injertos o biomateriales pretenden proveer funciones como la osteoconducción y osteoinducción sobre la reparación ósea.⁴

El injerto óseo se introdujo en la práctica general de cirugía a comienzos del siglo XX.⁵

A pesar de las investigaciones recientes, aun no existe un material que reúna las propiedades de osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis y que pueda influir en la actividad biológica de los osteoblastos para formar hueso prácticamente normal durante la reparación o crecimiento óseo. Por otro lado los problemas de los biomateriales son la incapacidad de crecer o incluso el retraso en el crecimiento del tejido adyacente y la consecuente deformidad secundaria.⁶

Los injertos óseos tienen una función mecánica y biológica. En la interface injerto óseo-huésped existe una compleja relación donde múltiples factores pueden intervenir para una correcta incorporación del injerto, entre ellos se encuentran la vascularización del injerto, técnicas de conservación, factores locales, factores sistémicos y propiedades mecánicas (dependen del tipo, tamaño y forma del injerto utilizado).⁷

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

- I. **Osteogénesis:** Se refiere al aporte de células en el sustituto óseo, que si encuentran unas condiciones óptimas podrán transformarse en osteoblastos y/u osteocitos, y de esta forma participar en la formación de hueso nuevo.
- II. **Osteoinducción:** proceso de estimulación de células mesenquimales u osteocompetentes del huésped para que se diferencien en osteoblastos.
- III. **Osteoconducción:** Proceso por el que se facilita la formación de nuevo tejido óseo sobre un material externo o matriz que funciona de “andamiaje”. Este material osteoconductor facilitaría el proceso de orientación de los nuevos vasos sanguíneos y canales de Havers sobre los cuales se asentarán y proliferarán las células con capacidad regenerativa y comenzarán el proceso de formación de hueso.⁷

El concepto de osteoinducción fue introducido por Marshall R. Urist y su primer descubrimiento fue que la matriz ósea desmineralizada, contenía alguna propiedad que podría inducir la formación de hueso nuevo cuando era implantada en una localización extraesquelética en roedores. Posteriormente él y sus colaboradores identificaron una proteína morfofogenética ósea (BMP).⁷

La necesidad de tratar defectos óseos de diferente etiología, magnitud y localización ha estimulado enormemente la búsqueda y desarrollo de materiales capaces de sustituir al hueso.⁷

Los constituyentes tisulares de la matriz ósea son las células y la matriz extracelular. El componente principal de la matriz ósea es el colágeno; las proteínas que no son colágeno representan el 12%. La secuencia de sucesos como respuesta a la formación de hueso inducida por la matriz incluye la interacción de fibronectina, quimiotaxis, adhesión de células progenitoras, proliferación y diferenciación de estas células en osteoblastos y, finalmente, osteogénesis y desarrollo de elementos medulares. La utilización de hueso desmineralizado con fines terapéuticos tiene casi un siglo de antigüedad. Sin embargo no fue hasta la mitad del siglo XX cuando Urist y Cols. demostraron de forma consistente la osteoinducción por medio de hueso desmineralizado.⁷

La razón de la utilización de la matriz ósea se basa en la proposición de Urist sobre la existencia de una proteína en la matriz con propiedades osteoinductoras. Este efecto osteoinductor parece ser muy importante, no se ha demostrado que la histocompatibilidad represente un problema en los trasplantes alogénicos de matriz.⁷

La matriz ósea desmineralizada se obtiene por un proceso de extracción acida del calcio y fosfato desde el hueso donante cadáver. El producto extraído contiene colágeno tipo 1, proteínas no colágenas, y factores de crecimiento osteoinductivos, incluidas las BMPs.⁷

La capacidad osteoinductora de la MOD está íntimamente relacionada con las condiciones de su extracción, procesamiento y almacenaje.⁷

De manera ideal un injerto óseo debe tener estas tres propiedades, además de ser biocompatible y proporcionar estabilidad biomecánica.⁸

El sustituto ideal debería ser osteogénico, biocompatible, bioabsorbible, capaz de proporcionar soporte estructural y de vehiculizar otras sustancias, fácilmente utilizable en clínica y con una adecuada proporción costo-beneficio.⁸

Un biomaterial es una sustancia biocompatible, natural o sintética, o combinación de sustancias que puestas en contacto con los tejidos vivos o los fluidos biológicos, no afectan de forma adversa a los constituyentes biológicos del conjunto del organismo.⁹

El quitosán es un polisacárido que se obtiene mediante desacetilación alcalina de la quitina, homopolímero presente en los exoesqueletos de crustáceos, moluscos, en la cutícula de insectos y en las paredes celulares de muchos hongos. Recientemente se ha generado mucha atención al uso del quitosán ya sea solo o combinado con otros elementos, como agente curativo de heridas, agente antimicrobiano, en sustitución de injerto de piel y como agente hemostático. En diferentes ensayos realizados *in vitro* se ha demostrado una buena histocompatibilidad de este material, ya que el quitosán permite el crecimiento y proliferación de células vasculares, neuronales, epiteliales, fibroblastos, osteoblastos y condrocitos.¹⁰

La mezcla del quitosán con algunos otros compuestos como las proteínas morfogénicas óseas, la hidroxiapatita, cementos de fosfato de calcio, dióxido de silicio y óxido de circonio, entre otros, han permitido el desarrollo de nuevas alternativas para la regeneración ósea.^{11,12,13}

Justificación



JUSTIFICACIÓN

El empleo de injertos óseos como alternativa de reconstrucción de defectos óseos, ya sean congénitos u ocasionados (como traumatismos, secuelas oncológicas e infecciosas) tienen como finalidad restablecer la integridad anatómica y funcional de la estructura alterada. Durante décadas, los investigadores se han dado a la tarea de encontrar en los injertos ciertas características que respondan a cada una de las necesidades de reconstrucción; este hecho ha llevado a estudiar y comparar diversos materiales, sin embargo, estos no poseen la capacidad natural de inducir el proceso de regeneración ósea, haciendo de ellos materiales inertes biocompatibles de "relleno", que no sustituyen las características de estos, pero utilizados conjuntamente si así se requiere, pueden mejorar los resultados.

Las lesiones óseas causadas por trauma, con pérdida de material, osteonecrosis y tumores han sido tratados con injertos autólogos, alogénicos o xenogénicos; en otros casos, implantando materiales sustitutivos pudiendo ser obtenidos de forma natural o sintética, entre los que destacan aleaciones metálicas, polímeros, cerámicas y cementos óseos. Por otro lado y debido a la problemática, como la escasez de donantes, la transmisión de enfermedades, la morbilidad del sitio de extracción y la reacción de materiales ante condiciones fisiológicas, hace necesaria la búsqueda de soluciones donde la ingeniería de tejidos aparece como una opción para restaurar, mantener o mejorar la función mediante la creación de sustitutos biológicos.^{15,16}

Hemos seleccionado un modelo experimental de 12 conejos de la raza Nueva Zelanda adultos en el que se pretende evaluar si el empleo de quitosán y hueso desmineralizado va a mejorar la respuesta local del hueso. Es decir, si la regeneración ósea en el lugar del injerto del biomaterial va a ser más rápida y de mejor calidad que sin la utilización del mismo. Evaluando la capacidad de osteointegración; radiológicamente la osteosíntesis; histológicamente la neoformación, integración, respuesta inflamatoria a diferentes tiempos en tibias de conejos como una alternativa para el tratamiento de fracturas. Cabe mencionar que en la FESC ya se han realizado trabajos con esta especie.

La utilización del conejo como objeto de estudio, radica en que ha sido descrito en varios artículos internacionales que pueden ser consultados en las siguientes referencias 42,43,44,45,55,61,72,73, como modelo para probar diferentes técnicas y materiales en la investigación de la osteogénesis, y que puede compararse al efecto en otras especies por su parecido anatómico y fisiológico.

De los animales de laboratorio, el conejo es un animal dócil, fácil de estabular, es relativamente simple de anestésiar y tiene un bajo costo de alimentación lo que lo hace útil en investigación experimental. Presenta una estructura ósea semejante a la humana y ha sido frecuentemente empleado para la investigación de implantes óseos regularmente utilizando diáfisis de huesos largos como fémur o tibia¹⁴. Además de ser un modelo que puede usarse como referencia en la investigación científica.

Todos los animales utilizados en este trabajo serán tratados de acuerdo a las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO.1999 y de la *Guide for care and use of laboratory animals* de los Estados Unidos.

Marco Teórico

Capítulo

1

BIOPOLÍMEROS

La quitina y el quitosán son elementos orgánicos, producidos fundamentalmente por invertebrados y crustáceos en el agua dulce y salada respectivamente. La quitina es un polisacárido biodegradable que forma una sustancia cornea y es el principal constituyente del exoesqueleto de insectos, crustáceos y arácnidos. La quitina es blanca, dura, inelástica y es la mayor fuente de contaminación superficial de las aéreas cercanas al mar. Se conoce como 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa con uniones β (1-4) como se presenta en la siguiente figura.¹⁷

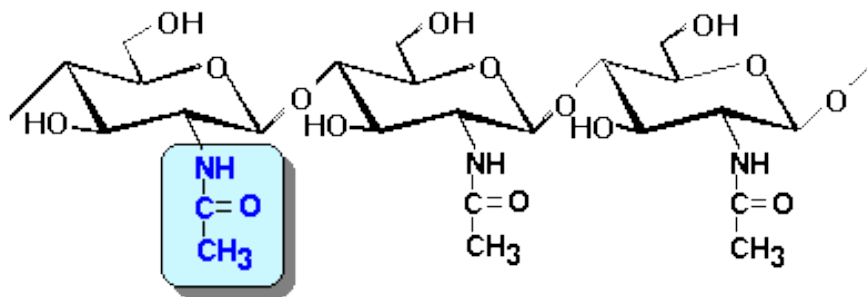


Figura 1. Estructura química de quitina³¹

En este biopolímero los grupos aminos se encuentran acetilados, por lo que la quitina corresponde a una amina de ácido acético. Este aminopolisacárido es de tipo lineal, llegando a formar cadenas de miles de unidades de N-acetilglucosamina. Es capaz de sufrir modificaciones químicas, obteniéndose un gran número de derivados que presentan diferentes propiedades físicas y químicas con diversas aplicaciones.¹⁷

El quitosán se obtiene por lo general de la desacetilación de la quitina, también se encuentra en ciertos hongos. Sus propiedades antifúngicas, biocompatibles, biodegradables, antimicrobianas, emulsionantes, absorbentes de grasas, adsorbente de metales contaminantes etc., hacen que sea considerado de gran aplicación en distintos campos de la industria.¹⁸

Es un sólido blanco amorfo, insoluble en agua, soluble en ácidos. Químicamente es un poli (β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina), como se observa en la figura 2. Debido a que hay una desacetilación a partir de la quitina en la que los grupos acetilo han sido eliminados, por consiguiente en el quitosán el grupo amino se encuentra libre como amina primaria.¹⁸

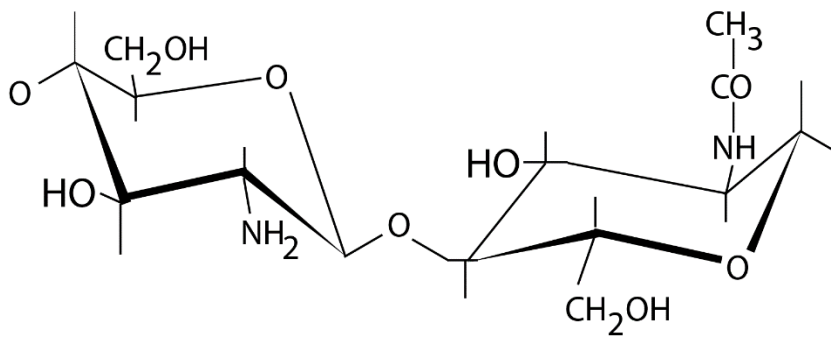


Figura 2. Estructura química del quitosán³¹

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE QUITINA Y QUITOSÁN

La producción industrial de quitina y quitosán se realiza a partir de exoesqueletos de cangrejo y camarón, desechados de las industrias pesqueras y en la figura 3 se muestra el procedimiento para la obtención del quitosán.¹⁸



Figura 3. Proceso de obtención de quitina-quitosán (Larez 2006)

USOS Y APLICACIONES DE LA QUITINA Y QUITOSÁN

Las aplicaciones de estos biopolímeros se iniciaron en la década de los 70's, que en un principio fueron para el tratamiento de aguas efluentes, procesamiento de alimentos y quelación de iones metálicos. Actualmente la tendencia consiste en la producción de derivados de valor agregado como por ejemplo aquellos usados en la industria cosmética, farmacéutica, alimenticia y medicina.¹⁸

En la actualidad, entre los usos médicos más sencillos de estos materiales se puede mencionar:

- 1) Producción de suturas quirúrgicas a partir de quitina.
- 2) Producción de gasas y vendajes tratados con quitosán.
- 3) Cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras
- 4) Cicatrización de heridas
- 5) Anticoagulante
- 6) Tratamiento de enfermedades óseas.¹⁸

El quitosán aumenta las funciones de las células inflamatorias tales como leucocitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos (fagocitosis, producción de interleucina (IL-1), factor de crecimiento transformante B1 y factor de crecimiento derivado de plaquetas) como resultado, éste promueve la granulación y la organización. Estos inducen a los fibroblastos para liberar interleucina-8, que intervienen en la migración y proliferación de fibroblastos y células endoteliales. También promueven la angiogénesis y la expresión de citosinas, además de que los oligosacáridos de quitosán tienen un efecto estimulante en los macrófagos, donde el quitosán como la quitina son quimioatrayentes para los neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto este biopolímero puede estimular la cicatrización de heridas, ya que promueve la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular.^{19,20,21}

Una peculiaridad del quitosán es la capacidad de fomentar una adecuada formación de tejido de granulación acompañado de la angiogénesis y la deposición regular de las fibras de colágeno. De hecho, los principales efectos bioquímicos de quitina y quitosán son activación de los fibroblastos, la producción de citosinas, la migración de células gigantes y la estimulación de la síntesis de colágeno tipo IV.²¹

La hemostasia se obtiene inmediatamente después de la aplicación de la mayoría de los productos comerciales de la quitina basada en apósitos para heridas traumáticas y quirúrgicas. Para promover la angiogénesis es necesario apoyar la formación de tejido fisiológicamente ordenado, regulando la producción del crecimiento endotelial. El quitosán ha demostrado que proporciona inhibición de la proliferación bacteriana en el tratamiento de heridas infectadas.

Además se demostró que el éste biopolímero tiene la capacidad para promover el reclutamiento de células osteoprogenitoras, lo que facilita la formación de hueso, además de que también estimula la médula ósea. Por otra parte es capaz de activar las defensas del hospedero para prevenir la infección, ofreciendo así una alternativa al uso de antibióticos.^{19,21,22,23,24,25}

Los ensayos clínicos efectuados con el fin de promoverlo como biomaterial, no reportan reacciones alérgicas después de la implantación, inyección, ingestión o aplicación tópica en el cuerpo humano.¹¹

De este biomaterial también se crean andamios con propiedades mecánicas que dependen en gran medida del tamaño de los poros y las orientaciones de los poros. Los andamios pueden aumentar la reparación ósea mediante el apoyo a la proliferación de las células osteoblásticas, así como su diferenciación. Han reportado cierta actividad osteogénica y la mineralización en defectos óseos artificialmente en modelos animales.^{19,22}

UTILIZACIÓN DE IMPLANTES INDUCTORES EN EL TRATAMIENTO DE LAS FRACTURAS

Para que se produzca el crecimiento óseo en un defecto es necesario que exista un coágulo sanguíneo, la conservación de los osteoblastos y el contacto con el tejido vivo.²⁶ Los mecanismos biológicos que participan en la neoformación ósea varían según el tipo de injerto que se emplee y según Baladron²⁷ podríamos resumirlos en:

- I. **Osteogénesis:** formación de hueso nuevo por las células que sobreviven en el injerto. Esta actividad se produce principalmente en las cuatro semanas tras la colocación del mismo. El injerto de hueso esponjoso trabecular es más osteogénico que el cortical ya que presenta mayor cantidad de células osteoprogenitoras. Sin embargo, hay que destacar que sólo sobrevivirán las células que se encuentren a menos de 300µm de una fuente de aporte sanguíneo, mientras que todas las demás células morirán antes de que les lleguen los nutrientes necesarios por difusión.²⁸
- II. **Osteoconducción:** el injerto sirve de guía para el crecimiento óseo ya que es progresivamente colonizado por vasos sanguíneos y células osteoprogenitoras de la zona receptora, que van lentamente reabsorbiéndolo y depositando hueso nuevo. Esta propiedad la poseen el hueso autólogo, la hidroxiapatita reabsorbible, el hueso desmineralizado y los cristales bioactivos entre otros.²⁹

- III. **Osteoinducción:** transformación de las células mesenquimales indiferenciadas perivasculares de la zona receptora en células osteoformadoras. Esta fase comienza a las dos semanas de la colocación del injerto y alcanza su máximo nivel entre las seis semanas y los seis meses posteriores, disminuyendo más tarde en forma progresiva.

Se realizó la clasificación actual de injertos de acuerdo con su origen y estructura, con el propósito de establecer algunas de sus características más importantes, que permitan al cirujano realizar la elección adecuada basado en las necesidades estructurales y funcionales requeridas³⁰. Según estos criterios, los injertos han sido clasificados en:

- I. **Autólogos (autoinjertos):** este tipo de injerto se compone por tejido tomado del mismo individuo, y proporciona mejores resultados, ya que es el único que cumple con los 3 mecanismos de regeneración ósea (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción), además evita la transmisión de enfermedades y el rechazo inmunológico.
- II. **Homólogos (aloinjertos):** se componen de tejido tomado de un individuo de la misma especie, no relacionado genéticamente con el receptor; cuenta con capacidad osteoinductiva y osteoconductor, y según Betts, 1991 "se comporta como una estructura que permitirá la neoformación ósea a partir del remplazo gradual que sufre el injerto por el hueso del hospedero, haciendo este proceso lento y con considerable pérdida de volumen". Existen 3 tipos de aloinjertos óseos: congelados, desecados (liofilizados) y desmineralizados.
- III. **Isogénicos (isoinjertos):** se componen por tejido tomado de un individuo genéticamente relacionado con el individuo receptor.
- IV. **Heterólogos (xenoinjertos):** se componen de tejido tomado de un donador de otra especie, además clínicamente no son aceptables debido a su gran antigenicidad.^{30,32,33,34}

La incorporación del injerto depende tanto del implante como del receptor. La secuencia histológica de los fenómenos que acontecen en la incorporación de los injertos óseos se caracterizan inicialmente por la formación del hematoma, la necrosis del injerto y la inflamación. Se produce el crecimiento del tejido fibrovascular. La naturaleza más porosa del hueso esponjoso permite una revascularización más rápida y una incorporación más completa que para el hueso cortical. La fase de reabsorción protagonizada por los osteoclastos precede a la formación de hueso nuevo. La formación de hueso nuevo se lleva a cabo por los osteoblastos que depositan osteoide en la superficie del injerto.

Los aloinjertos de hueso fresco contienen células, glucoproteínas de la matriz, enzimas y mucopolisacáridos, siendo todos ellos inmunógenos. El principal componente inmunogénico en los trasplantes de hueso alogénicos es la médula. Al procesar el aloinjerto se destruyen las células de la médula, osteocitos y en distinto grado se afectan enzimas y colágeno. La congelación y la congelación en seco (liofilizada) reducen la inmunogenicidad.

Desgraciadamente, no se afectan ni las enzimas capaces de degradar a los constituyentes de la matriz esenciales para la inducción de hueso, ni las proteínas responsables de la reacción de hipersensibilidad retardada.

FISIOLOGÍA DEL HUESO

El hueso está constituido por diminutos cristales incrustados en una densa trama de fibras de colágeno envuelta por una masa de cemento mucopolisacárido o matriz osteoide. Esta íntima disposición proporciona una gran consistencia, solidez y elasticidad al órgano. Un análisis del hueso pone de relieve los siguientes constituyentes.³⁵

- | | |
|---|-----|
| ➤ Sales minerales (por lo común calcio y fosforo) | 37% |
| ➤ Materia orgánica | 19% |
| ➤ Agua | 44% |

MATRIZ O COMPONENTE ORGÁNICO

La matriz orgánica del tejido óseo está constituida por un 90% de fibras colágenas y un 10% de sustancia fundamental. Las fibras colágenas de la matriz ósea son segregadas en forma de precursores por los osteoblastos o bien, como ocurre en el caso del cartílago hialino, por los condrocitos. En el hueso, el colágeno es de tipo I mientras que en el cartílago es de tipo II.³⁵

El segundo constituyente de la matriz, la llamada sustancia fundamental, es un material extracelular e interfibrilar común a todos los tejidos conectivos.³⁵

La matriz orgánica (osteoide) proporciona:

- 1) Armazón o trabéculas para el depósito de las sales minerales
- 2) Un medio químico adecuado para la precipitación de sales de calcio para formar el hueso.³⁵

MATRIZ INORGÁNICA

Está constituido por cristales hexagonales de hidroxiapatita, aunque coexisten pequeñas proporciones de fosfato cálcico amorfo, fosfato tricálcico, etc.

Existe un intercambio iónico entre los cristales de hidroxiapatita y su alrededor, siendo un fenómeno complejo que acepta 3 variantes:

1. Intercambio automático e instantáneo de calcio y fósforo circulantes con la capa de hidratación del cristal óseo.
2. Intercambio rápido entre la capa de hidratación y la capa ionizada del cristal.
3. Intercambio lento, entre la capa ionizada del cristal y la profundidad del cristal que renueva constantemente su composición iónico a lo largo de su maduración y antes de ser destruido.³⁵

MECANISMO DE LA CALCIFICACIÓN

- I. **Fase de prenucleación.** El osteoblasto fabrica moléculas de proteopolisacáridos, que precisan una modificación química previa para transformarse en un medio osificable (facultad de un tejido para recibir sales de calcio).³⁵
- II. **Fase de nucleación.** Precisa de un factor inductor de la calcificación, que son las fibras de colágena. Los cristales de hidroxiapatita están adosados a las zonas de mayor densidad de las fibras colágenas, se requiere, además la presencia de la enzima pirofosfatasa, que se encuentra en la sustancia fundamental del hueso, la cual actuando sobre los pirofosfatos, los destruye y evita la acción de freno de los mismos sobre la calcificación.³⁵
De la misma forma se precisa una proteína plasmática de transporte de calcio que lo libere al territorio intracelular.³⁵
- III. **Fase de cristalización.** Se produce la configuración y disposición espacial de los cristales de hidroxiapatita, cuya precipitación ya se realizó en la fase de nucleación.³⁵

HUESO RETICULAR Y HUESO ADULTO

Se distinguen dos formas de hueso: inmaduro (reticular o embrionario) y maduro.

- I. **Hueso inmaduro, reticular o embrionario.** Tiene la peculiaridad de que las trabéculas se disponen de forma anárquica, al igual que las fibras y las células.
- II. **Hueso maduro o del adulto.** Se distinguen a su vez, dos formas: esponjoso y cortical.
- III. **Hueso esponjoso.** Se caracteriza por que las trabéculas están dispuestas paralelamente entre sí. Son prototipo de este hueso las epífisis proximales del húmero y del fémur.³⁵

El hueso maduro cortical se localiza en la diáfisis del hueso, entre el endostio que tapiza la cavidad medular y el periostio. Se distinguen cuatro sistemas fundamentales:

- 1) Sistema o línea fundamental subperióstica, localizada inmediatamente por debajo del periostio.
- 2) Sistema o línea fundamental paramedular, localizada concéntricamente a la cavidad medular.
- 3) Osteonas o conductos de Havers (unidad funcional del hueso). Se disponen en láminas concéntricas adosadas entre sí y presentan en su centro un vaso, al que se abren otros procedentes de los canalículos de Wolkman, de disposición perpendicular a los conductos de Havers y por los que circulan también vasos que van desembocando en aquel vaso central.
- 4) Líneas intersticiales. Se localizan entre las osteonas.³⁵

VASCULARIZACIÓN NORMAL DEL HUESO

Un riego sanguíneo adecuado del hueso es necesario para que éste desarrolle su función fisiológica normal. Clínicamente, la mayoría de los problemas vasculares se produce en los huesos largos. El flujo sanguíneo de estos huesos procede de tres fuentes: el sistema vascular aferente, el sistema vascular intermedio del hueso compacto y el sistema vascular eferente. El sistema aferente transporta sangre arterial y comprende la arteria nutricia principal, las arterias metafisarias y arteriolas periósticas en las uniones musculares.⁵

Los vasos de los huesos compactos son intermedios entre los sistemas aferentes y eferentes, y funcionan como una red vascular, donde se produce el intercambio entre la sangre y el tejido vivo adyacente.

Este sistema está compuesto por los canales corticales de Havers y Volkman y los diminutos canalículos que transportan nutrientes a los osteocitos.⁵

El sistema de drenaje venoso (eferente) del hueso cortical se produce en la superficie del periostio. La sangre que circula a través de la corteza es básicamente centrifuga, desde la médula al periostio. También existe otro drenaje venoso desde la cavidad medular; sin embargo, este sistema está relacionado con la actividad hematopoyética de la cavidad medular.⁵

El hueso no es una estructura inerte, si no en constante renovación. Se está formando y destruyendo hueso sin cesar, de manera continua. Constantemente se fabrica hueso nuevo a nivel subperióstico, endóstico, trabecular y en la zona haversiana y al mismo tiempo se destruye de forma continua en esas áreas.⁵

En la producción de células específicas óseas intervienen dos sistemas celulares: el sistema hematopoyético y el sistema mesenquimal. Los osteoclastos se derivan del sistema hematopoyético, específicamente de los fagocitos mononucleares. Los osteoblastos, osteocitos, los condroblastos y los condrocitos se desarrollan a partir del sistema mesenquimal. Ambos sistemas contienen células indiferenciadas verdaderas, que se dividen para producir una célula que se diferenciara y otra que mantendrá las funciones de las primeras.⁵

Las células indiferenciadas del sistema mesenquimal se denominan células osteoprogenitoras. Estas generan condroblastos, osteoblastos y fibroblastos.⁵

ELEMENTOS CELULARES

Las células encontradas en el hueso son:

1. Osteocitos, que mantienen la vida y la estructura del hueso
2. Osteoblastos, que están presentes en los lugares donde se forman nuevos huesos, la producción de matriz y su mineralización final.
3. Osteoclastos, que son células gigantes multinucleadas que se encuentran en los lugares donde tiene efecto la resorción del hueso.
 - **Preosteoblastos.** Son células precursoras de los osteoblastos y tienen las siguientes características:
 1. No se suelen disponer en hileras, a diferencia de lo que ocurre con los osteoblastos.
 2. Tiene un índice mitótico muy elevado.
 3. Sintetizan fosfatasa alcalina

4. Sintetizan mucopolisacáridos

➤ **Osteoblastos.** Se diferencian en dos tipos:

1. Activos: forman hileras en la superficie de todo tejido óseo en formación; tienen morfología cuboidea.
2. Inactivos: su forma es fusiforme.³⁵

Los osteoblastos, entre sus funciones principales:

1. Fabrican el colágeno y los mucopolisacáridos del tejido óseo, que constituye la matriz orgánica ósea calcificable, llamada osteoide por Virchow, en 1853.
2. Sintetizan fosfatasa alcalina que puede encontrarse en el citoplasma de las células viejas y en el núcleo de las jóvenes.³⁵

Aproximadamente el 10% de los osteoblastos son incluidos en la matriz transformándose en osteocitos. El resto de ellos probablemente mueren a medida que la sustancia mineral de la matriz los atraviesa. Su lugar es ocupado por nuevos osteoblastos derivados de las células osteoprogenitoras.³⁵

➤ **Osteocitos.** Casi todos los osteocitos se originan tras la inclusión de los osteoblastos en el osteoide, que luego se mineraliza. Algunos otros se desarrollan por metaplasia a partir de fibrocitos. Los osteocitos del tejido laminar maduro son células planas u ovaladas con varias ramificaciones que llenan los canalículos y que se anastomosan con las ramificaciones de otros osteocitos. Las cavidades donde habitan los osteocitos se denominan lagunas.³⁵

La actividad principal de los osteocitos profundos es la desmineralización y remineralización del tejido óseo perilacunar lo cual ayuda a mantener la homeostasis del calcio.³⁵

➤ **Osteoclastos.** Presentan las siguientes características:

1. En cuanto a su morfología, constituyen células gigantes de tamaño variable que contienen 15-20 núcleos, presentan en su citoplasma una gran concentración de vacuolas.
2. No tienen capacidad osteoformadora.
3. El mecanismo de reabsorción de hueso se lleva a cabo en dos fases: en un primer momento fabrican enzimas que, actuando sobre la sustancia fundamental, modifican su composición química; en una segunda fase se produciría la fagocitosis.³⁵

DESARROLLO DE LOS HUESOS

En el embrión, los huesos pueden desarrollarse de dos maneras, pero ambas comienzan por condensación de células mesenquimales. Una de estas formas es la osteogénesis intramembranosa, la cual implica el depósito y la mineralización de un disco de matriz extracelular realizado por células mesenquimales diferenciadas. El segundo método de formación ósea es por osteogénesis endocondral. Esto implica la diferenciación de las condensaciones mesenquimales en condroblastos y condrocitos productores de una plataforma mineralizada sobre la cual se deposita tejido óseo.³⁵

Las células mesenquimales conservan la capacidad de diferenciarse en osteoblastos o condroblastos a lo largo de toda la vida y el tejido cartilaginoso formado se sustituye frecuentemente por tejido óseo mediante el proceso de osificación endocondral.

La génesis del hueso gira alrededor de estos pasos básicos:

- 1) Se produce la proliferación epifisiaria condroblástica que mantiene el grosor de la placa epifisiaria.
- 2) Se forma el condroide intracelular.
- 3) Maduran los condroblastos y se disponen ellos mismos en columnas.
- 4) Se mineralizan las barras condroides (calcificación provisional)
- 5) La granulación metafisiaria invade las bases de las columnas del cartílago celular.
- 6) Se forman los osteoblastos a partir de fibroblastos o células endoteliales.
- 7) Se forma la matriz osteoide.
- 8) Se depositan en el osteoide las sales minerales.
- 9) Se desarrolla la estructura esponjosa primaria, y después la estructura esponjosa secundaria.
- 10) Los huesos jóvenes se modelan de acuerdo a su estructura adulta.³⁵

El mantenimiento de hueso es un proceso constante debido a la erosión producida por la actividad catabólica normal. Los huesos proporcionan el soporte esquelético, la protección de determinadas estructuras, la inserción muscular, la reserva de sales minerales y la médula ósea. Se han descrito tres formas de hueso, a saber:

- **Hueso cortical o compacto:** Constituye el sólido soporte del armazón o de una superficie exterior; está compuesto de capas con conductos longitudinales que contienen nervios y vasos sanguíneos (conductos de Havers). Circundando los conductos están las capas o anillos. Estos anillos son concéntricos, y poseen lagunas que contienen osteocitos.

- **Hueso esponjoso:** Se encuentra en la superficie interior del hueso compacto. Formado por un enrejado de células, se nutre directamente a partir de la medula ósea y posee un sistema haversiano.
- **Hueso medular:** Representa el tejido encontrado en la cavidad de la medula ósea y los interespacios del hueso esponjoso. En los animales jóvenes la medula ósea es roja; con la edad se vuelve adiposa, y la actividad hematopoyética está confinada a la epífisis proximal del fémur y el humero, en lo que respecta a la implicación de los huesos largos. La medula roja está presente en el curso de toda la vida en el esternón, costillas, vertebras, cráneo y pelvis.³⁵

RESPUESTA DE VASCULARIZACIÓN DESPUÉS DE UNA FRACTURA

La alteración del flujo sanguíneo normal del hueso varía según la complejidad de la fractura. Los componentes del sistema vascular aferente son estimulados y responden con la hipertrofia, aumentando en diámetro y número. Además, se desarrolla un nuevo flujo sanguíneo, denominado extraóseo del hueso cicatrizante, a partir de los tejidos blandos adyacentes inmediatos. Este flujo lleva sangre a los fragmentos óseos desprendidos, la corteza desvitalizada y al callo perióstica en desarrollo. Cuando se establece la estabilidad en el punto de la fractura y la continuidad de la circulación medular, el flujo sanguíneo extraóseo desaparece. Afortunadamente, la capacidad regeneradora del flujo arterial medular es rápida y enorme, ya que este sistema debe restablecerse para que cicatrice el hueso cortical.⁵

PATOGÉNIA Y RESTAURACIÓN DE UNA FRACTURA

El hueso se fractura cuando es sometido a tensiones de corta duración. Watson-Jones describe una fractura como “una ruptura del tejido conectivo vivo y su restauración se consigue mediante el crecimiento celular que caracteriza el restablecimiento de todos los tejidos vivos”.³⁶

Cuando un hueso se fractura, se desgarran y sangran grandes cantidades de vasos periostales y medulares de tamaños diversos. Las consecuencias de la lesión vascular son, en primer lugar, la formación de un coagulo, y en segundo lugar, la interrupción de la circulación local con la subsiguiente isquemia y necrosis.³⁶

La gravedad de estos hechos depende del número y tamaño de los vasos afectados, siendo máxima cuando se altera la arteria nutricia del hueso. Si solo se lesionan los vasos pequeños, la circulación se interrumpe por detrás del punto de anastomosis con un vaso en el cual la sangre continua fluyendo. La medula necrosada se elimina por licuefacción y fagocitosis. El tejido óseo muerto, representando por los osteocitos muertos, picnoticos y eventualmente por disolución de los osteocitos, es eliminado por osteoclastosis. Se trata de un proceso muy lento que continúa por un periodo prolongado tras la unión de los fragmentos por la formación del callo, y finaliza cuando este último ha sido remodelado.³⁶

La tasa basal de remodelación cortical aumenta en esta zona, probablemente por el estímulo que representa el hueso muerto. La estabilización de los fragmentos de una fractura conduce generalmente a la restauración del hueso. Normalmente una fractura se restaura en:

1. Hemorragia en la zona
2. Formación de coagulo
3. Inflamación y edema
4. Proliferación de células mesenquimatosas y pluripotenciales
5. Formación y vascularización del callo
6. Formación de hueso y cartílago (osificación del callo)
7. Remodelación del callo para restablecer el hueso normal.⁵

El destino del coagulo que se forma en las adyacencias de los extremos del hueso fragmentado, varía según su localización. Las células mesenquimatosas que invaden los coágulos medulares son ontogénicas, por los que en ellos se forma tejido óseo trabecular. En la superficie periostal, la reparación no interfiere con la organización del coagulo, que se lisa.⁵

Puesto que localmente es insuficiente la cantidad de fibrinógeno disponible se forma un coágulo con todo lo que llena la zona; a medida que el coágulo se contrae se congrega suero en el lugar de la fractura (procallo). Puesto que los osteocitos están estrechamente vinculados a su abastecimiento vascular, el cese de la provisión de sangre causa su muerte hasta una distancia considerable del lugar de la fractura. La restauración de la fractura impone el reemplazamiento de los osteocitos muertos por osteoblastos, que a su vez producen hueso nuevo. El callo está compuesto por tejido óseo fibroso.⁵

La formación de callo puede subdividirse, según la localización, en callo de puente medular, de puente perióstico o de puente intercortical.⁵

El callo externo, que suele ser el más importante, es producido por el periostio, mientras que el callo interno está formado por el endostio, células primitivas de la cavidad medular y las escasas células osteogénicas que revisten los canales vasculares (canales de Havers). La agresión subletal representa el estímulo para la proliferación del periostio y su capa interna osteogénica prolifera por mitosis, decreciendo el grado de actividad al alejarse de los extremos del fragmento. La proliferación periostal se pone en marcha dentro de las 24 horas de la agresión. La diferenciación de los osteoblastos, con producción y mineralización temprana de las trabéculas irregulares del hueso se alcanza en una semana.³⁶

La concentración de las sales minerales en la matriz aumenta progresivamente pero puede no ser suficiente como para producir una sombra radiológica antes de dos semanas.³⁶

Las fracturas abiertas se infectan, si esto no se controla adecuadamente puede sobrevenir periostitis y osteomielitis purulenta. La inflamación bacteriana aguda inhibe el intento de reparación ósea de modo que se retrasa la resorción del tejido óseo necrótico y la formación de tejido óseo nuevo.³⁶

Si el proceso infeccioso se vuelve crónico, la osteogénesis puede comenzar en el límite entre los tejidos nuevos y enfermos, con lo que se produce un gran callo que contiene tejido inflamatorio y fistulas. Cuando grandes fragmentos de huesos se necrosan durante el proceso inflamatorio pueden ser secuestrados como sucede en la osteomielitis.³⁶

Existen diversas razones que impiden la unión ósea, entre las cuales citaremos: inmovilidad inadecuada durante la reparación, que expone al hueso a continuas torsiones, golpes y acodamientos; osteomielitis que inhibe la osteogénesis reparadora; falla en el restablecimiento de la circulación; disminución en la capacidad regenerativa de los tejidos tal como puede suceder en la caquexia de cualquier causa, senilidad, isquemia, o pérdida de neurotropismo. Quizá la causa más común sea la infección y ausencia de vascularización en el punto de fractura. Un factor constante en varias de las otras causas es el desgarramiento extenso y la lesión del periostio que da origen al callo externo.³⁶

**Hipotesis de
trabajo
y objetivos**

Capítulo

2

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de osteointegración de una mezcla de quitosán y hueso desmineralizado alogénico en la reparación ósea en osteotomías en conejos.

OBJETIVO PARTICULAR

Evaluar clínica, radiológica y microscópicamente la integración de una mezcla de quitosán y hueso desmineralizado alogénico en un defecto óseo en conejos.

HIPÓTESIS

Si el uso del quitosán a través de sus propiedades biomoleculares de biodegradación, compatibilidad y adaptación en tejidos puede ser utilizado en la producción de materiales sustitutos de hueso, entonces, al aplicarse en un defecto óseo en conejos se integrara satisfactoriamente durante el proceso de la reparación ósea.

Materiales y Metodología

Capítulo

3

MATERIALES

OBTENCIÓN DEL BIOMATERIAL

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 (FES-C), ubicada en Km 2.5 Carretera Cuautitlán–Teoloyucan, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México CP.54714.

El biomaterial fue elaborado y obtenido por donación del laboratorio de Biotecnología de la FESC- C1. Solicitud de patente: “Proceso para la extracción de quitina a partir de crustáceos y su conversión a quitosán”. En trámite. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. No. De expediente 005444. Mayo 31 (2000). No. De folio 11 75 930-5.

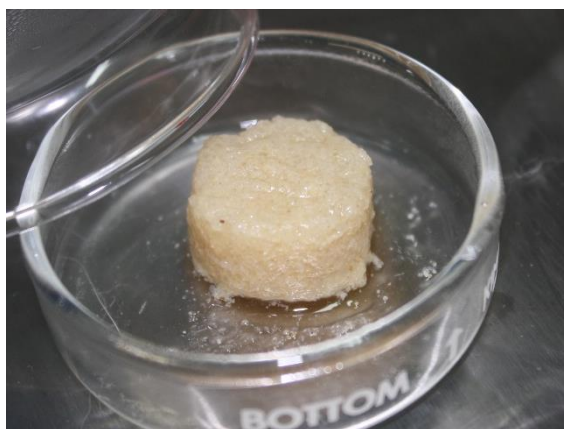


Figura 4. Quitosán

SUJETOS DE ESTUDIO

Se utilizaron 12 conejos nueva Zelanda, machos, sanos, con un peso promedio de 3.5 kg de peso, los sujetos de estudio permanecieron durante toda la parte experimental en la Unidad de Aislamiento y Bioterio UIM. Alojándose individualmente en racks de acero inoxidable, en jaulas de 69x 60x 34.5cm, con piso de reja bajo el cual se encuentra una bandeja removible para recoger orina y heces sin contacto con los animales; con 1 comedero de acero inoxidable, bebederos automáticos, temperatura de 19-21 grados Celsius, humedad relativa

40-50%, entrada de aire filtrado. Agua y alimento *ad libitum* (Conejina Normal de Purina. Proteína Cruda 15.5% mínimo E. M. Kcal. / Kg. 2280).

El estudio fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación CICUAE-FESC, con clave C 12_13 y que fue revisado el 15 de junio del 2012.

El proyecto experimental se encuentra en la categoría D, siguiendo la clasificación de actividades experimentales de acuerdo al grado de invasión, molestia o daño producido sobre los animales de experimentación, en la que se incluyen los procedimientos que van a inducir estrés o dolor moderado a severo, que será eliminado con los anestésicos y/o analgésicos apropiados. Norma Oficial Mexicana NOM-062-Zoo-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Material quirúrgico:

- 24 Tubos Vacutainer (morados)
- 12 Punzoat de 24 G
- 30 Jeringas de 3 ml
- 12 piezas de equipo de venoclisis microgotero
- 12 piezas de solución isotónica de cloruro de sodio
- Equipo de cirugía general
- Sutura de monofilamento de Gliconato 4-0
- Sutura de monofilamento de Nylon 4-0.
- Gasas estériles.
- Taladro de baja revolución menor que 350 rpm con broca ortopédica 4mm de diámetro.

Material Farmacológico

- Xilacina 2%
- Ketamina 10%
- Meglubina de flunixin
- Ampicilina
- Pentobarbital Sódico

Metodología General

12 conejos de la raza Nueva Zelanda con un peso promedio de 3.5 kg



Se dividieron en 4 grupos, cada uno con 3 sujetos de estudio



Se sometieron a Cirugía, previamente fueron preparados y evaluados durante 15 días.



Posterior a la cirugía se tomaron placas radiográficas a partir de la semana cero, uno, dos, tres, cuatro y cinco.



Los sujetos de estudio fueron eutanaciados a diferentes tiempos. A la tercera, cuarta, quinta y sexta semana.



Procesamiento Histológico

Al finalizar los tiempos de cada uno de los grupos

Recuperando las estructuras óseas correspondientes a las tibias

METODOLOGÍA ESPECÍFICA

CUIDADOS PRE-QUIRÚRGICOS

Previo a la cirugía y a la eutanasia se tomaron de todos los animales muestras de sangre de la vena marginal de la oreja, con un punzocat estéril de 24 G (Aguja 26-G Long 19 mm), la cual fue extraída con una jeringa de 3 ml, se obtuvieron 2 ml aproximadamente para la realización de hemograma.

Los sujetos de estudio no se pusieron a ayuno, debido a que pueden sufrir muy fácil hipoglucemia. Previo a la cirugía, estos se prepararon siguiendo los principios básicos de asepsia quirúrgica, rasurando ambos miembros posteriores en la parte distal del fémur y hasta el tercio proximal de los tarsos, se colocó un catéter intravenoso de calibre 24 G (Aguja 26-G Long 19 mm), con su respectivo equipo de venoclisis (microgotero), conectado a una solución isotónica de cloruro de sodio, perfundiendo así 10 ml/kg/h., para su mantenimiento básico durante la cirugía.

Se utilizó como anestésico general la combinación de Ketamina- Xilacina (Anesket-Andozine) Intravenosa a dosis de 20mg/kg y 5mg/kg de peso respectivamente.

Los pacientes se colocaron en decúbito lateral sujetando el miembro (izquierdo o derecho) en alto durante la cirugía, se realizó la asepsia con jabón quirúrgico y la antisepsia con tintura de benzal en la zona, posterior a esto se colocaron los campos quirúrgicos.



Figura 5: Conejo Canalizado



Figura 6: Zona de cirugía

CIRUGÍA

Se realizó una aproximación quirúrgica al cuerpo de la tibia sobre el tercio proximal de la misma, iniciando con una incisión medial recta de 3 cm aproximadamente sobre la piel y tejido subcutáneo, posteriormente se incidió la fascia de los músculos flexores y extensores, con el hueso expuesto se procedió a retirar el periostio, posteriormente se les realizó un defecto óseo de 4 mm de diámetro en la cara medial de la tibia, utilizando una broca ortopédica y taladro de baja revolución (menor que 350 rpm); la tibia del lado derecho (experimental) se trató con gel elaborado con una mezcla de quitosán con hueso desmineralizado alogénico, el cual se aplicó resanando los defectos óseos. La tibia del lado izquierdo (control) no recibió ningún tratamiento. Se procedió a reparar los planos anatómicos incididos utilizando para esto la técnica de puntos en "X" con una sutura de monofilamento de gliconato 4-0, para piel se realizaron puntos separados con monofilamento de nylon 4-0.



Figura 7. Incisión



Figura 8. Defectos óseos

CUIDADOS POST- QUIRÚRGICOS

Se administró un tratamiento profiláctico antibacteriano a base de ampicilina a dosis de 20 mg/kg cada 24 horas durante 7 días. La analgesia se realizó con meglubina de flunixin a dosis de 1.1 mg/kg cada 12 horas vía intramuscular por 5 días, así como citrato de fentanilo 0.02 mg/kg por vía intramuscular como dosis única.

EVALUACIÓN CLÍNICA

Durante esta evaluación se observó diariamente el consumo de agua y alimento así como el cambio de comportamiento en cuanto a la agresividad, depresión o alguna alteración que pudiera sugerir malestar del animal. También se observó que defecaran y orinaran normalmente.

La evaluación que se llevó a cabo durante el cuidado post-quirúrgico consistió en la revisión de procesos infecciosos, mediante una inspección clínica del área quirúrgica observando así la evolución de la cicatrización basándolo en la apariencia general, presencia de exudado y tejido necrótico.

Las cirugías se realizaron el día 26 de Febrero del 2013 a las 11:00 horas en la Unidad de Aislamiento y Bioterio UIM sin contratiempos

EVALUACIÓN RADIOLÓGICA

A cada uno de los sujetos de estudio se les realizó una evaluación semanal con la toma de placas radiográficas (cráneo-caudal y medio-lateral) para ambas tibias. Las radiografías se analizaron considerando la respuesta ósea: perióstica y la presencia de material radiopaco en el defecto óseo.

Respuesta perióstica	
Criterio	Valoración
Respuesta nula	0
Respuesta moderada	1
Respuesta abundante	2

Cuadro 1. Criterios de evaluación radiográfica de la respuesta perióstica.¹⁰

Presencia de material radiopaco en el defecto	
Criterio	Valoración
Sin cambio	0
Moderada radiopacidad	1

Cuadro 2. Criterios de evaluación radiográfica de la presencia de material radiopaco en el defecto.¹⁰

Se tomaron placas radiográficas durante 4 semanas. De cada individuo se obtuvieron cuatro tomas, dos correspondientes al miembro posterior izquierdo y dos al miembro posterior derecho. Las cuales fueron, proyección cráneo – caudal y latero-medial.

La interpretación se realizó en base a las mediciones obtenidas con un vernier de las proyecciones latero-medial y cráneo-caudal de ambos miembros separando dichas placas por individuo y por semana de toma.

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

Al finalizar los tiempos de cada uno de los grupos, los animales fueron eutanaciados a diferentes tiempos, el primero a las 3 semanas, el segundo a las 4 semanas, el tercero a las 5 semanas y el ultimo a la semana 6 en la Unidad de Aislamiento y Bioterio UIM, a través de una sobredosis de Pentobarbital Sódico (28 mg/Kg) por vía intravenosa; recuperando las estructuras óseas correspondientes a las tibias, las cuales se procesaron para los cortes histológicos.

Los cadáveres fueron dispuestos al incinerador de la Facultad, conforme lo establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección Ambiental-Salud Ambiental-Residuos Peligrosos Biológicos-Infeciosos-Clasificación y Especificaciones de Manejo.

PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

Para la obtención de las muestras se diseccionaron ambas tibias, posteriormente se realizaron 2 cortes transversales a cada una delimitando el fragmento de la fractura con una sierra, las cuales fueron sumergidas en frascos con formol al 10% y se mantuvieron bajo refrigeración durante 72 horas para su posterior procesamiento. Se descalcificaron en solución Bouin-Tricloroacético durante 5 días aproximadamente.

La estabilización del pH se realizó a través de carbonato de calcio 1N durante 72 horas, al concluir este periodo se lavaron las muestras en agua destilada. Una vez desmineralizadas se procedió a realizar un segundo corte en el que el tamaño de la muestra fuera adecuado para los cassettes histológicos, ya dentro de estos se procedió a la deshidratación en alcohol a diferentes grados (70, 80, 92, 98 y 100 %) para así poder realizar la inclusión en parafina.

Los cortes histológicos realizados con el micrótomo fueron de una medida de 4 micras, las cuales pasaron por el tren de tinción Hematoxilina – Eosina, se montaron y observaron al microscopio principalmente para evaluar la integración del biomaterial, respuesta inflamatoria y la respuesta ósea.

**Análisis e
interpretación
de resultados**

Capítulo

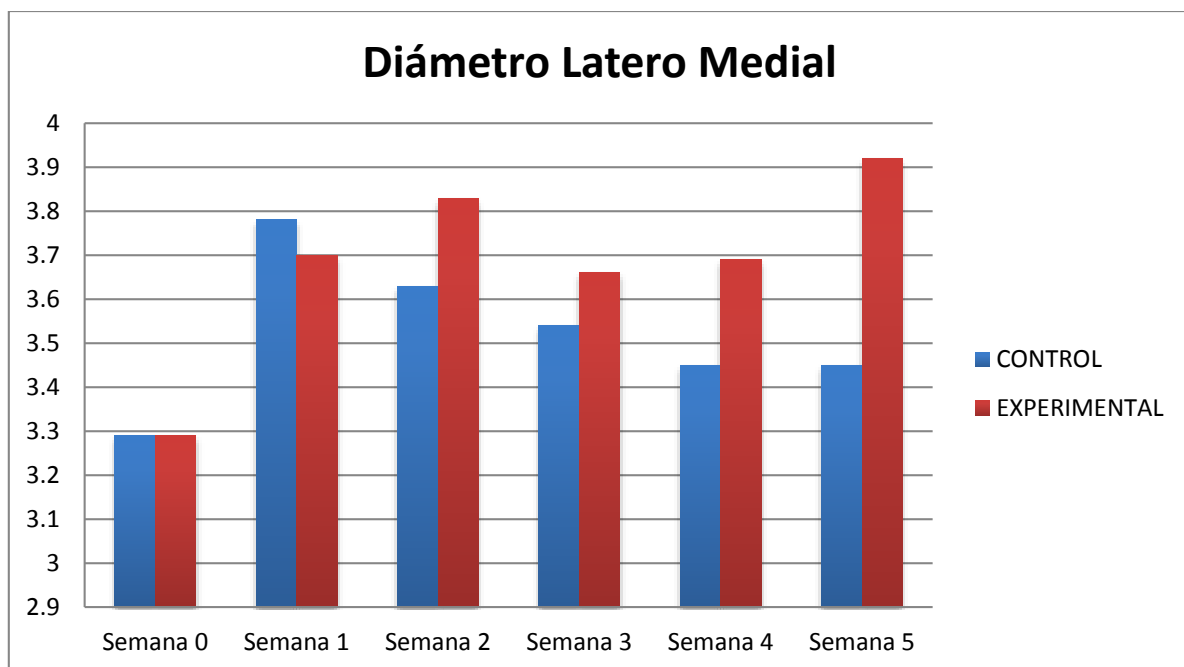
4

EVALUACIÓN CLÍNICA:

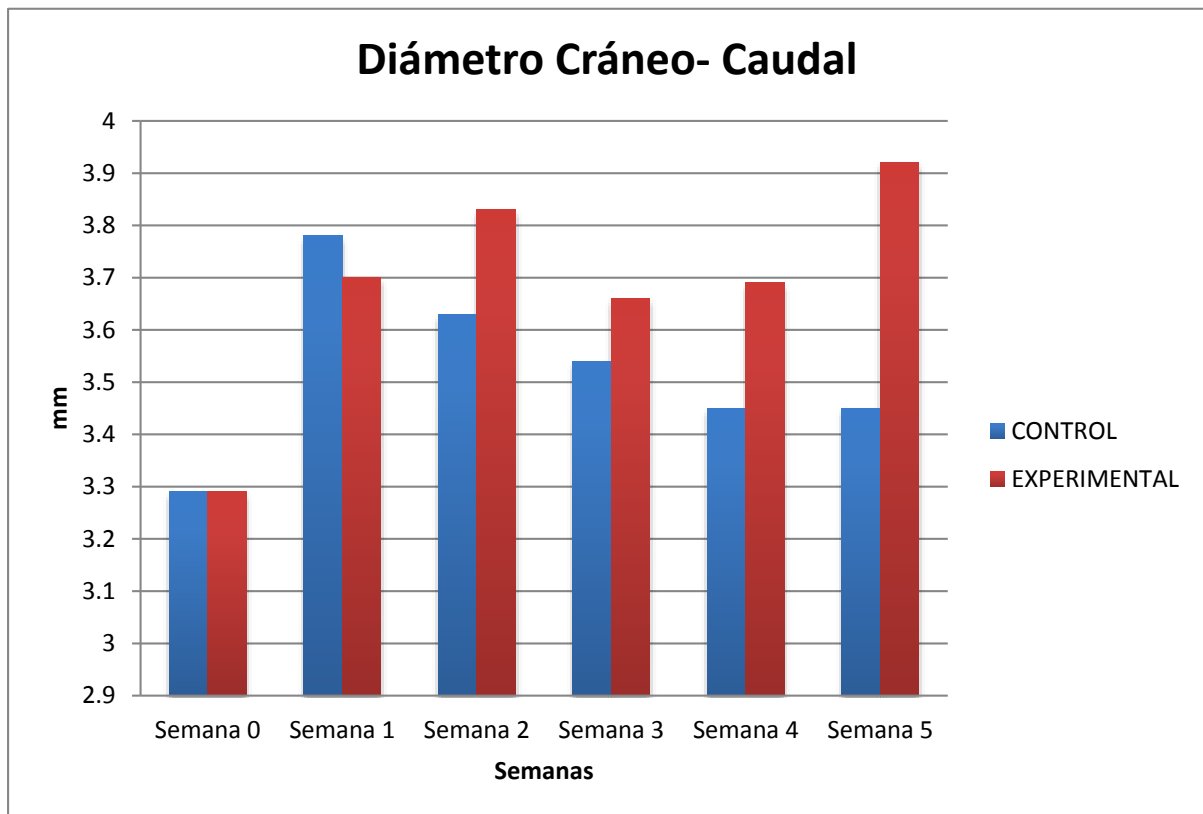
En la evaluación clínica de la zona de la herida se realizó considerando la cara medio-lateral y la cráneo-caudal, tal y como se observa en la gráfica 1 y 2 respectivamente. Para obtener los promedios se tomaron lecturas a partir de la semana cero hasta la semana 5, tanto en la tibia tratada y control.

En el diámetro medio- lateral, se pudo observar, que los diámetros de las tibias que corresponden a los controles fueron menores durante todo el experimento excepto en la semana número 2, mostrando su máxima expresión a la semana número 4.

Con respecto al diámetro cráneo- caudal, se pudo observar que el grupo control mostró un mayor volumen en la primera semana, disminuyendo en forma paulatina y manteniéndose en la cuarta y quinta semana; mientras que en el experimental, se observó un incremento en la tercera semana disminuyendo en la tercera y cuarta, repuntando a la quinta semana.



Grafica 1. Diámetro medio-lateral de la tibia control y experimental

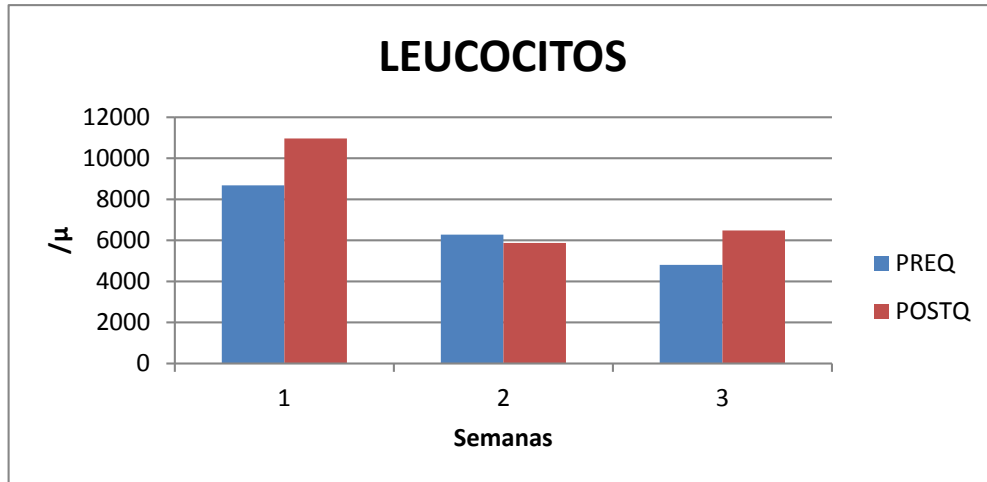


Grafica 2. Diámetro cráneo-caudal de la tibia control y experimental

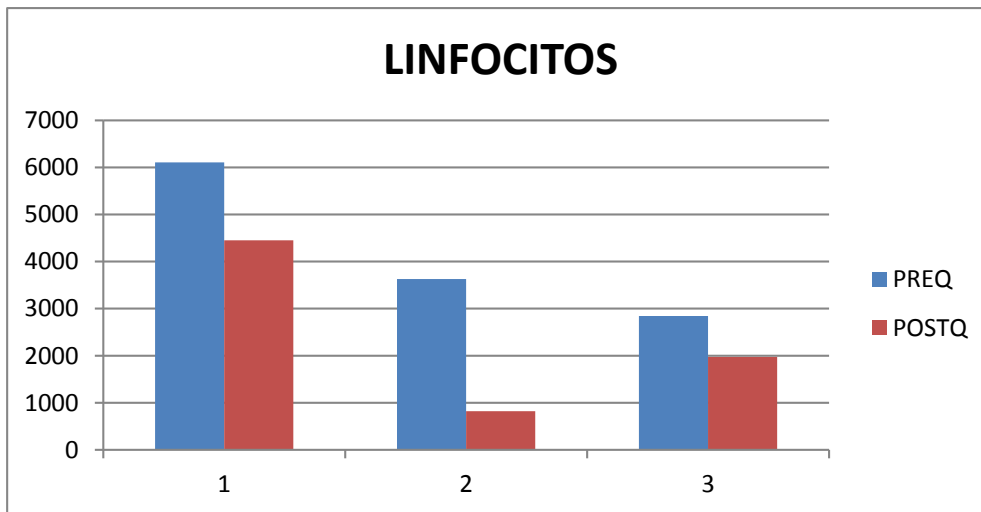
EVALUACIÓN DE LABORATORIO

Se observa en los resultados del experimento ciertos cambios en cuanto a los parámetros hemáticos evaluados, principalmente el hematocrito y el conteo leucocitario antes y después de la cirugía, sin embargo, estos no rebasan los parámetros reportados en la literatura.

Si bien el estado clínico general de todos los animales previo a la cirugía, era bueno, se puede atribuir el aumento de sus leucocitos y principalmente los linfocitos, reportados por el laboratorio, a la edad, ya que en los animales jóvenes se pueden tener incrementos considerables o bien al estrés prolongado durante su preparación.³⁷

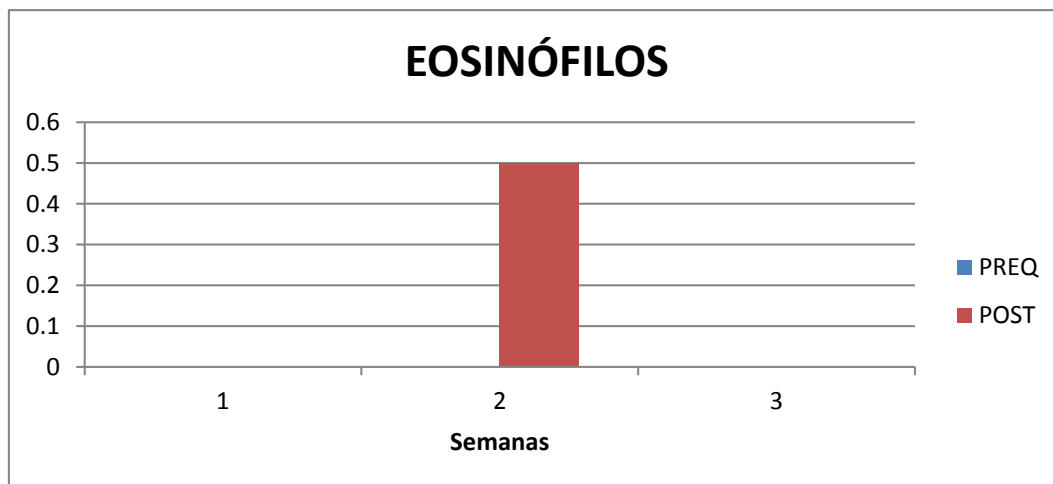


Grafica 3. Valoración del conteo leucocitario pre y post quirúrgico



Grafica 4.Conteo total de linfocitos durante el pre y post quirúrgico

En la gráfica siguiente se puede observar una eosinofilia a la segunda semana del post- quirúrgico, esta respuesta celular encontrada en los sujetos de estudio sugiere una ligera reacción de hipersensibilidad.



Gráfica 5. Conteo total de Eosinófilos durante el pre y post quirúrgico

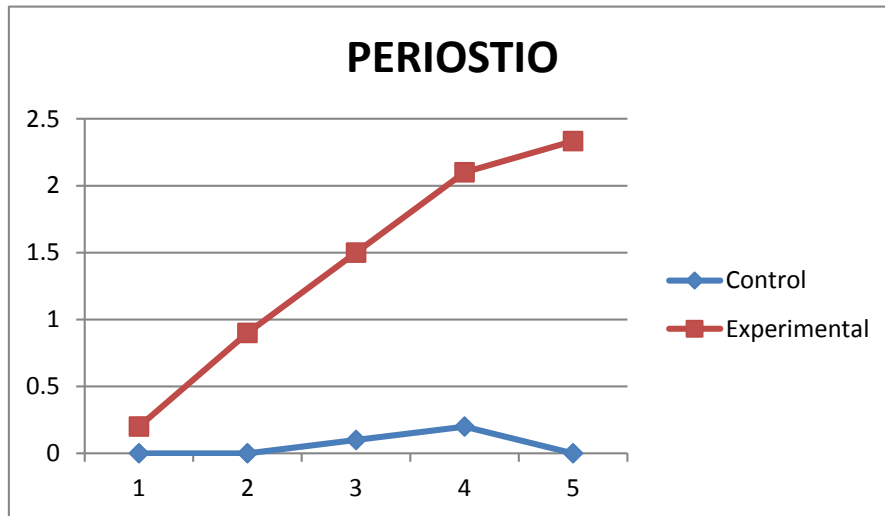
EVALUACIÓN RADIOLÓGICA

En la evaluación radiológica, como se describió en la metodología, se consideraron los cuadros ya citados.

La respuesta perióstica, se pudo observar a partir de la primera semana en el experimental, observándose su máxima respuesta hasta la cuarta semana, a partir de la cual comenzó en descenso de esta respuesta; mientras que en el control, se pudo detectar la respuesta a partir de la segunda semana, siendo esta mínima y mostrando su pico máximo hasta la cuarta semana.

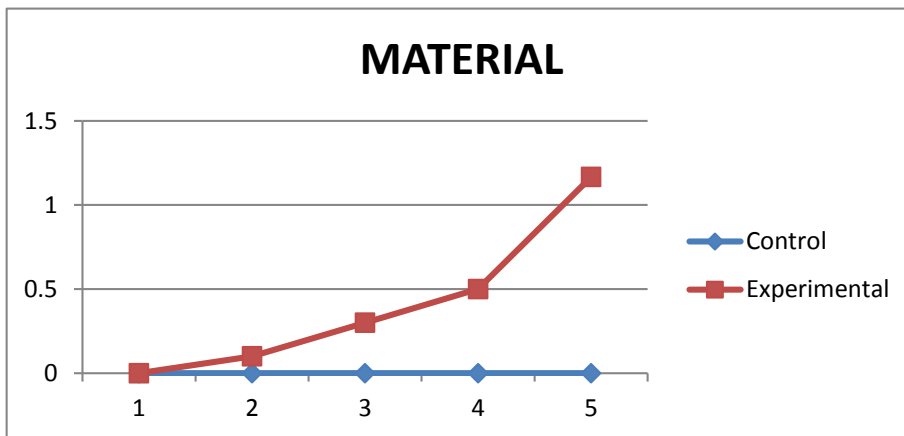
En lo que respecta a la respuesta endóstica, no se observó ninguna manifestación.

Se pudo detectar la presencia de material radio opaco dentro del defecto producido, el cual en el grupo control se manifestó ligeramente hasta la tercera semana, mientras que el experimental se pudo observar muy evidente a partir de la segunda semana del experimento.



Grafica 6.

Evaluación de la respuesta perióstica durante las semanas de experimentación.



Grafica 7. Evaluación de la presencia de material en el defecto óseo durante las semanas de experimentación.

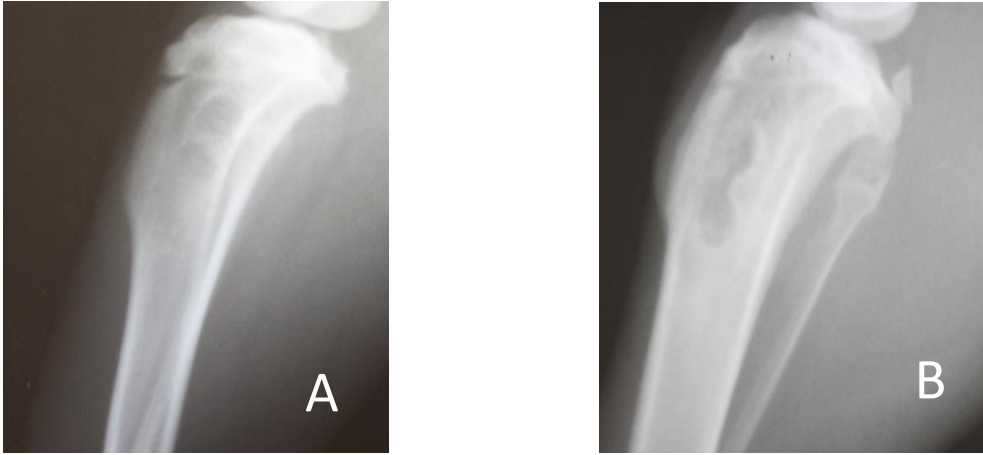


Figura 9. Evaluación radiológica postquirúrgica control (A) y Experimental (B). Toma medio-lateral semana 1. Se observa en ambas tomas dos zonas radiolúcidas circulares que corresponden a los defectos óseos realizados.

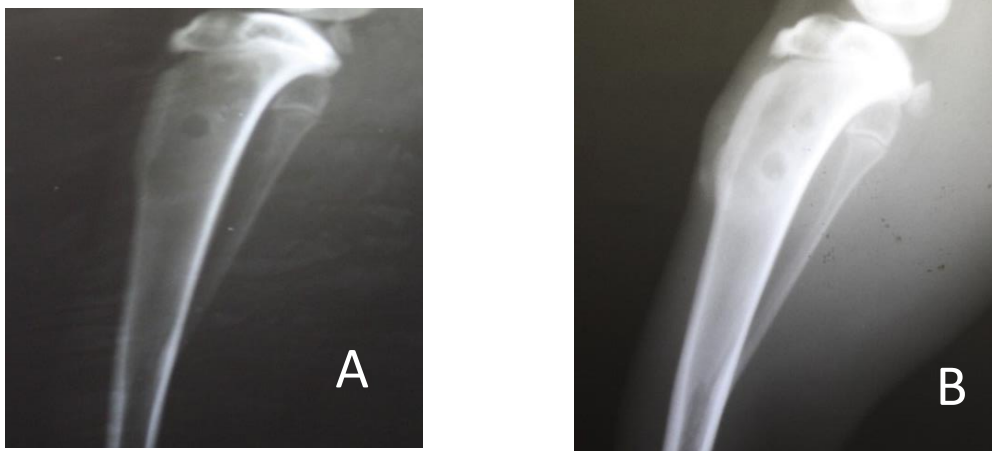


Figura 10. Evaluación radiológica postquirúrgica control (A) y Experimental (B). Toma medio-lateral semana 2, donde se observan los defectos óseos en los cuales fueron depositados las mezcla de quitosán y hueso desmineralizado (B), las cuales no son radiopacas por su baja densidad.

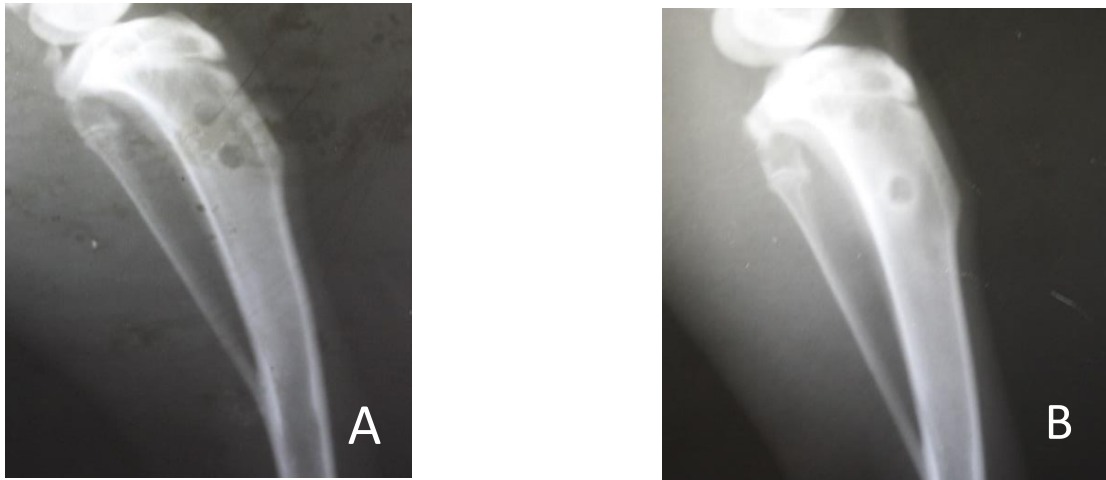


Figura 11. Evaluación radiológica postquirúrgica control (A) y Experimental (B). Toma medio-lateral semana 3, donde se puede observar en la toma (B) dentro de los defectos una mayor radiopacidad producida por la reparación, también se observan cambios en la cortical que corresponde a la respuesta perióstica en comparación con la toma (A) que solo se observa el defecto óseo realizado.

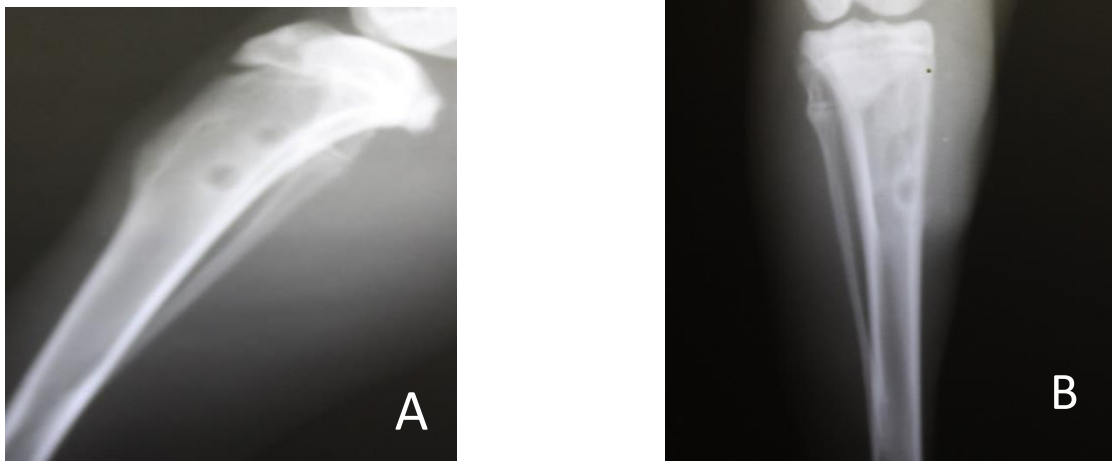


Figura 12. Evaluación radiológica postquirúrgica control (A) y Experimental (B). Toma medio-lateral y Cráneo-Caudal respectivamente semana 4.

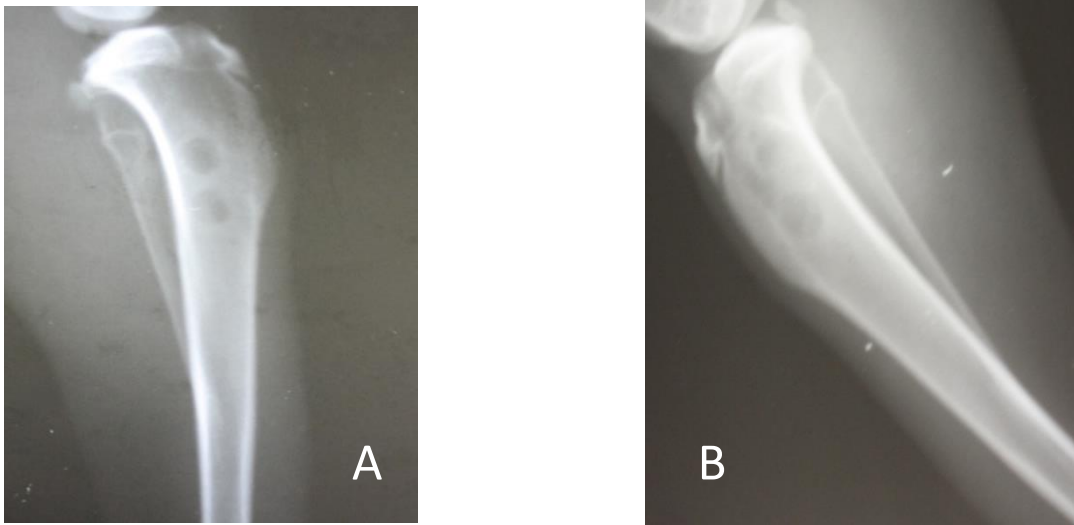


Figura 13. Evaluación radiológica postquirúrgica control (A) y Experimental (B). Toma medio-lateral Semana 5. Se observa en la foto (B) presencia de material radiopaco dentro de los defectos óseos a comparación de la foto (A)

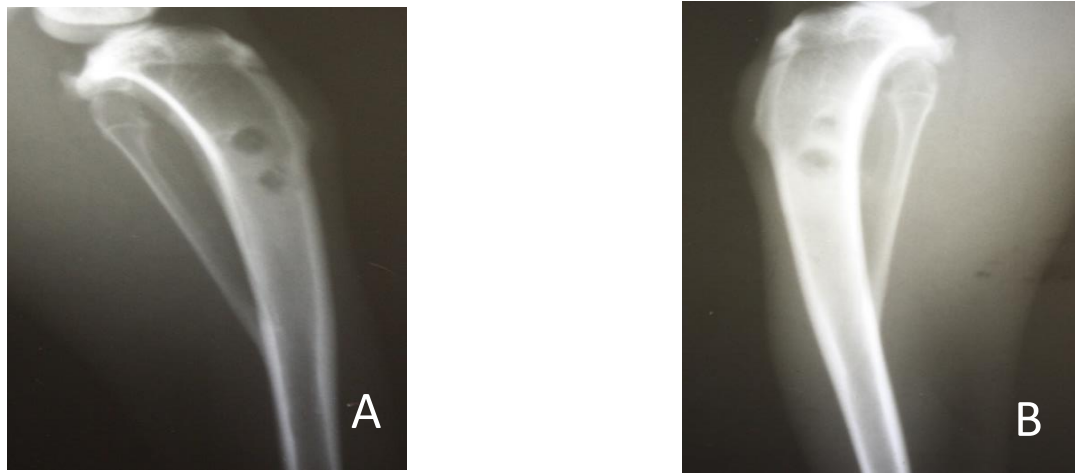


Figura 14. Evaluación radiológica postquirúrgica control (A) y Experimental (B). Toma medio-lateral Semana 6. Se observa en la toma (A) el defecto óseo realizado con nula respuesta perióstica y sin presencia de material radiopaco al interior del defecto, en comparación con la toma (B) donde el defecto óseo está cerrando casi en su totalidad además de la presencia de material radiopaco al interior de este.

Evaluación Histológica

Microscópicamente se evaluó la integración del injerto, osteosíntesis y fibrogénesis utilizando la tinción de H.E. Se valoró la vascularización, presencia de osteoblastos u osteoclastos en la zona del defecto como indicio de reparación, organización o destrucción ósea; además de la respuesta inflamatoria.

Durante la evaluación histológica se pudo observar lo siguiente:

- A la tercera semana se observó un infiltrado inflamatorio de leve a moderado en el grupo experimental, que en su mayoría correspondía a células mononucleares, principalmente linfocitos, siendo menor en su proporción los neutrófilos, rodeando al material implantado sin que haya un encapsulamiento bien definido. En el grupo control se puede apreciar (figura 16) la presencia de trabéculas óseas que indican un proceso de reparación normal con una ligera respuesta inflamatoria, sin embargo, en uno de éstos controles se observó sobre la cortical un moderado infiltrado celular que en su mayoría corresponden a neutrófilos y escasas células mononucleares.
- Durante la cuarta semana el grupo experimental mostró una abundante respuesta de fibroblastos sobre la cortical uniendo las trabéculas óseas, correspondiendo a tejido de nueva generación con una respuesta vascular muy evidente (congestión vascular) con leve infiltrado celular inflamatorio que en su mayoría corresponde a células mononucleares; cabe mencionar que en este grupo, uno de los animales mostro un encapsulamiento sobre el material implantado con infiltrado abundante de mononucleares y escasos neutrófilos. En el control se observó gran respuesta inflamatoria con un infiltrado que en su mayoría fueron células mononucleares y escasos neutrófilos, acompañado capilares congestionados, trabéculas óseas con tejido conectivo laxo, sin embargo en dos animales controles, la respuesta vascular fue escasa sin infiltrado inflamatorio y hueso de nueva formación. (figura 17).
- En la quinta semana en el grupo experimental, se observó una capsula fibrosa bien definida con leve-moderado infiltrado inflamatorio; linfocitos en su mayoría, vasos congestionados y con abundante tejido de nueva formación. Mientras que en el grupo control, se pudo apreciar un leve infiltrado inflamatorio 50/50 (neutrófilos – linfocitos); acompañado de trabéculas óseas escasas, tejido de nueva formación sin vascularización evidente. (figura 18).

- Finalmente durante la sexta semana el grupo experimental evidenció un encapsulamiento bien delimitado sobre el material implantado, rodeado de una abundante respuesta inflamatoria mononuclear y en menor infiltrado de células segmentadas; así como la presencia de tejido de neoformación, y capilares congestionados. En dos animales de este grupo se observó la presencia de trabéculas óseas con leve infiltrado inflamatorio (linfocitos). Y el control mostró una respuesta inflamatoria moderada (linfocitos), vasos congestionados, trabéculas óseas (leves a moderadas), tal y como se muestra en la figura 19.

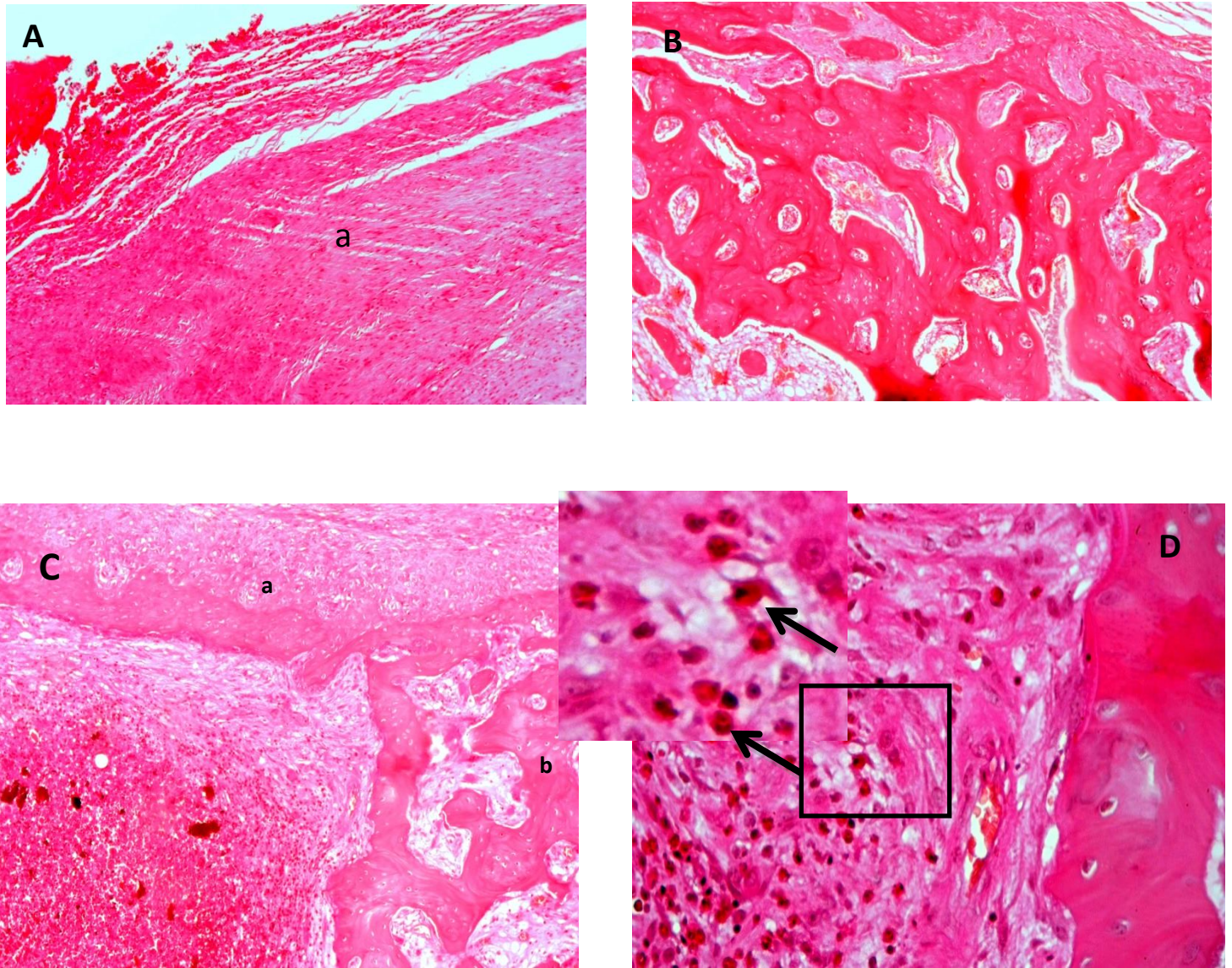


Figura 15: Grupo experimental 3 semanas, corte histológico 10X A) Cortical con abundante respuesta de fibroblastos (a); B) Hueso de nueva formación. C) Material implantado con infiltrado inflamatorio de leve a moderado, que en su mayoría corresponde a células mononucleares, principalmente linfocitos, siendo menor en su proporción los neutrófilos, rodeando a éste sin que haya un encapsulamiento bien definido. a) Fibroblastos. b) Hueso de nueva formación. D) Infiltrado inflamatorio, en el recuadro superior izquierdo detalle de células inflamatorias (flechas).

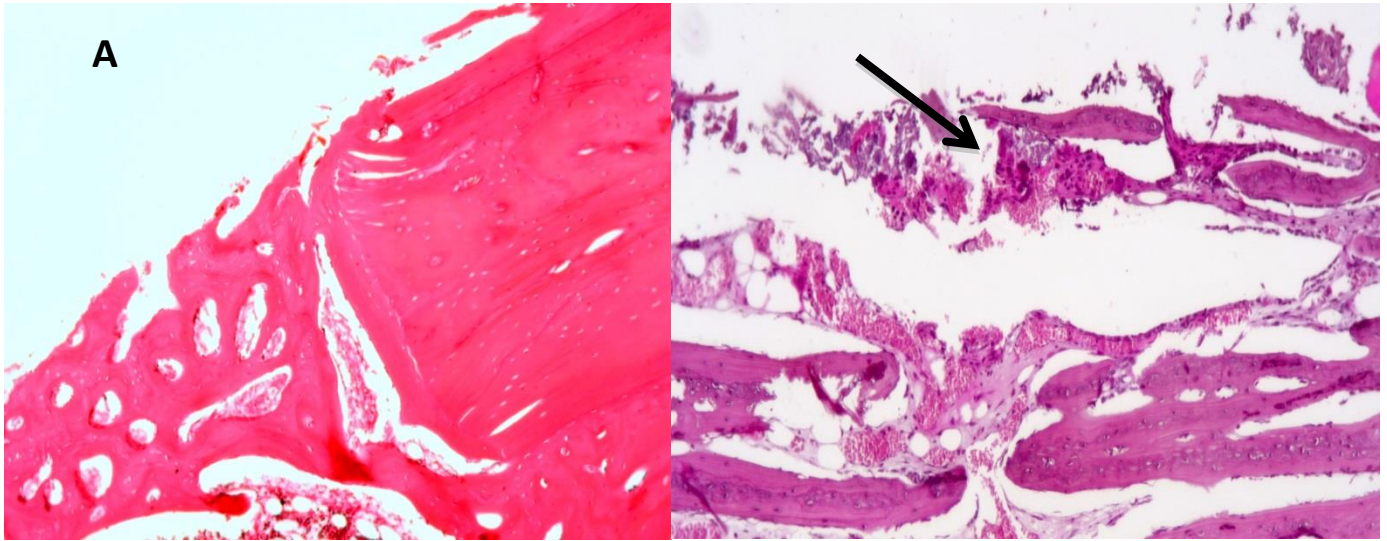


Figura 16: Grupo control 3 semanas, corte histológico 10 X: A) se puede apreciar la presencia de trabéculas óseas que indican un proceso de reparación normal; B) se observa sobre la cortical un moderado infiltrado celular (flecha) que en su mayoría corresponden a neutrófilos y escasas células mononucleares.

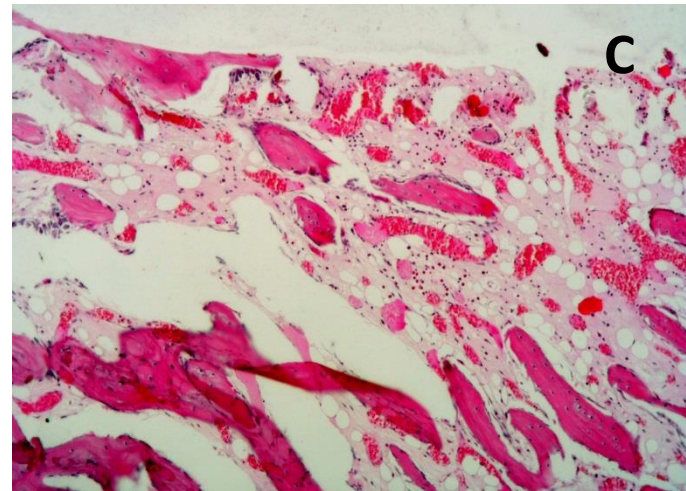
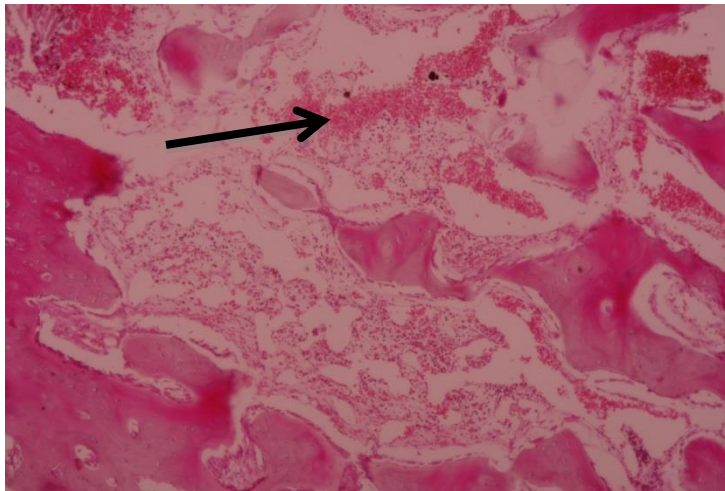
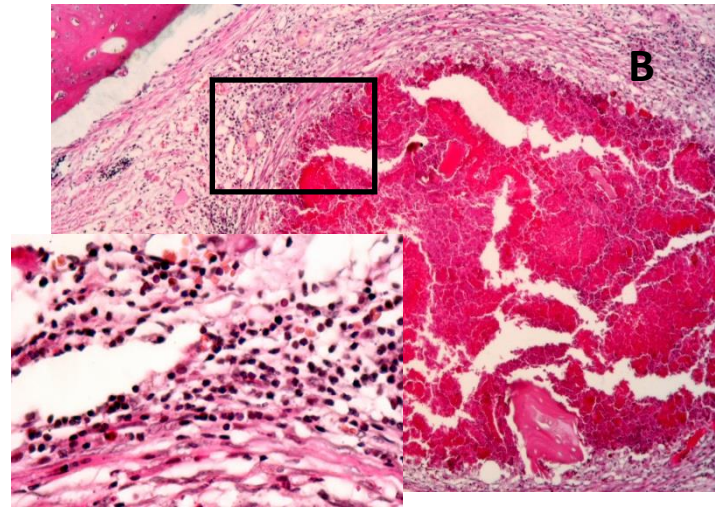
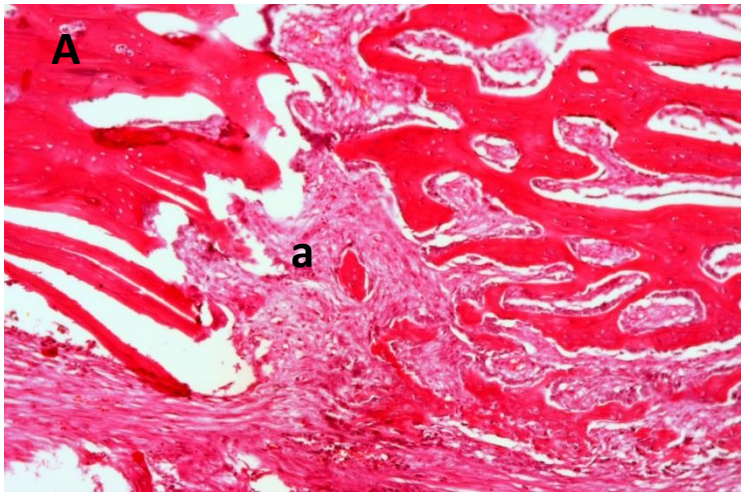


Figura 17. Grupo experimental Corte histológico 4 semanas 10 X. A) Abundante respuesta de fibroblastos sobre la cortical uniendo las trabéculas óseas, correspondiendo a tejido de nueva generación (a) con una respuesta vascular muy evidente (congestión vascular) (Flecha); (B) Encapsulamiento sobre el material implantado con infiltrado abundante de mononucleares y escasos neutrófilos (recuadro), (C) Grupo control respuesta vascular fue escasa sin infiltrado inflamatorio y hueso de nueva formación.

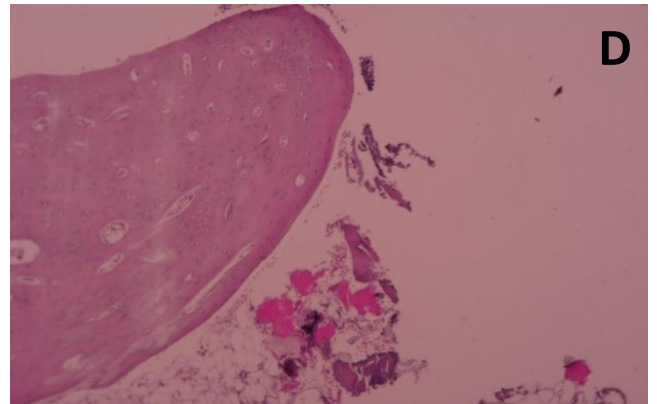
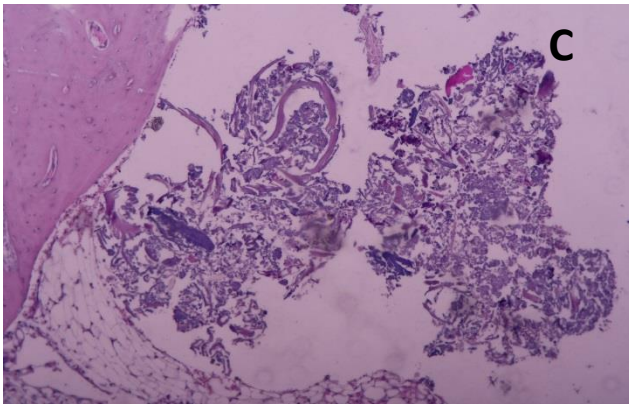
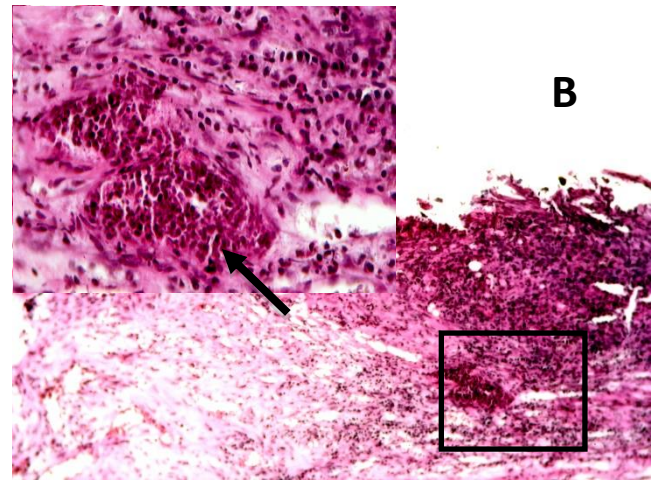
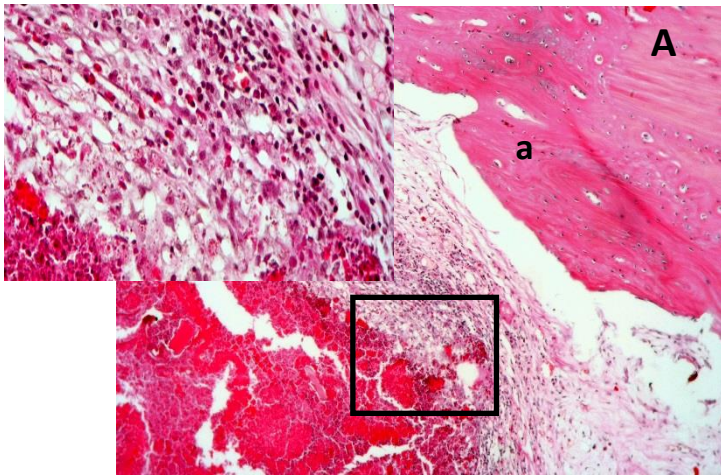


Figura 18. Grupo experimental Corte Histológico Quinta semana 10 X. A) Se observa capsula fibrosa bien definida con leve-moderado infiltrado inflamatorio linfocitos en su mayoría (recuadro), vasos congestionados (flecha) y con abundante tejido de nueva formación (a y B).

Grupo control Quinta semana 10 X. C) Se puede apreciar un leve infiltrado inflamatorio acompañado de trabéculas óseas escasas tejido de nueva formación sin vascularización evidente. D) Defecto óseo sin respuesta de la cortical.

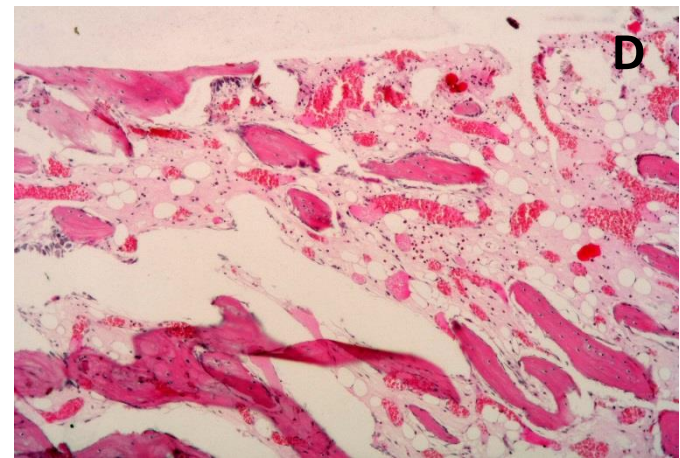
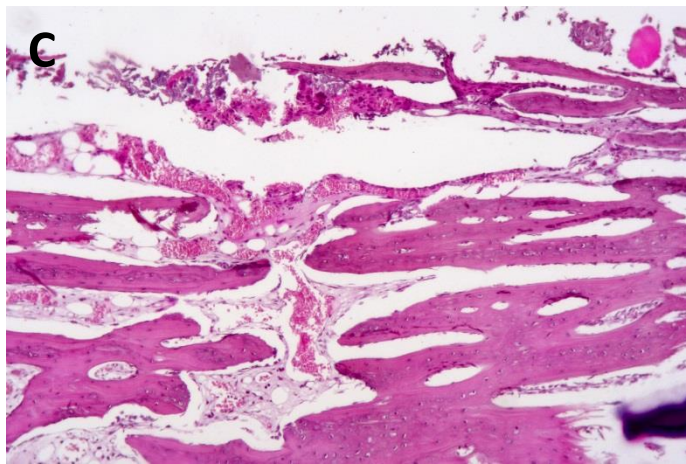
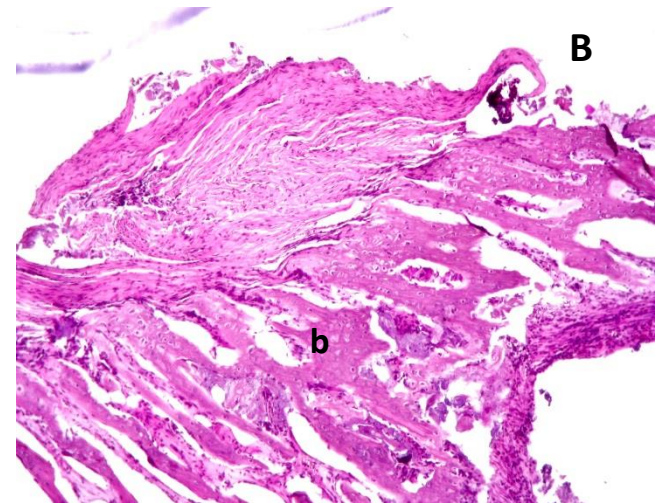
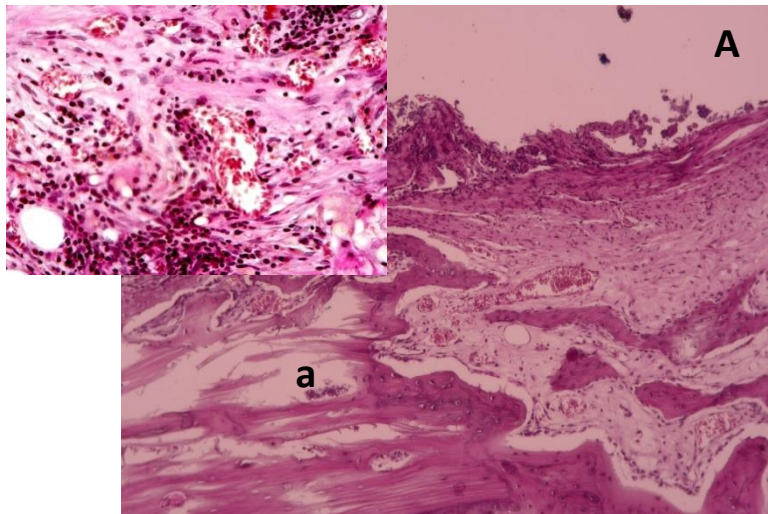


Figura 19. Grupo experimental Corte Histológico sexta semana 10 X. A, B) Se observa una abundante respuesta de fibroblastos en la cortical. (a y b) Tejido de nueva formación (hueso)

Grupo control Sexta semana 10 X. C) Se observa trabéculas óseas moderadas correspondientes a una cicatrización normal y con leve respuesta vascular (D)

**Pruebas
estadísticas**

Capítulo

5

Los datos corresponden a las medidas tomadas con el vernier para la medición del diámetro Cráneo- Caudal y Latero Medial tanto de la tibia control como la experimental.

En las tablas que se muestran a continuación se observan estos datos por conejo y por semana.

Conejo/ Semana	0		1		2		3		4		5	
C1	4.40	4.40	4.50	4.40	5.00	4.50	4.60	4.80	4.80	5.00	0.00	0.00
C2	3.80	3.80	3.90	3.80	4.10	4.10	4.30	4.20	4.30	4.10	0.00	0.00
C3	4.40	4.40	4.50	4.50	4.60	4.80	4.60	4.70	4.50	4.80	0.00	0.00
C4	4.00	4.00	4.50	4.60	4.70	4.60	4.00	4.30	4.20	4.50	0.00	0.00
C5	3.90	3.90	4.00	3.90	4.00	4.20	4.30	5.00	4.50	4.50	0.00	0.00
C6	3.70	3.70	3.70	4.80	3.90	4.40	3.80	4.20	4.20	4.30	0.00	0.00
C7	3.40	3.40	4.60	4.40	3.90	3.40	4.40	4.30	4.30	4.40	4.30	4.40
C8	4.10	4.10	4.30	4.90	4.10	4.10	4.50	4.10	4.70	4.50	4.40	4.60
C9	3.90	3.90	4.50	4.20	3.90	4.60	4.40	4.40	4.50	4.50	4.50	4.50
C10	3.60	3.60	4.00	4.00	4.10	3.60	4.10	4.10	4.40	4.50	4.40	4.30
C11	3.80	3.80	3.80	4.90	4.10	4.30	4.00	4.20	4.20	4.30	4.50	4.50
C12	4.10	4.10	4.10	4.20	4.60	4.70	4.40	4.30	4.30	4.70	4.40	4.40
PROMEDIO	3.93	3.93	4.2	4.38	4.25	4.28	4.28	4.383	4.41	4.51	4.42	4.45

Cuadro 3 : Diámetro Latero – Medial izquierda y derecha respectivamente

Conejo/Semana	0		1		2		3		4		5	
C1	3.50	3.50	3.80	3.60	3.50	3.90	3.50	4.00	3.90	4.70	0.00	0.00
C2	3.10	3.10	3.50	3.50	3.40	4.10	3.20	4.10	3.10	4.10	0.00	0.00
C3	3.40	3.40	3.70	3.70	3.70	4.10	3.60	3.80	3.20	3.80	0.00	0.00
C4	3.40	3.40	4.10	4.20	4.00	3.60	3.80	3.70	3.40	3.50	0.00	0.00
C5	3.70	3.70	4.60	4.70	3.70	4.40	3.90	4.40	3.90	3.60	0.00	0.00
C6	3.00	3.00	3.00	3.20	3.00	4.10	3.00	3.20	3.50	3.30	0.00	0.00
C7	3.20	3.20	4.20	3.30	3.20	3.50	3.40	3.40	3.20	3.50	3.50	4.60
C8	3.30	3.30	3.50	4.20	3.80	3.80	3.90	3.80	3.40	3.80	3.30	3.30
C9	3.20	3.20	3.50	3.60	3.60	4.50	3.20	3.50	3.50	3.50	3.70	3.70
C10	3.10	3.10	3.30	3.80	3.10	3.60	3.40	3.20	3.20	3.10	3.30	3.60
C11	3.30	3.30	3.20	3.50	3.50	3.80	3.20	3.70	3.30	3.40	3.40	4.70
C12	3.40	3.40	3.30	3.70	3.30	4.00	3.50	3.50	3.20	3.60	3.20	3.60
PROMEDIO	3.3	3.30	3.64	3.75	3.48	3.95	3.47	3.69	3.40	3.66	3.40	3.92

Cuadro 4: Diámetro Cráneo – Caudal izquierda y derecha respectivamente

Para la realización de la prueba estadística, se compararon las medias de la semana cero contra la semana 4. Para sacar la medida de tendencia central (media) y las medidas de dispersión (Varianza y Desviación estándar), se utilizarán las siguientes fórmulas:

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Fórmula 1.1

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}$$

Fórmula 1.2

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Fórmula 1.3

Se trabajó con dos hipótesis estadísticas, las cuales se enuncian a continuación:

H_0 = La media del diámetro cráneo-caudal y latero-medial de la semana cero con respecto a la semana 4, no presenta ninguna diferencia estadística.

H_a = La media del diámetro cráneo-caudal y latero-medial de la semana cero con respecto a la semana 4, si presenta diferencia estadística.

Conociendo las medias y la varianza de la población en estudio, la estadística de prueba para $H_0: \mu_1 = \mu_2$ se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$t = \frac{(\bar{X}_2 - \bar{X}_1) - (\mu_1 - \mu_2)_0}{\sqrt{\frac{s_p^2}{n_1} + \frac{s_p^2}{n_2}}} \quad \text{Fórmula 1.4}$$

Siguiendo una distribución *t de Student* con $n_1 + n_2 - 2$ grados libertad, y con un intervalo de confianza del 95%

Regla de decisión: Sea $\alpha = 0.05$. Los valores críticos de t son ± 2.0739 . Se rechaza H_0 a menos que $-2.0739 < t_{\text{calculado}} < 2.0739$.

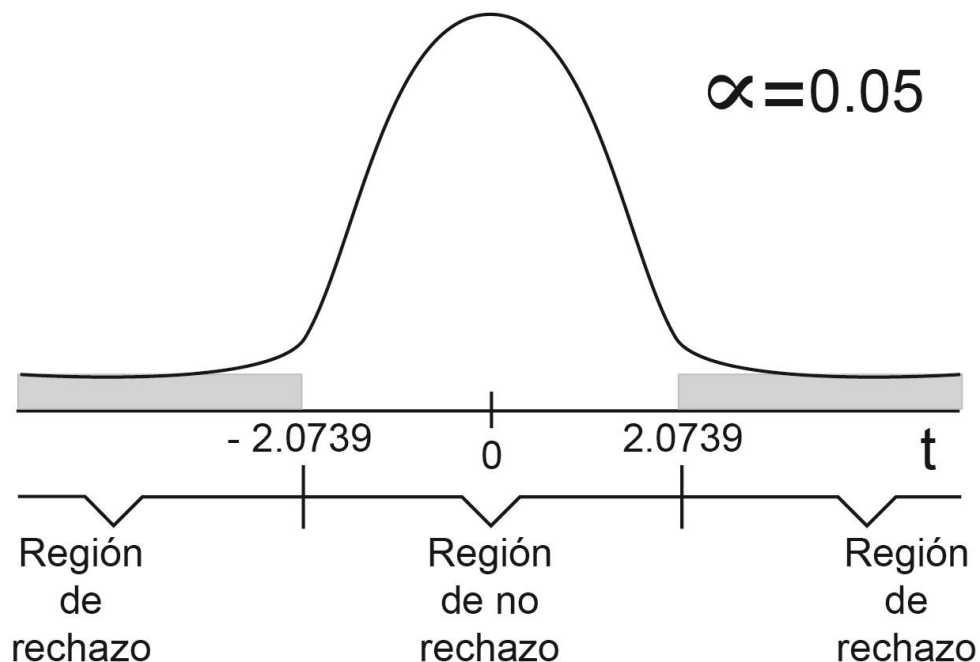


Figura 20. Curva de distribución T

Cálculo de la estadística de prueba. A partir de los datos muestrales se calculó el promedio, la varianza y desviación estándar, para que con ello se sustituyera en la fórmula 1.4, tal y como se puede observar en los cuadros 3, 4, 5 y 6.

Diámetro latero- medial Izquierda				
Semana	Semana	Diferencia	Xi -	
4	cero	Xi	Promedio	Xi-promedio al Cuadrado
4.80	4.40	0.40	-0.08	0.0064
4.30	3.80	0.50	0.02	0.00040
4.50	4.40	0.10	-0.38	0.14440
4.20	4.00	0.20	-0.28	0.07840
4.50	3.90	0.60	0.12	0.01440
4.20	3.70	0.50	0.02	0.00040
4.30	3.40	0.90	0.42	0.17640
4.70	4.10	0.60	0.12	0.01440
4.50	3.90	0.60	0.12	0.01440
4.40	3.60	0.80	0.32	0.10240
4.20	3.80	0.40	-0.08	0.00640
4.30	4.10	0.20	-0.28	0.0784
PROMEDIO		0.48	SUMATORIA	0.6368

Cuadro 5: Diámetro latero-medial izquierda

Varianza	0.05789
D.E	0.26801

$$\bar{X}^2 = 0.48$$

$$S^2 = 0.05789$$

Diámetro latero - medial derecha				
Semana 4	Semana cero	Diferencia Xi	Xi - promedio	Xi-promedio al cuadrado
5.00	4.40	0.60	0.02	0.0004
4.10	3.80	0.30	-0.28	0.07840
4.80	4.40	0.40	-0.18	0.03240
4.50	4.00	0.50	-0.08	0.00640
4.50	3.90	0.60	0.02	0.00040
4.30	3.70	0.60	0.02	0.00040
4.40	3.40	1.00	0.42	0.17640
4.50	4.10	0.40	-0.18	0.03240
4.50	3.90	0.60	0.02	0.00040
4.50	3.60	0.90	0.32	0.10240
4.30	3.80	0.50	-0.08	0.00640
4.70	4.10	0.60	0.02	0.0004
PROMEDIO		0.58	SUMATORIA	0.4368

Cuadro 6: Diámetro latero-medial derecho

Varianza	0.03971
D.E	0.19927

$\bar{X}1 = 0.58$
 $S^2 = 0.03970$

T de student	1.1
--------------	-----

Diámetro Cráneo - Caudal Izquierda				
Semana 4	Semana cero	Diferencia Xi	Xi - promedio	Xi-promedio al cuadrado
3.90	3.50	0.40	0.23	0.0529
3.10	3.10	0.00	-0.17	0.02289
3.40	3.20	0.20	0.03	0.00090
3.40	3.40	0.00	-0.17	0.02890
3.90	3.70	0.20	0.03	0.00090
3.50	3.00	0.50	0.33	0.10890
3.20	3.20	0.00	-0.17	0.02890
3.40	3.30	0.10	-0.07	0.00490
3.50	3.20	0.30	0.13	0.01690
3.20	3.10	0.10	-0.07	0.00490
3.30	3.30	0.00	-0.17	0.02890
3.40	3.20	0.20	0.03	0.0009
PROMEDIO		0.17	SUMATORIA	0.3008

Cuadro7: Diámetro cráneo-caudal izquierdo

Varianza	0.02734
D.E	0.16536

$\bar{X}1 = 0.17$
 $S^2 = 0.02734$

Diámetro Cráneo Caudal derecha				
Semana 4	Semana cero	Diferencia Xi	Xi - promedio	xi-promedio al cuadrado
4.70	3.50	1.20	0.81	0.6561
4.10	3.10	1.00	0.61	0.37210
3.80	3.20	0.60	0.21	0.04410
3.50	3.40	0.10	-0.29	0.08410
3.60	3.70	-0.10	-0.49	0.24010
3.30	3.00	0.30	-0.09	0.00810
3.50	3.20	0.30	-0.09	0.00810
3.80	3.30	0.50	0.11	0.01210
3.50	3.20	0.30	-0.09	0.00810
3.10	3.10	0.00	-0.39	0.15210
3.40	3.30	0.10	-0.29	0.08410
3.60	3.20	0.40	0.01	0.0001
PROMEDIO		0.39	SUMATORIA	1.6692

Cuadro 8: Diámetro cráneo-caudal derecha

Varianza	0.15175
D.E	0.38955

$$\bar{X}_1 = 0.39$$

$$S^2 = 0.15175$$

T de student	1.3435935
--------------	-----------

Decisión estadística: Se acepta H_0 por que $1.34 < 2.0739$, es decir 1.34 cae dentro de la región de aceptación.

Conclusión de la prueba estadística: Con base en estos resultados, se puede concluir que las dos medias tanto cráneo-caudal y medio-lateral de la semana cero con respecto a la semana 4 de los sujetos de estudio (control y experimental) no son diferentes, es decir, según indican los índices de estudio, aunque no exista una diferencia estadística notable, existe cierta tendencia clínica y radiológica del material implantado para obtener una mejor respuesta del periostio y actuando como osteoinductor.

Discusión

La continua investigación, en busca de materiales que pueden servir como sustitutos óseos estudiando su formulación, sus características y elaboración ha permitido el desarrollo de las ciencias de los biomateriales, entre los cuales se destacan los polímeros y los cerámicos.^{19, 22, 38,39}

Analizando algunos de los modelos de experimentación animal y centrándonos en la raza adulta encontramos que los autores consultados eligen para sus investigaciones tanto de orden inferior como la rata Wistar (para mayor información consulta las referencias ^{56,59,60}) el conejo Nueva Zelanda como en este proyecto ^{55,61,72,73} , así como animales del orden superior como el perro Beagle ^{54,58,63,64,69} , el cerdo minipig ^{57,65,66,67,70} y ovejas de la raza Merino ⁶².

En cuanto a los conejos de la cepa Nueva Zelanda se han utilizado entre diez ⁷³ y veinte animales. Aunque el número más empleado ha sido de doce animales^{55,61,68} al igual que en nuestro estudio. Trabajar con esta especie supone un costo aceptable y requiere una infraestructura disponible en la mayoría de los quirófanos de cirugía experimental.

El modelo experimental empleado en este trabajo es similar al modelo descrito por Katthagen en el año de 1986, demostrando que un defecto cavitario de 6 mm de diámetro realizado en la metáfisis femoral distal del conejo nueva Zelanda no se regenera espontáneamente, por lo que la regeneración ósea que se puede observar debe ser necesariamente atribuida al sustituto óseo implantado.

Otra razón para realizar el estudio sobre la metáfisis distal son su fácil accesibilidad y su semejanza anatómica con otras especies. La creación del defecto cavitario metafisiario distal modifica las condiciones biomecánicas del cóndilo femoral medial de conejo, ya que destruye más del 50% del tejido óseo de este segmento aumentando el riesgo de fractura. Katthagen 1986 describe esta complicación en el 1.2 % de los casos.

Sanzana S. y Katthagen B.D también mencionan que para evitar esta complicación se debe efectuar un correcto centrado del orificio. En este trabajo no hemos tenido ninguna fractura, ni en otros trabajos anteriores realizados por Gil-Albarova *etal*, 2004; Roche A., 2011; Ramírez 2009; Pedro y Caballero 2012.

No registramos ningún caso de infección post operatoria inmediata o tardía, demostrando la eficacia de la profilaxis y de la asepsia quirúrgica empleada.

Se pudo observar durante la evaluación clínica que la realización de defectos óseos de todos los animales de experimentación no ocasionó problemas al deambular mostrando así mismo un comportamiento normal en cuanto a su

alimentación y consumo de líquidos, esto nos permite considerar que el defecto óseo no implica inestabilidad en los sujetos de experimentación ni dolor, lo que coincide con lo reportado con Ramírez 2009, Pedro y Caballero 2012

Si bien observamos en los resultados de nuestro experimento ciertos cambios en cuanto a los parámetros hemáticos evaluados, principalmente el hematocrito y el conteo leucocitario antes y después de la cirugía, sin embargo, estos no rebasan los parámetros reportados en la literatura, coincidiendo con Pedro 2012.

Si bien el estado clínico general de todos los animales previo a la cirugía, era bueno, entonces, podemos atribuir al aumento de sus leucocitos y principalmente los linfocitos, reportados por el laboratorio, a la edad, ya que en los animales jóvenes se pueden tener incrementos considerables o bien al estrés prolongado durante su preparación como lo menciona Dunn en el 2012. También refiere que el Incremento de los monocitos observado en las evaluaciones de laboratorio durante el periodo posquirúrgico es debido muy probable a la presencia del material en el defecto óseo ya que son característicos de inflamaciones agudas o crónicas y pueden estar acompañadas de neutrofilia.

Duncan en el 2005 explica qué “Si bien los procesos inflamatorios demandan producción de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T principalmente que permiten activar ciertos factores que estimulan las colonias de células pluripotenciales; así como algunas citocinas mismas que se requieren durante la inflamación y la reparación de ciertos tejidos”.

Shahram en el 2012 expone en su investigación con respecto a los sustitutos óseos deduce que la implantación de sustitutos óseos inicia con una respuesta inflamatoria a la que generalmente el cuerpo responde siendo esto crucial para la degradación y vascularización de la implantación de sustituto óseo. Por otro lado se puede ver afectado el material implantado por diferentes células inmunes y mediadores inflamatorios como son la citocinas

Durante la revisión física de los animales sometidos al experimento y sobre todo en la zona de cirugía se pudo observar en el diámetro cráneo-caudal que las zonas de defecto control se incrementaron a partir de la primera semana, disminuyendo en forma paulatina hacia la sexta semana; esto coincide con el trabajo realizado por Pedro y Caballero 2012. Mientras que el defecto tratado tuvo un incremento con relación al control siendo más evidente la segunda y quinta semana; a diferencia de lo obtenido en el experimento realizado por Pedro y Caballero 2012.

Es importante considerar que en el trabajo de Pedro y Caballero 2012 el Ph del quitosán utilizado era de 5.5 a una concentración del 1%, mientras que en el nuestro, fue con una mezcla de quitosán con un ph 7.2 adicionándole hueso desmineralizado, esto alcalinizando aún más el ph.

Como se puede observar la acidez de los tratamientos de alguna forma incrementa el grado de inflamación y reparación. Ludmilla en el 2010 describe en un estudio realizado con una mezcla de hidrogel de quitosán a ph de 6.5 comparándolo con 4.5 y la adición de la proteína morfogénica tipo 2 (rhBMP-2), pudo observar in vitro que disminuía la actividad osteoinductiva y por ende la reparación ósea lo cual puede justificar los resultados obtenidos en el proceso inflamatorio.

En cuanto a la evaluación radiológica, Santoscoy en el 2008 hace referencia que los signos radiológicos más importantes a considerar en una reparación ósea son la densidad, forma, tamaño, contorno y arquitectura, siendo la primera la más importante para muchos autores ya que puede estar disminuida o aumentada. Aguilar 2005 argumenta que la respuesta periostial en la zona de transición se considera como un esfuerzo del hueso por establecer una naturaleza benigna en una lesión ósea.

Las imágenes radiográficas demostraron evidencia de reparación en el interior de los defectos óseos en los que se utilizó el material a diferencia de los defectos óseos controles en los que solo se observó respuesta leve- moderada sobre la cortical. La evaluación radiológica de la regeneración ósea generada por el injerto tiene como inconveniente principal la subjetividad del observador. Dichos hallazgos radiográficos se corroboraron con las imágenes histológicas. En relación a esta observación, la vascularización donde se realizó la implantación y la abundante presencia de células endoteliales y fibroblastos son determinantes en la respuesta a un implante osteoinductivo y/o osteoconductor de acuerdo a lo mencionado por Bauer en el 2000 y Stevenson en 1996 en sus investigaciones respectivas. Este hecho contrasta con la escasa respuesta osteoformadora observada en el estudio histológico del grupo control en los que no se rellenó la cavidad con el material de estudio, y que mostró una mínima reparación del interior del defecto óseo creado.

La utilidad del estudio radiológico es para evaluar complicaciones intercurrentes como son fracturas asociadas, migración del implante, calcificaciones extraóseas. En nuestro estudio no observamos ninguna de estas complicaciones al igual que en el estudio de Roche A. 2011

Las fases asociadas a la remodelación ósea se conocen como: activación-reabsorción-formación, y el tiempo que tarda en producirse este ciclo se conoce como periodo sigma. El sigma para los animales de orden superior incluido el hombre es de tres meses a seis meses y para los animales de orden inferior como el conejo se encuentra alrededor de las seis semanas, siendo evidente la respuesta periostial entre los 7 y los primeros 10 días de la lesión o de la fractura lo cual se puede observar radiológicamente durante el desarrollo de la reparación del hueso, sin embargo, Dennis en el 2010 menciona que existen factores que pueden modificar esta respuesta, principalmente el grado de inflamación

Para visualizar el material en los defectos creados a nivel celular, se utilizó la histología utilizando la tinción de H.E.

El material implantado se comportó como osteoinductor. Al igual que en la investigación de Shours 1999, éste aparecía recubierto de una capa de tejido de nueva formación en íntimo contacto con la superficie de los implantes. Ésta capa de hueso neoformado fue predominantemente de tipo membranoso, dado que no se evidencio la presencia de células condrales.

El biomaterial implantado fue reconocible en todos los casos, con mínimos cambios sugerentes de degradación o reabsorción tras 2 meses de seguimiento. Estudios realizados por Becker 1994, Brugnami 1996 y Froum en el 2002, en humanos usando hueso desmineralizado, hueso bovino desproteinizado por Dies 1996, Becker 1998, Artzi 2000 y Carmagnolo 2001, muestra la presencia de partículas del materia de injerto a los 6-9 meses de la inserción.

La regeneración ósea es centrípeta, es decir de la periferia al centro del defecto.

Ballester A. y Sueiro F. en el 2011, hacen mención qué, para que se produzca una adecuada reparación del tejido óseo, se debe desarrollar un complejo triangular de interacciones entre la capacidad osteogénica de las células osteocompetentes o diferenciables a la línea osteogénica, los estímulos osteoinductores, y la existencia de una matriz osteoconductor que sirva de estructura o andamiaje para la formación del hueso nuevo.

En este triángulo clásico de interacciones se acepta, y no debemos olvidar, que las células son las únicas capaces de formar hueso. Sin ellas no puede existir osteogénesis, aunque inundemos el foco de fractura de factores osteoinductores y osteoconductores.

Así, el concepto triangular de la reparación de las fracturas se sustenta en la existencia de tres elementos fundamentales: Los factores de crecimiento y las proteínas morfo genéticas óseas (BMPs) actúan estimulando, induciendo, la aparición y proliferación de células osteogénicas que iniciaran los procesos reparativos a través de andamiajes osteoconductivos

Cualquier proceso farmacológico o técnica quirúrgica aplicada a un organismo vivo tiene como principal objetivo acelerar el proceso fisiológico natural de restauración produciendo: Efecto tensor, reducción del volumen de la cavidad, efecto conductivo e inductivo. Los biomateriales actualmente existentes en el mercado tanto los de origen natural como los de origen sintético no han demostrado capacidad para llevar a cabo los requisitos mencionados, ya que, aunque sirven de ayuda a la auto regeneración, a menudo también actúan como barrera del proceso fisiológico de remodelación ósea al requerir un tiempo de reabsorción demasiado largo.

Conclusión

Después de varios meses de investigación y de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos concluir que:

El biomaterial utilizado no presenta efectos adversos ni complicaciones en ninguno de los individuos constatándose además su facilidad de manejo y adaptación a los defectos óseos.

El análisis histológico mostro actividad de remodelación ósea en aumento progresivo.

De acuerdo con la evaluación del periostio se pudo observar una mejor respuesta en el grupo experimental, lo que parece deberse a la presencia del material en el hueso tratado con la mezcla de quitosán y hueso, actuando como un osteoinductor.

La respuesta celular encontrada en los grupos experimentales sugiere de una ligera reacción de hipersensibilidad, sin que llegue a presentarse un rechazo al material implantado.

Durante la evaluación microscópica la integración del injerto, osteosíntesis y fibrogénesis fue positiva ya que se evidencia una neovascularización evidente en varios de los conejos del grupo experimental, siendo escasa en los grupos control. La presencia de osteoblastos u osteoclastos en la zona del defecto como indicio de reparación, organización o destrucción ósea; además de la respuesta inflamatoria.

El ph del material implantado mejoro la integración de éste ya que se disminuyó la reacción de hipersensibilidad que se mostró en el infiltrado celular.

Se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el experimental transcurridos 2 meses de la intervención quirúrgica.

Así, el presente estudio marca la pauta para la realización de otros trabajos de investigación con este material combinándolo con otros materiales, para ser utilizados como sustitutos de hueso.

El modelo experimental con conejos es una excelente opción para estudios de hueso.

Se puede afirmar que la regeneración ósea mediante relleno (biomateriales) es una técnica probada satisfactoriamente y basada en décadas de investigación quirúrgica.

Recomendaciones

- 1.-Se recomienda aumentar el número de sujetos de estudio para poder evaluar estadísticamente mejor los resultados obtenidos y que la diferencia estadística sea evidente.
2. El biomaterial utilizado se puede utilizar para aumentar la cicatrización en uniones retrasadas, no uniones, al estimular la formación rápida de callo de puente.
- 3.- Para sustituir los defectos principales en fracturas multifragmentadas, al establecer continuidad de los segmentos óseos y rellenar los defectos de hueso cortical, estimulando, por ello, la rápida formación de callo de puente.
4. Para el relleno de defectos resultantes de quistes óseos.

Bibliografía



1. Sanzana S. "Estudio comparativo de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutos óseos en defectos cavitarios experimental". Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 2004
2. Cornell C.N. "Regeneration of bone in critical defects. J Orthop Trauma, 1999.
3. Carrasco J., Bonete D., Gomar F., "Plasma Rico en Plaquetas vs. Plasma rico en factores de crecimiento". Revista Española de Cirugía Osteoarticular 2009; 46:1.
4. Flores G.E., Reyes J.E., Olmos R.Z., Rodríguez F.M.L., "Cicatrización e integración de hueso desmineralizado en tibias de perros (*canisfamiliares*) con osteotomías". Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
5. Brinker, Piermattei y Flo. "Manual de Ortopedia y reparación de fracturas de pequeños animales". Tercera edición. Mac Graw Hill. Interamericana 2000
6. Sesman A.L., León J.A., Fernández G., "Actualidades en regeneración y remodelación ósea craneal". Revisión de la literatura. Acta Pediátrica de México 2007;28:191.
7. Ballester A.J.; Sueiro F.J., "Biomateriales óseos en traumatología y cirugía ortopédica. Regeneración ósea. Biomateriales. Sustitutos óseos y sustitutos del injerto óseo". España. 2011
8. Shors EC. "Coraline Bone Graft substitutes. Orthop Clin North Am" ;30: 599-613, 1999
9. Proubasta Y, Gil MurJ, Planell JA (eds.) "Fundamentos de biomecánica y biomateriales". Ergon SA 1997
10. Abarrategui L.A., López L.J., Ramos V.M., "Estudio del quitosano como biomaterial portador de rbBMP-2: desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo". (Tesis Doctoral) Madrid España: Universidad Complutense de Madrid, 2008.
11. Muzzarelli R.A.A., "Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration". REVIEW. Carbohydrate Polymers ELSEVIER 2011;83:1433-1445.

12. Xiaohong W., Jianbiao M., Yinong W., Binglin H., "Bone repair in radio and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements". *Biomaterials* ELSEVIER 2002;23:4167-4176.
13. Soumitri P., Sricharan N., Anjali T., Sekaran S., Ambigapathi M., Nagarajan S., "Chitosan scaffolds containing silicon dioxide and zirconia nano particles for bone tissue engineering". *International Journal of Biological Macromolecules* ELSEVIER 2011;49:1167-1172.
14. De Corral E., Mesa A., Freiherr V., O'Valle R., "El maxilar inferior del Orden Lagomorpha como material de investigación en Implantología Experimental". *AVANCES* 2002;14:58.
15. Rojas D.S., Domínguez H.B.M., "Alternativas para obtener un injerto". *Acta ortopédica Mexicana*, 2002;16:225-239.
16. Estrada C, Paz A.C., López L.E., "Ingeniería de tejidos óseos: Consideraciones básicas". *Revista Escuela de Ingeniería de Antioquia*, 2006;5:93-100.
17. Shahidi F. Vidana A.J. Leon Y.J. "Food applications of chitin and chitosans. Trends in food science technology". 1999
18. Lárez V.C., "Quitina y Quitosano. Materiales del pasado para el presente y el futuro". *Avances en química*. 1(2), 15-21. 2006
19. Senel S., McClure S.J., "Potential applications of chitosan in veterinary medicine", *advanced drug delivery reviews*, Vol. 56, 2004.
20. Hiroshi, U., Takashi M., Toru F., "Topical formulations and wound healing applications of chitosan", *advanced drug delivery reviews*, 52, 2001.
21. Muzzarelli R., "Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone", *Carbohydrate Polymers* 76, 2009.
22. Chunmeng, S., Ying Z., Xinze R., *et al.* "Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine", *Journal of surgical research*, N. 133, 2006.
23. Lemus, C. J., Martínez Z. L., Navarro M., *et al.* "Obtención y uso de quitosán para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón", *Boletín electrónico* N 7, Facultad de Ingeniería, Universidad, 2007

24. Jue Y. L., Sung H. N., Su Y.I., et al, "Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan- based biomaterials", Journal of controlled release Vol. 78, 2002.
25. Guzman, M.J., El G.H., Pham M., et al, "Effect of chitosan particules and dexamethasone on human bone marrow stromal cell osteogénesis and angiogenic factor secretion", Bone 45, 2009.
26. Peñarrocha D. M., Sanchez G. M.A. "Regeneración ósea. Implantología Oral". Ed Ars Médica, 2001.
27. Baladrón R. J., "Reconstrucción de los maxilares con injertos óseos e implantes dentales. Discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina del Principado de Asturias". Sesión celebrada en Oviedo el 11 de Marzo de 2004.
28. Misch C.E., Sotereanos G., "Injertos de hueso autógeno para implantes endoóseos. Indicaciones, éxitos y fracasos". Ed Implantología Contemporánea 1995.
29. Anitua E. "Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento". Ed Puesta al día publicaciones SL, 2000.
30. Betts N., Fonseca R. "Allogenic grafting of dento alveolar clefts. Oral Maxilofac Clin North. 1991.
31. Ayelén A., Anibal S. "Obtención de Quitosano". Sitio Argentino de Producción Animal. 2012.
32. Mendoza H. "Injertos óseos alveolares" (internet) 2000. (fecha de acceso 09-abril-2013; disponible en: <http://www.encolombia.com/ortopedivol197-revision10-2.tmt>)
33. William B.I. "Actualización en cirugía bucal. Vol II Argentina: Editorial; 1981.
34. Raspall G. "Cirugía maxilofacial". Madrid: Panamericana; 1997
35. Whittick W.G. "Canine Orthopedics. Lea y Febiger". Philadelphia, Pennsylvania. USA. Editorial AEDOS. 1977.
36. Jubb K.V.F., Kennedy P.C., "Pathology of Domestic Animals, Volume 1". Third edition 1990. Barcelona
37. Dunn J. "Alteración en el número de leucocitos" Manual de Hematología y Transfusión en pequeños animales. España 2012
38. Hench LL. "A Biomechanical analysis of fixation of intra-articular distal radial fractures with calcium phosphate bone cement". J. Bone Joint Surg, 1998.
39. Le Geros RZ. "Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates". Clin Orthop, 2002
40. Sanzana S. "Estudio comparativo de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutos óseos en defectos cavitarios experimental". Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 2004

41. Katthagen B.D., "Bone regeneration with bone substitutes. An animal study". 1986; Am. 2001; 83A: S79-81
42. Gil-Albarova; Garrido J; Salinas A.J; Roman J. "The in vivo performance of a sol-gel glass san glass- ceramic in the treatment of limited bone defects biomaterials". 2004:25: 4639-24
43. Roche A. "Estudio y desarrollo experimental de nuevos materiales biodegradables para la reparación ósea". Tesis Doctoral. Universidad Zaragoza, 2011.
44. Ramirez 2009
45. Pedro P. M; Caballero R.N. "Estudio experimental de la osteosustitución con un biomaterial (Quitosán) durante la reparación ósea en un modelo en conejos" Tesis Licenciatura. Medicina Veterinaria UNAM. México 2012
46. Duncan 2005
47. Ludmilla L., Rougemont A-L, "Injectable rhBMP-2-loaded chitosan hydrogel composite: Osteoinduction at ectopic site and in segmental long bone defect". Wiley periodicals , 2010.
48. Shahram G., Barbeck M., "The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions in vivo: histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphates ceramics" published January 2012.
49. Santoscoy M.E. "Ortopedia, Neurología y Rehabilitación en Pequeñas especies, manual moderno". México D.F 2008.
50. Flores, G. E., "Integración de hueso desmineralizado en tibias de perros con osteotomías". AMMVEPE. 2003; 14(4): 123-125
51. Miranda C.S.P. "Evaluación de la actividad antibacteriana de Quitosán, Caracterización física y químicamente". Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Edo de México. 2006.
52. Domínguez G.L., "Evaluación de la capacidad antifúngica del quitosán proveniente del hongo *Mucor rouxii* y de camarón contra el hongo *Fusarium moniliforme* que afecta al maíz". Tesis de licenciatura. México, Cuautitlán 2010
53. Shors EC. "Coraline Bone Graft substitutes. Orthop Clin North Am" ;30: 599-613, 1999
54. Scheppers E, Ducheyne P. "Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: A 1-24 month experiment with several materials and size ranges". J of Oral Rehabilitation 1997; 24: 171

55. Martínez- González JM, Barona Dorado C, Baca Pérez- Bryan R. "La hidroxiapatita en el relleno de los defectos óseos". En www.coem.org/revista/anterior/07_97/articulo.html
56. Kasperk C, Ewers R, Simons B. "Hidroxiapatita derivada de algas (ficógena). Un estudio histológico comparativo". *AvPeriod* 1990;2:103-10
57. Losee JE, Karmacharya J, Gannon FH, Slem AE, Ong G. "Reconstruction of the immature craniofacial skeleton with a carbonated calcium phosphate bone cement: Interaction with bioresorbable mesh". *J of Craniofacial Surg* 2003; 14(1):117-24
58. Boix D, Gauthier O, Guincheux J, Pilet P. "Alveolar bone regeneration for immediate implant placement using an injectable bone substitute: An experimental study in dogs". *J Periodont* 2004; 75:663-71.
59. Aguilar- Cuevas MA, Vega Z.R, Abrego-Ayala CE, et al. "Osteoregeneración: Coagulite versus hidroxiapatita versus coagulite hidroxiapatita en lesiones maxilares de rata, con tomografía axial computarizada y microscopía electrónica de barrido". *Rec Mex Ortop Traum* 2000; 14(4): 289-96.
60. Furusawa T, Mizunuma H et al. "Investigation of early bone formation using bioactive glass in the rat mandible". *Int J oral and MaxillofacImplants* 1998; 13(5):672-6.
61. Martínez G. J, Barona D. C, Furió V. V, et al. "Estudio de la neoformación tras la aplicación de polímero HTR". *Avances en Periodoncia* 1997.
62. Prokop A, Jubel A et al. "Soft tissue reactions of different biodegradable polyactide implants". *J of Biomaterials* 2004.
63. Robert PM, Robert MF. "Periodontal guided tissue regeneration with a new resorbable polylactic acid membrane". *J Periodont* 1994.
64. Da Silva Pereira S, Wilson S. A Casati MZ. et al. "Comparison of Bioabsorbable and Non-Resorbable membranes in the treatment of Dehiscence-Type Defects. A Histomorphometric Study in Dogs". *J Periodont.* 2000.
65. Buser D. Hoffmann B. Bernard J. et al. "Evaluation of filling materials in membrane protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs". *Clin Oral Implant Res.* 1998
66. López A.J. De Vicente R.J. "Regeneración tisular en defectos óseos adyacentes a implantes dentales. Estudio morfológico y ultraestructural". *RCOE.* 2000.
67. Alpaslan C. Alphaslan G. "Bone reaction to subperiosteally implanted hidroxyapatite/collagen/glycosaminoglycans and coral in the guinea pig". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994.

68. Al Ruhaimi KA. "Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials". *Int J. Oral Maxillofac Implants*, 2001.
69. Schliephake H. Jamil M. Knebel J. "Experimental reconstruction of the mandible using polyactic acid tubes basic fibroblast growth factor in alloplastic scaffolds". *J. Oral Maxillofac Surg*, 1998.
70. Hollinger J.O. "Animal models for assessing bone repair with emphasis on polyhydroxy acid delivery systems". En: Brighton CT, Friedlaender G., eds: *Bone Formation and Repair*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Symposium, 1994.
71. Becker W., Becker B., Caffese R. "A comparison of desmineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction socket". *J. of Periodont*, 1994.
72. Brugnami F., Then P.R., Moroi H. "Histologic evaluation of human extraction socket treated with desmineralized freeze-dried bone allograft and cell occlusive membrane". *J. of Periodont*, 1996.
73. Dies F., Etienne D. "Bone regeneration an extraction sites after immediate placement of an e-PTFE membrane with or without a biomaterial. A report of 12 consecutive cases". *Clinical Oral Implant Res*, 1996.
74. Artzi Z., Tal H., Dayan D. "Porous bovine bone mineral in healing of human extraction socket. Part I. Histometric evaluation at 9 months". *J. of Periodont*, 2007.
75. Carmagnola D., Andriaens P. "Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. In: *Bone Tissue Reaction at sites grafted with bio-oss*". Thesis 2001, Goteborg, Sweden: Goteborg University.
76. Bauer T. W., Muschler G. F., "Bone grafts materials. An overview of the basic science". *ClinOrthop*, 2000.
77. Stevenson S., Emery S. E., "Factor saffecting bone graftin corporation". *ClinOrthop*, 2002.

“Nunca es demasiado tarde para ser quien quieras ser. No hay límite de tiempo, empieza cuando quieras. Puedes cambiar o quedarte ahí. Podemos aprovechar el tiempo o desperdiciarlo; veras cosas que te asombrarán, sentirás cosas que nunca antes habías sentido. Conocerás gente con otros puntos de vista, pero todo es parte de vivir. . . de aprender.”

Fabián Hernández Mendoza

