



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL DEL ESTADO DE SONORA
DR ERNESTO RAMOS BOURS

T E S I S

**EFFECTO DEL TIEMPO DE REHIDRATACIÓN DEL ALOINJERTO ÓSEO
LIOFILIZADO CORTICOESPONJOSO TRAS SOMETERLO A PRUEBAS DE
COMPRESIÓN MECÁNICA**

QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD DE ORTOPEDIA

PRESENTA:
Castillo Benavides Jaime

Dr. David Lomeli Zamora
Director médico de tesis

Biol. Nohelia G. Pacheco Hoyos
Director metodológico de tesis

Hermosillo, Sonora; mayo de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FIRMAS DE AUTORIZACIÓN

DR. FRANCISCO RENÉ PESQUEIRA FONTES
DIRECTOR GENERAL
Hospital General del Estado de Sonora
Tel (662) 259-25-00
rpesqui@gmail.com

DR. JORGE ISAAC CARDOZA AMADOR
DIRECTOR MÉDICO
Hospital General del Estado de Sonora
Tel. (662) 259-25-00
jicardoza@hotmail.com

DRA. CARMEN A. ZAMUDIO REYES
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ENSEÑANZA E
INVESTIGACIÓN
Hospital General del Estado de Sonora
Tel. (662) 259-25-00
enseñanzahge@hotmail.com

DR. JOSE MANUEL SERRANO BON
JEFE DEL SERVICIO DE ORTOPEDIA
Hospital General del Estado de Sonora
Cel. (662) 113-0514

DR. DAVID LOMELI ZAMORA

DIRECTOR MÉDICO DE TESIS
Hospital General del Estado de Sonora
Cel. (662) 223-1204
D_lomeli@hotmail.com

BIOL. NOHELIA G. PACHECO HOYOS
DIRECTOR METODOLÓGICO DE TESIS DE LA
DIVISIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
Hospital General del Estado de Sonora
Tel. (662) 259-25-00, Cel. (662) 113-32-49
noheliapachecoh@gmail.com

DR. JAIME CASTILLO BENAVIDES
RESIDENTE DE CUARTO AÑO DE TRAUMATOLOGÍA Y ORTOPEDIA
Hospital General del Estado de Sonora
Tel. (662) 1240814
jaime_cartero@hotmail.com

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y familia.

A mis maestros y compañeros de residencia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Hospital General del Estado Ernesto Ramos Bours.

A la Universidad de Sonora.

Al Servicio de Procuración de Órganos y el Instituto de Biotecnologías de México.

Al laboratorio de patología Centro de Patología.

Al laboratorio de ingeniería LESPI

DEDICATORIA

A mi familia.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	
1.1 Generalidades	3
1.2 Tipos de injertos óseos y definiciones	4
1.4 Injertos óseos	4
1.5 Procesamiento y esterilización del injerto óseo	6
1.6 Aloinjertos	7
1.7 Aloinjerto fresco	
1.8 Aloinjerto fresco congelado	
1.9 Aloinjerto liofilizado	
1.9 Aloinjerto desmineralizado	
1.9 Incorporación de los aloinjertos	
1.9 Método de preparación del injerto óseo liofilizado	
1.6 Justificación	
1.7 Objetivos	8
1.8 Hipótesis	
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODO	
2.1 Planteamiento del problema	33
2.2 Pregunta de investigación	34
2.3 Diseño de estudio	35
2.4 Población	35
2.5 Periodo de estudio	36
2.6 Tamaño de muestra	36
2.7 Criterios de selección	39
2.8 Aspectos éticos	40
2.9 Recursos empleados	12
2.10 Análisis de debilidades y fortalezas	13
2.11 Descripción de variables	14
2.12 Descripción general del estudio	15
2.13 Análisis estadístico	15
CAPÍTULO III. RESULTADOS, DISCUSIÓN, CONCLUSIONES	
3.1 Resultados	
3.2 Discusión	
3.3 Conclusiones	
3.4 Consideraciones y recomendaciones	

LITERATURA CITADA

RESUMEN

Con la necesidad de demostrar que el tiempo de hidratación del aloinjerto liofilizado es esencial, se realizó un experimento, en el cual se tomó injerto óseo liofilizado de una diáfisis de cúbito. Se tomó la diáfisis, se hicieron cortes de 1cm, y se obtuvieron 8 fragmentos. Estos fragmentos se dividieron en 2 grupos, el primero destinado a ser rehidratado por 10 minutos y el segundo destinado a ser rehidratado por 60 minutos. Posterior a este proceso se realizó una observación directa del injerto rehidratado y se sometieron a cargas con una prensa universal, hasta presentar un fallo. Se observó una mayor saturación de líquido en el injerto rehidratado por 60 minutos. La segunda categoría consistió en someter a cargas progresivas los especímenes de ambos grupos, el promedio de resistencia de carga del Grupo Experimental I toleró una carga de 240kg mientras que el Grupo Experimental II toleró una carga de 360kg en promedio. El injerto rehidratado por 10 minutos presentó un 34% menor resistencia a la carga. Se concluye que se debe rehidratar el injerto óseo liofilizado para que este tolere mayor carga al colocarse en el paciente y que realice adecuadamente su función de andamiaje. Además, la mejor hidratación del injerto óseo liofilizado esponjoso se logra a los 60 minutos de estar sumergido y el injerto óseo liofilizado soporta una mayor carga a compresión al ser hidratado.

Palabras clave:

Injerto óseo liofilizado, cargas, hidratación

ABSTRACT

To demonstrate that the rehydration time is essential for lyophilized bone allograft, experiment was conducted in which a lyophilized bone taken from an ulnar diaphysis was used. We performed 1cm cuts and obtained 8. Fragments. These fragments were divided into two groups, the first intended to be rehydrated for 10 minutes and the second intended to be rehydrated for 60 minutes. After rehydration process a direct observation of the graft was performed and catastrophic loads were performed using a universal press. Greater liquid saturation was observed in the graft rehydrated for 60 minutes. The second category consisted of progressive loads subjecting specimens of both groups the average load resistance Experimental Group I gave up a load of 240kg on average and the Experimental Group II tolerate a load of 360kg on average. The graft rehydrated for 10 minutes presented a 34% lower load resistance. It is concluded that should rehydrate the lyophilized bone graft to tolerate this increased burden placed on the patient and adequately perform its function of scaffolding. Better hydration of the lyophilized sponge bone graft is achieved within 60 minutes of being submerged.

The lyophilized bone graft supports greater compressive loads when rehydrated.

Keywords:

Freeze-dried bone allograft, loads, rehydration

INTRODUCCIÓN

La pérdida ósea en un paciente puede deberse a enfermedades infecciosas, enfermedades neoplásicas, consecuencias de traumatismo o secundario a un desgaste crónico. Como parte del tratamiento para éstas complicaciones se utilizan los injertos óseos. Cada tipo de injerto presenta características específicas, fuerza, osteoconducción, osteoinducción y estructura entre otras. Además, los injertos requieren de manejos especiales y requieren de preparaciones distintas.

Los pacientes que sufren pérdida ósea representan un alto nivel de complejidad por lo que se procura realizar intervenciones quirúrgicas innecesarias. Lo anterior debido a que cada incisión que se realiza en este paciente es un potencial foco de infección, un traumatismo y por lo tanto un mayor gasto metabólico para el paciente al tratar de reparar esa herida.

El origen del injerto es una de los factores más importantes. Existen injertos de distintas especies llamados xenoinjertos, mismo paciente llamados autoinjertos, homoinjertos de donantes vivos y aloinjertos los cuales provienen de bancos de tejidos. Debido a la amplia disponibilidad, bajo índice de contagios de enfermedades y la ausencia del riesgo de infección por tomar injerto de otro sitio del mismo paciente el aloinjerto es una buena opción para utilizar en pacientes con pérdida ósea.

Según las indicaciones del Instituto de Biotecnologías de México se menciona la rehidratación del injerto óseo liofilizado con solución fisiológica a temperatura ambiente por 60 minutos previo a colocarlo en el paciente. Se ha observado en procedimientos quirúrgicos que al utilizar este tipo de injerto se rehidrata por un menor tiempo al indicado,

es a partir de este hecho donde nace la curiosidad por saber si un menor tiempo de rehidratación alteraría las características de dicho injerto. En este trabajo se determinará si existe una diferencia en la resistencia a la presión si el aloinjerto óseo liofilizado es hidratado con solución fisiológica 10 minutos y 60 minutos, se realizó observación directa de las tonalidades que el injerto obtenía y posteriormente se sometieron a carga para conocer los límites catastróficos. El segundo parámetro a medir en este experimento es la hidratación del tejido posterior a ser sumergido en solución fisiológica teñida, para valorar este se vieron los tonos obtenidos por el injerto.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

Injertos óseos

El reemplazo de pérdida ósea representa un reto en la práctica quirúrgica donde además, la toma de decisiones en cuanto a la fuente para sustituir dicha pérdida sigue siendo difícil. Usualmente se prefiere la toma de autoinjerto en forma hueso esponjoso o cortical de sitios donadores, como la cresta iliaca y la porción distal del radio. Sin embargo, la cantidad disponible de dichos sitios donadores se encuentra limitada y puede presentar ciertas complicaciones como infección del sitio de toma de injerto (Cook y Cook, 2009). Los avances en manejo quirúrgico e investigación médica han producido un amplio espectro de sustancias potencialmente útiles como injerto óseo. Las consideraciones para elegir el tipo de injerto óseo o sustitutos óseos incluyen características, capacidad, disponibilidad, morbilidades del paciente, factores inmunológicos, transmisión de enfermedades y costo (Shibuya y Jupiter, 2015).

En décadas recientes se ha presentado una tendencia en el incremento del uso de sustitutos óseos a pesar de la poca evidencia de sus indicaciones y su seguridad. Cada uno tiene beneficios y factores potenciales en contra donde el médico debe evaluar el riesgo/beneficio antes de tomar una decisión. Toda discusión en injertos óseos y sus sustitutos debe comenzar con las metas del reemplazo óseo. Por ejemplo, para injertar hueso se deben tomar en cuenta las siguientes propiedades, que idealmente el injerto debe proveer (Hartigan y Cohen, 2005; Moore et al., 2001; Cypher y Grossman, 1996):

Osteogénesis: es el injerto con células osteogénicas que cuenta con la maquinaria para sintetizar, osteoblastos, o células progenitoras capaces de sobrevivir el proceso de trasplantarlo y producir hueso nuevo.

Osteoinducción: es el medio con factores de crecimiento necesarios para inducir la diferenciación de células progenitoras a células productoras de hueso. Éste es un complejo proceso que involucra señales como la de la súper familia del factor transformador de crecimiento Beta.

Osteoconducción: una matriz bioactiva que provee el marco adecuado para crecimiento óseo. Ésta matriz provee soporte y facilita en crecimiento fibrovascular, migración de células progenitoras del hospedero hacia el andamiaje, unión de osteoblastos y eventualmente formación de nuevo hueso. Ésta habilidad depende en contacto directo con superficies óseas.

Integridad estructural: es la fuerza estructural del material injertado en compresión y resistencia a la torsión.

Osteointegración: es la capacidad del injerto para integrarse y unirse al hueso del hospedero (Baht y Rozental, 2012).

Los injertos óseos biológicos se distinguen de los sintéticos por que provienen de fuentes distintas, motivo por el cual requieren una variedad de preparaciones (Millis y Martinez, 2003; Heppenstal 1983). Sin embargo, los mecanismos por los que se integran al hueso del hospedero son similares. Eventualmente, todos los injertos serán sustituidos por tejidos del hospedero por un proceso que se conoce como, invasión y sustitución (Millis y

Martinez, 2003; Schenk 1987). La función estructural del injerto óseo, ya sea de “espaciador” o dar soporte, aunado a la técnica de fijación influye en la incorporación del injerto considerablemente y puede tomarle años a un injerto ya sea incorporarse o ser rechazado (Urist, 1989).

Las células del mesénquima, osteoprogenitoras y capilares, ya sea de la médula ósea, el periostio, el endostio o tejidos circundantes, crecen a través de la estructura porosa del injerto óseo. Estas mismas células, estimuladas por sustancias locales, se diferencian en osteoblastos, produciendo osteoide mineralizado que se deposita en la matriz ósea o estructura sintética. Por otro lado, los precursores de osteoclastos son reclutados del sistema circulatorio y se diferencian para facilitar la remodelación del injerto hacia hueso lamelar (Millis y Martinez, 2003; Shenk, 1987; Nade et al., 1983). El pretratamiento que recibe el aloinjerto o xenoinjerto es para reducir la posibilidad del rechazo (Millis y Martinez, 2003).

Tipos de injertos óseos y definiciones

Existe una diferencia entre injerto óseo fresco y el preservado. El injerto óseo se puede transferir inmediatamente del sitio donante al receptor y se considera injerto fresco. Los injertos preservados incluyen hueso cadavérico preparado especialmente. Por ejemplo, decalcificado, deshidratado y congelado, irradiado o estéril. En una tercera categoría se encuentran los reemplazos óseos sintéticos que consisten en cerámicas como fosfato tricalcico o hidroxiapatita, polímeros y compuestos (Fackelman y Auer, 1999).

Los injertos óseos pueden clasificarse según su origen. Un injerto tomado de un sitio y aplicado a otro del mismo individuo se conoce como autoinjerto. Un aloinjerto se refiere al tejido tomado de un individuo y aplicado a otro genéticamente distinto pero de la

misma especie. El tejido tomado de un individuo y colocado a otro de otra especie es conocido como xenoinjerto (Auer y Stick, 2012).

A los injertos preservados se les da un pretratamiento ya sea congelado, congelado-deshidratado, irradiado, esterilizado o decalcificación (Millis y Martínez 2003; Burchardt 1981). Este proceso mata las células viables del hueso, reduciendo la antigenicidad, permitiendo el almacenamiento seguro y estéril del injerto óseo. Estos injertos se mantienen en bancos de hueso, por lo que se encuentran disponibles para ser solicitados (Urist, 1989; Burchardt, 1981). La disponibilidad del tejido previene la necesidad de una segunda cirugía, por lo que disminuye también el evento quirúrgico (Auer y Stick, 2012).

El hueso es el segundo material más implantado durante procedimientos quirúrgicos en seres humanos, siendo el primero la transfusión sanguínea, con una cantidad de 600,000 injertos óseos colocados anualmente (Marino y Ziran, 2009). A pesar de que el mercado para reemplazos óseos sintéticos tiene un valor mayor a \$1 billón de dólares, las ventas por injerto óseo es menor a la mitad de esta cantidad (Marino y Ziran, 2009). Existen reportes de injerto autólogo de hueso desde la época egipcia, sin embargo el estudio científico moderno de los injertos inició en el siglo XIX. Desde entonces, las indicaciones, metodología y ciencia de injertos óseos a pacientes con pseudoartrosis y pérdida ósea se han establecido y afinado, y se han desarrollado nuevos métodos de cultivar y tratar los injertos (Marino y Ziran, 2009).

Algunas influencias sistémicas así como factores locales, por ejemplo citosinas sistémicas, mediadores de inflamación y factores de crecimiento son de suma importancia para los mecanismos de osteoinducción (Bourque et al., 1993; Mundy, 1993). Las citosinas

son polipéptidos capaces de enviar señales a células a través de receptores específicos en la superficie celular. Los mediadores de la inflamación suscitan cambios en el metabolismo celular activando ciclos como el adenosina monofosfato o guanosina monofosfato, los cuales desempeñan diversas funciones entre ellas la del metabolismo del glucógeno, azúcar y lípidos (Ralston y Grabowski 1996; Lorenzo, 1991). Citosinas como las interleucinas y factores de necrosis tumoral, además de mediadores inflamatorios como óxido nítrico y prostaglandinas como la E2, pueden ser producidas por la mesénquima local, tejido fibroso o vascular. Estas señales atraen y reclutan células mesenquimales indiferenciadas del medio hacia el área local, las cuales pasarán por el proceso de diferenciación a osteoblastos; estas mismas señales inducen la degradación ósea, facilitando la integración del injerto óseo.

Debido a los efectos de la invasión de las células locales y la degradación de la matriz ósea, se produce una cantidad innumerable de factores de crecimiento los cuales son liberados permitiendo que las células del mesénquima crezcan y se diferencien (Bourque et al., 1993). A través de varias generaciones celulares, el injerto pasa por osificación endocondral donde este hueso es sustituido más tarde por hueso lamelar. Los factores de crecimiento que se encuentran involucrados en la consolidación ósea y la integración de los injertos óseos son factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento parecido a la insulina (ILGF) factor de crecimiento transformador (TGF) y proteína ósea morfogenética (BMP), incluida proteínas osteogénicas (OP) (Bourque et al., 1993). Las BMP y OP pertenecen a la superfamilia de TGF-B (Mundy, 1996). Varias BMP son ahora producidas sintéticamente por procesos recombinantes con tecnologías de biología molecular y son utilizadas para promover la integración de los injertos (Auer y Stick, 2012).

El soporte, otra importante función de los injertos óseos, es principalmente obtenido de injertos corticoesponjosos y osteocondrales. Estos injertos se pueden transferir como autoinjerto, vascularizados o como aloinjertos. En el aloinjerto cortical hay una menor cantidad de células sobrevivientes que en el esponjoso y la nutrición de los injertos depende de la formación de nuevos conductos de Volkman y sistemas de Havers, lo cual indica que se trata de un proceso lento que puede tomar más de un año dependiendo del tamaño del injerto (Burchardt, 1983).

Procesamiento y esterilización del injerto óseo

El proceso por el cual se esteriliza y se prepara el aloinjerto puede alterar dramáticamente sus propiedades y afectar su calidad y seguridad. Los aloinjertos son regulados por la F.D.A. (Food and Drug Administration) y la Asociación Americana de Bancos de Tejidos (AATB por sus siglas en inglés) (Cook y Cook, 2009).

Las guías para la toma apropiada, esterilización y almacenaje del injerto óseo se encuentran disponible a través del manual del "Standards for Tissue Banking" el cual se actualiza frecuentemente por la AATB. Los donadores son elegidos por una serie de cuestionarios estandarizados, pruebas, exámenes físicos, historial médico, reportes de autopsia y bajo consentimiento donde la aprobación final para la donación es determinada por un médico. Los donadores de tejidos musculoesqueléticos son automáticamente rechazados si hubiera exposición a alguna sustancia tóxica o enfermedad ósea o autoinmune (Rigney 2009).

Una vez que un donador es identificado y considerado elegible, la toma de injerto, el tiempo, el manejo y almacenaje del tejido debe seguir estrictamente las guías de la

AATB. Las técnicas de asepsia están estandarizadas e implementadas para todos los bancos de tejidos acreditados por la AATB. Lo tejidos deben ser tomados del donante en las primeras 24 horas posteriores a la asistolia. En caso de que el cuerpo haya sido enfriado o en las primeras 15 horas posteriores a la muerte si el cuerpo no fue enfriado. Posterior a la toma del tejido, estos son cultivados mediante frotis de toda la superficie con un hisopo que se conserva en tubo de cultivo de ensayo estéril. Una vez que los cultivos resultan negativos, el tejido musculoesquelético es procesado y transportado bajo ambiente controlado y estéril según las normas de la AATB. Posteriormente se utiliza la esterilización secundaria con la intención de eliminar toda posibilidad de infección de cultivos con resultado falso positivo o el manejo de los injertos. Este proceso de esterilización debe ser efectivo en erradicar cualquier bacteria, hongo o virus posible, intentando mantener las propiedades biológicas y mecánicas del tejido.

A pesar de que el óxido de etileno era una técnica popular para esterilización anteriormente, la mayoría de los bancos de tejidos han discontinuado su uso debido a un aumento en falla de injerto y sinovitis crónica los cuales se han atribuido a este (Caldwell y Shelton, 2005; Rihn y Harner, 2003). Para la utilización del método previamente descrito se requiere que la falla del injerto que sea reducida por debajo de cierto nivel según normas de la AATB. Radiación Gamma es otro método popular para esterilización secundaria. La dosis más alta conocida que no altera las propiedades biomecánicas de los injertos es de 2.5mrad. Actualmente la mayoría de los centros utiliza una dosis de 2.5mrad. Muchos estudios han demostrado que esta dosis es eficiente en eliminar bacterias de la superficie, pero dosis mayores a 3mrad son necesarias para matar virus (Caldwell y Shelton, 2005; Rihn y Harner, 2003).

Aloinjertos

Los aloinjertos son la alternativa más utilizada en cirugía reconstructiva de pie y tobillo, estos pueden ser frescos, frescos-congelados, liofilizados o demineralizados (Cook y Cook, 2009).

Aloinjerto fresco

Posterior a una selección y revisión rigurosa, se obtiene aloinjerto fresco de cadáver, lentamente enfriado y almacenado en un medio a 4°C. De acuerdo a la AATB, los especímenes pueden almacenarse de esta manera hasta por seis semanas, pero el tiempo que toma en transplantarse puede influenciar en los resultados (Farr, 2001). Se requieren, según la AATB, pruebas de seguridad por lo menos por 14 días antes de liberar aloinjertos frescos.

El tamaño del injerto también debe ser exactamente pareado. Tradicionalmente se utilizan mediciones de radiografías en proyecciones AP y lateral. Sin embargo, actualmente se utilizan programas de reconstrucción tridimensional para mejorar la selección del tamaño del injerto (Aponte et al., 2008).

Aloinjerto fresco congelado

El principal motivo para congelar aloinjerto es de reducción de la inmunogenicidad, aumentar la vida y proveer una opción más práctica que los aloinjertos frescos. Se realiza de tal manera que se preservan las propiedades osteoconductoras y osteoinductivas, y su fuerza. Este tipo de injerto puede ser utilizado para sustituir una región masiva de un hueso

o un hueso en su totalidad. Los injertos congelados deben ser descongelados intraoperatoriamente y no requiere rehidratación (Andrade et al., 2008).

El aloinjerto congelado puede llevarse a cabo bajo congelamiento convencional (-15 a -30° C), congelamiento profundo (-60 a -80°C) o congelamiento con nitrógeno líquido (-160 a -180°C) (Benzel y Leon, 2001). La mayor parte de los injertos son congelados a -70°C a -80°C y se debe mantener bajo esta temperatura durante la transportación y almacenamiento (Laintinen et al., 2006). La congelación profunda puede debilitar el hueso donde se piensa que el injerto mantiene aproximadamente el 70% de la fuerza del hueso normal. Posterior al congelamiento, el injerto es esterilizado (Eagle et al., 2005). La vida de almacenamiento del injerto varía desde 1 a 10 años, dependiente de las técnicas de procesamiento. Cada banco de hueso tiene guías únicas y sólo los bancos de hueso acreditados por la AATB deben ser utilizados (Andrade et al., 2008).

Las propiedades osteoinductivas dependen significativamente de las características de almacenamiento y procesamiento del injerto. De congelarse muy rápidamente o almacenarse a temperaturas inadecuadas, el injerto puede volverse completamente acelular. Se utiliza la criopreservación para congelar el hueso de manera controlada para que los cristales de agua no lesionen las células viables y no suceda la apoptosis (Simpson et al., 2007). Temperaturas más bajas han dado como resultado células no viables en modelos animales (Simpson et al., 2007; Laitinen et al., 2006; Muscolo et al., 2000).

Aloinjerto liofilizado

Posterior a su congelamiento, el injerto; es liofilizado. Es decir pasa por un proceso de deshidratación donde el agua es removida por presión negativa. Este proceso destruye todas

las células viables, inactiva los agentes virales y altera la estructura del hueso. Las ventajas de un aloinjerto liofilizado incluyen las propiedades osteoconductoras, un bajo potencial antigénico, la posibilidad de ser almacenado a temperatura ambiente, un tiempo de almacenamiento indefinido y un costo menor comparado con las alternativas previamente mencionadas. Sin embargo, este tipo de tejido no puede ser utilizado en resecciones tumorales masivas debido a su fuerza mecánica reducida. Sólo el 30% de la fuerza de un hueso normal es mantenida posterior al procesamiento y esterilización (Nather, 2002).

De acuerdo a Aponte y a los manuales propuestos por la Asociación Americana de Bancos de Tejidos se indica que el injerto debe ser hidratado por el tiempo indicado para que recupere las características previas a su preparación.

El proceso por el que se integrará el injerto óseo liofilizado es llamado sustitución por absorción (Ward et al., 2008). La unión cortico-cortical se une más lentamente (media de 542 días) que la unión cortico-esponjosa a cortico-esponjosa (media de 243 días) (Calvo et al, 2011). La liofilización, previo o posterior a la radiación gamma resulta en una pérdida de la fuerza en un promedio del 35 – 31%, 14 – 37% en rigidez y 46 – 37% en límite para fallas (Cornu et al. 2011). Debido a este proceso de liofilización el hueso además de la capacidad de carga pierde la capacidad de osteoinducción, disminuye su antigenicidad ampliamente, en contraste a esto es absorbido mas fácilmente por el cuerpo para ser posteriormente sustituido. Este proceso aumenta el módulo de elasticidad así como la fuerza a la compresión del hueso, que al ser rehidratado el injerto disminuyen drásticamente (Kübler et al. 1993).

Aloinjerto desmineralizado

El ácido clorhídrico desmineraliza la matriz ósea y extrae proteínas acido-solubles. Posterior a lavados sucesivos, molidos y esterilización puede ser liofilizado para permitir el almacenaje a temperatura ambiente. Lo que se mantiene es matriz ósea desmineralizada, factores de crecimiento, colágeno, proteoglicanos y proteínas óseas morfogenéticas. La proteína ósea desmineralizada tiene propiedades osteoconductoras pero no capacidades estructurales (Cook y Cook 2009).

Incorporación de los aloinjertos

La incorporación de los aloinjertos por un huésped difiere de la observada en los autoinjertos en una neoformación ósea más lenta, consolidación retardada y menor penetración vascular. Para la incorporación de los injertos óseos, las trabéculas deben ser reabsorbidas al menos parcialmente con aposición posterior al hueso nuevo. Este modelo de reabsorción-aposición o “sustitución por absorción” es totalmente dependiente de la vascularización del injerto.

La mayoría de los autores está de acuerdo en que las células osteogeneradoras tienen varias fuentes de producción como son células de la médula ósea, tejidos blandos del lecho receptor y elementos celulares circulantes sanguíneos. El proceso de neoformación vascular aporta células progenitoras capaces de diferenciarse en células de la línea osteogénica, condrogénica y fibrogénica (Ward et al., 2008).

El tipo de unión entre el hueso receptor y el injerto tiene un efecto mayor en la incorporación del mismo (Ward et al., 2008). La unión cortico-cortical se une más

lentamente (media de 542 días) que la unión cortico-esponjosa a cortico-esponjosa (media de 243 días) (Calvo et al, 2011).

La exitosa incorporación del injerto óseo depende de la interacción de los siguiente seis parámetros: el sitio, la viabilidad del injerto óseo, el volumen del injerto, los factores de crecimiento del hospedero, la actividad metabólica y la función estructural del injerto óseo (Burchardt, 1989; Urist 1989).

Las condiciones y la localización del sitio de colocación del injerto determinan la respuesta a las células osteoprogenitoras y el tejido conectivo perivascular. Distintos huesos presentan distintas tasas de curación a las fracturas, dependiendo del flujo sanguíneo local y la actividad de la médula ósea. A mayor viabilidad y menor compromiso del sitio a injertar, es mejor la aceptación del injerto óseo (Auer y Stick, 2012).

Entre mayor sea el volumen del injerto a ser colocado, le tomará un mayor tiempo incorporarse completamente y ser remodelado por el tejido. Entre mayor sea el tiempo necesario para una incorporación completa, existe mayor probabilidad de que presente complicaciones. En defectos grandes, hay una mayor necesidad para incorporar un injerto de superficie grande, como el injerto esponjoso. Este tipo de injerto requiere de rigidez absoluta hasta la que se alcance la rigidez estructural (Auer y Stick, 2012). La actividad de los factores de crecimiento del hospedero y el injerto óseo induce la proliferación del tejido conectivo perivascular, facilitando la osteogénesis. La integración del injerto óseo puede verse aumentada por factores de crecimiento por el reclutamiento de células locales (Auer y Stick, 2012).

El índice de actividad metabólica, compuesto por parámetros como la frecuencia cardíaca, el flujo sanguíneo, tasa metabólica basal, frecuencia respiratoria y temperatura corporal, se encuentra correlacionada con la capacidad de incorporar el injerto óseo, reparar fracturas y repuesta a factores de crecimiento local. Por otro lado, el índice de actividad metabólica en humanos es 1.0, cercano a la de los canes que es 1.5 (Auer y Stick, 2012). A partir de esto podemos extrapolar resultados de investigación en canes y aplicarlos en tratamientos en seres humanos.

Método de preparación del injerto óseo liofilizado

El proceso de liofilización involucra la deshidratación del hueso con una posterior congelación del mismo, se describirá paso por paso el proceso. El hueso es cortado y se le da forma utilizando una herramienta de precisión, llevándolo a la forma ideal para una liofilización adecuada. Se remueven células, sangre y tejido adiposo al impregnar el tejido en agua destilado (12–15 horas), cloroformo (72 horas), metanol (4 horas) y en agua oxigenada (2 horas). Posterior a un lavado final, las piezas se congelan a -80°C por una noche. La liofilización se lleva a cabo en dos fases. En la primera fase se sublima el hielo al disminuir la presión de la cámara interna a 3mbar, a una temperatura de -50°C por cuatro horas. En la segunda fase el agua residual es eliminada al incrementar la temperatura a una presión de 0.6mbar por una noche. La temperatura dentro de la cámara interna y dentro del hueso no excede de 10°C en la segunda fase. Finalmente, las piezas son empacadas al vacío en bolsas triples de polietileno y esterilizadas por radiación utilizando radiación gamma generada por Cobalto 60 a una dosis de 25Kgy o 2.5 Mrad (Dallari et al., 2005).

Se han realizado estudios para identificar los efectos del procesamiento, esterilización, liofilización y rehidratación en hueso cortical de origen bovino. En este estudio se compararon tres grupos, uno en el cual se prueba el hueso previo al proceso de liofilización y esterilización, el segundo posterior a liofilización y esterilización y un tercer grupo posterior a ser rehidratado, en esta ensayo se les realizaron pruebas de flexión y de tensión, encontrando que el injerto rehidratado presentaba una mayor resistencia a estas fuerzas en un 35.37% en la tensión y de un 51.91% en la flexión (Dingee et al. 2005).

En un estudio se tomaron muestras pareadas de distintos sitios de cadáveres, se tomaron especímenes de 14mm, los cuales fueron liofilizados. Posteriormente se llevaron a cabo tres métodos distintos de rehidratación y se comparó con de manera biomecánica con el injerto sin hidratación pareado anatómicamente. El grupo 1 comparó 20 injertos tomados de cadáveres, pareados anatómicamente y posteriormente congelados. El grupo dos comparó 22 injertos liofilizados rehidratados por 24 horas. El grupo tres comparó 20 injertos liofilizados que no fueron rehidratados con injerto rehidratado por 24 horas. El grupo 4 comparo 28 injertos liofilizados rehidratados al vacío por una hora con aquellos rehidratados por una hora. Estos injertos fueron sometidos a fuerzas de compresión en una prensa hidráulica. Los resultados arrojaron que a mayor hidratación el injerto presentaba una disminución en la fuerza (Conrad et al. 1993).

Compresión

Los huesos largos se ven sometidos a distintas sollicitaciones, una de ellas es la compresión. La cortical del hueso es la encargada de tolerar dichas cargas. El trabajo necesario para

fracturar cada material es el área total bajo la curva de tensión. El trabajo requerido para fracturar un material recibe el nombre de resistencia a la fractura.

Una razón por la cual los materiales más blandos pueden ser más resistentes, puede verse al considerar lo que sucede en el extremo de una fisura bajo esfuerzos en dicho material: los grandes esfuerzos en el extremo de la fisura causan, localmente flujo viscoso a plástico. Como resultado, la fisura debe absorber más trabajo: el material cercano a la fisura se deforma severamente. Este trabajo se sumará a la energía de superficie. Así, la ductilidad, aunque sea poca, aumenta el esfuerzo de fractura. En consecuencia un impacto provoca fallas con mayor facilidad. El efecto se amplifica más, debido a que una fisura crece, si se dispone de la energía necesaria; sin embargo, una vez que se inicia el crecimiento, se necesita menos energía para propagar la fisura y es inevitable un mayor crecimiento. Por otra parte, si por alguna razón se retardó el crecimiento, se necesitará más energía para continuarlo con esto el crecimiento de la fisura disminuirá hasta detenerse.

Se puede describir como un apretón. La unidad al estar comprimida se deforma, se acorta en la dirección de la fuerza de compresión al mismo tiempo que se expande lateralmente. La resistencia que presenta a la fractura por aplastamiento depende de dos factores: la geometría de la estructura y el material del cual está hecho. El esfuerzo de compresión o fuerza por unidad de área transversal se mide en unidades las cuales son fuerza por área dada. La deformación es el resultado de dividirla entre la altura inicial (Raddin 1992).

JUSTIFICACIÓN

En búsqueda de una pauta para la rehidratación del injerto óseo liofilizado, se realizará este ensayo, las especificaciones del fabricante indican la rehidratación de este tipo de injerto utilizando solución salina isotónica a temperatura ambiente, tratándose de injerto óseo liofilizado corticoesponjoso debe hidratarse por una hora, en ocasiones se lleva a cabo esta hidratación por menos tiempo del recomendado por el fabricante ignorando las consecuencias de esto. Se busca conocer las diferencias en cuanto a la resistencia a la carga posterior a ser el injerto restituido con solución fisiológica por 10 y 60 minutos, se comparará esta capacidad de cargar con la hidratación de las fibras de colágena del injerto óseo liofilizado. Existen estudios que relacionan el tiempo de hidratación con la resistencia a la carga, no se han realizado estudios que correlacionen la hidratación con la capacidad de tolerar una carga. Conocer esta relación nos ayudará a comprender la importancia de una correcta preparación del injerto por lo que se le dará un mejor manejo y se esperan mejores resultados para el paciente. Es importante comprender las características biomecánicas y biológicas, así como el proceso de curación de diferentes tipos de aloinjertos para elegir el injerto adecuado para la aplicación clínica buscando obtener mejor resultado clínico (Nather 2002).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Que se rehidrate el injerto óseo liofilizado adecuadamente de manera que el proceso de integración-sustitución se lleve a cabo una vez implantado en el paciente.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar el grado de hidratación con la resistencia a la compresión entre los dos tiempos de hidratación evaluados (10 y 60 minutos).
2. Observar si al estar más tiempo sumergido en solución fisiológica teñida se aprecia la calidad de la hidratación del injerto óseo liofilizado.
3. Identificar si el injerto que tolera más carga es el que se encuentra mejor hidratado.

HIPÓTESIS CIENTÍFICA

Se espera encontrar que al rehidratar 8 especímenes injerto óseo liofilizado corticoesponjoso de 1cm de largo x 1.4cm diámetro con solución fisiológica a temperatura ambiente por 60 minutos, éste presentará mayor resistencia a la carga axial en un 40% que al ser hidratado por tan sólo 10 minutos.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODO

2.1 Planteamiento del problema

El problema consiste en demostrar objetivamente que el injerto óseo liofilizado rehidratado tiene una mejor función osteoconductor al colocarlo como puente en un sitio de pérdida ósea rellenando un espacio. Otro obstáculo es de mostrar la calidad de la hidratación en base al tiempo de sumersión del injerto. Se plantea un experimento en el cual tomamos en cuenta el tiempo de rehidratación y la tolerancia a carga del injerto.

2.1.1 Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de la hidratación en la función estructural del tejido?

2.2 Metodología

2.2.1 Diseño del estudio

Tipo de estudio	Descripción
Experimental	Estudio donde el investigador manipula y controla el factor de estudio. Existe por lo general, un grupo de análisis control y uno o más grupos experimentales.
Biomecánico	Tipo de estudio experimental donde los sujetos son pacientes ya sea vivos o modelos cadavéricos y se evalúa uno o más tratamientos para el control de un padecimiento.
Prospectivo	Es un estudio a tiempo real que sigue un diseño previo pero que se realiza en el presente.
Transversal	Observación del experimento en un solo momento.
Asignación aleatoria	Se tomaron al azar los fragmentos que formaron cada grupo

2.2.2 Población

Se utilizaron 8 muestras de aloinjerto de hueso corticoesponjoso liofilizado de la diáfisis de un cúbito cortado en fragmentos de 1cm de largo x 1.4 de diámetro.

2.2.3 Periodo de estudio

El periodo para la realización de la investigación comprendió de enero a julio de 2015.

2.2.4 Tamaño de la muestra

Un grupo de cuatro fragmentos de injerto óseo liofilizado corticoesponjoso que se rehidrató por un lapso de 10 minutos sumergido totalmente en solución fisiológica a temperatura ambiente. Un grupo de cuatro fragmentos de injerto óseo liofilizado corticoesponjoso que se rehidrató por un lapso de 60 minutos sumergido totalmente en solución fisiológica a temperatura ambiente.

2.4 Aspectos éticos de la investigación

El protocolo de tesis cuenta con la aprobación del Comité de Bioética del Hospital General de Estado. Además, la investigación se rige de acuerdo a la normatividad indicada en la fracción I del artículo 89 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, y con fundamento en los artículos 1o.; 2o.; 3o., fracción XXVI; 4o.; 7o.; 13 "A", fracciones I, II y X; 14; 18; 23; 24, fracción I; 27, fracción III; 32; 33; 45; 47; 100; 313 a 350 y demás relativos de la Ley General de Salud.

2.4.1 Recursos empleados

Recursos humanos:

- Médico residente de cuarto año en Traumatología y Ortopedia.
- Director médico de tesis.
- Director metodológico y estadístico de tesis.
- Ingeniero en suelos Víctor Javier Palafox con especialidad en Calidad de Materiales

Recursos físicos:

- Injerto óseo liofilizado corticoesponjoso
- Segueta marca Truper

Equipo de laboratorio:

- Centro de patología
- Caja de Petri
- Azul de metileno
- Paleta de colores Pantone Color Chart
[\(<http://www.usagdn.com/blogs/tools-resources/12579457-pantone-color-chart>\)](http://www.usagdn.com/blogs/tools-resources/12579457-pantone-color-chart)
- Aparato de falla universal marca Forney
- Laboratorio de pruebas en ingeniería LESPI en Hermosillo, Sonora.

Recursos financieros:

El material para el trabajo experimental fue patrocinado por el laboratorio Instituto Nacional de Biotecnología. Además, la realización de las pruebas experimentales requirió del uso de laboratorios especializados y personal de análisis.

2.4.2 Análisis de debilidades y fortalezas

Previo a la elaboración del protocolo de investigación, se realizó un análisis FODA para identificar los puntos fuertes y débiles del proyecto. En el análisis se encontró que la realización del proyecto se ajusta a las necesidades y objetivos del investigador donde la cantidad de oportunidades y fortalezas del proyecto es superior a la cantidad de debilidades y amenazas.

La evaluación generó la siguiente matriz FODA:

Fortalezas	Oportunidades	Debilidades	Amenazas
<ul style="list-style-type: none">- Libre acceso a información científica en journals y biblioteca digital UNAM.- Infraestructura funcional del área de trabajo.- Acceso a las instalaciones del DICTUS, UNISON.- Acceso a Centro de Patología y Laboratorio de Ingeniería LESPI	<ul style="list-style-type: none">- Proyecto de alcance alto con posibilidad de publicación.- Implementación de nuevas técnicas de uso para el servicio.- Oportunidad de vínculo de investigación con el DICTUS UNISON, Laboratorio LESPI, Centro de Patología, y el HGE.- Participación en	<ul style="list-style-type: none">- Posibilidad de muestra escasa.- Proyecto de alto costo económico y financiamiento limitado.	<ul style="list-style-type: none">- Baja posibilidad de fallo experimental anexo a la baja cantidad de muestra.

- Experiencia profesional en el área de investigación por parte de los colaboradores del proyecto.
- Experiencia académica por parte de los directores de tesis.
- Ajuste de tiempo académico adecuado.
- Proyecto de alto alcance.
- Proyecto experimental.
- Proyecto pionero en área de investigación experimental del departamento de Ortopedia del HGE.
- Proyecto con financiamiento.

2.5 Definición de las variables según la metodología

Variables dependientes: hidratación, resistencia a la carga, grado de hidratación.

Variables independientes: tipo de injerto, tamaño del injerto, cantidad de solución fisiológica, tiempo de hidratación, peso del injerto

Variable	Tipo de variable	Definición operacional	Escala de medición	Indicador
Tipo de injerto	Independiente	Preparación que se le da al injerto	Cualitativo	Liofilizado corticoesponjoso
Tamaño del injerto	Independiente	Corte dado al injerto previo a rehidratarse	Cuantitativo	Centímetros
Hidratación	Dependiente	Cantidad de colorante que quedará	Cualitativa Paleta de Colores	Bien hidratado o mal hidratado

		adherido al tejido posterior a ser sumergido en solución		
Cantidad de solución	Independiente	Solución en la cual será sumergido el injerto	Cuantitativa	Mililitros
Tiempo de rehidratación	Independiente	Periodo que será sumergido el injerto	Cuantitativo	Minutos
Resistencia a la carga	Dependiente	Magnitud a la cual el injerto no presentará falla	Cuantitativo	Newtons

2.5 Descripción general del estudio

Se contó con injerto óseo liofilizado de un cúbito, de origen humano, el cual previo a su rehidratación se realizaron cortes de 1cm de largo, dando un total de ocho fragmentos, aleatoriamente se distribuyeron en dos grupos uno para hidratación por 10 minutos y otro durante 60 minutos. La rehidratación se realizó con solución fisiológica, se utilizó azul de metileno para darle coloración a la solución, se utilizaron 3ml de azul de metileno por cada 100cc de solución fisiológica. Completado el tiempo de rehidratación se tomó una muestra de cada grupo, se realizó un corte coronal, y bajo un microscopio estereoscópico se observó la rehidratación del hueso esponjoso y cortical de cada grupo y posteriormente se comparó uno junto al otro.

Los tres fragmentos restantes de cada grupo fueron sometidos a una carga axial, para esto se utilizó una máquina de falla universal. Se colocó un aumento a la prensa, se inició la carga hasta que el fragmento quedara sujeto entre el aumento y la prensa, se inició

desde ese punto la contabilización de la fuerza requerida para el fallo. La fuerza iba en aumento lento, hasta escucharse la fractura o presentarse ésta físicamente sobre la cortical del hueso.

Grupo experimental I	Hidratación por 10 minutos	Variables a observar: Saturación de agua teñida Carga a la cual presenta falla
Grupo experimental II	Hidratación por 60 minutos	Variables a observar: Saturación de agua teñida Carga a la cual presenta falla

2.6 Análisis de datos

Todas las variables se depositaron en una hoja de cálculo de Excel donde se establecieron valores de código a las variables cualitativas y se ordenaron los datos. Se obtuvieron las medidas de tendencia central y de dispersión para las variables cuantitativas. Posteriormente, se construyeron tablas de frecuencias y graficas de proporciones y distribución de fuerzas para las variables.

Por lo que respecta a la calidad de la hidratación se contrastó con una paleta de colores para definir que un tono de mayor intensidad indica una mayor hidratación.

CAPÍTULO III. RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

RESULTADOS

Posterior al tiempo de rehidratación se realizaron observaciones en el injerto en la parte esponjosa y cortical. Ambos injertos el hidratado por 10 minutos y el hidratado por 60 minutos se observaban totalmente teñidos, con una tono número 6 en el que se sumergió por 60 minutos y tono número 1 el hidratado por 10 minutos. Se observó una diferencia de 5 tonos contrastada con una paleta de Paleta de colores Pantone Color Chart (<http://www.usagdn.com/blogs/tools-resources/12579457-pantone-color-chart>).



Posterior a ser rehidratados los injertos se sometieron a carga en un aparato de falla universal los resultados se presentan en la siguiente tabla:

	Tiempo de rehidratación en solución fisiológica	
	10 minutos	60 minutos
Muestra 1	220kg	360kg
Muestra 2	200kg	360kg
Muestra 3	300kg	360kg
Promedio	240kg	360kg



Previo a ser sometidas las muestras a carga en la prensa se realizaron pruebas con fragmentos de la cortical observada en el microscopio para determinar la fuerza inicial de manera que se evitara el derrape del injerto al momento de aplicarle la carga, estas medias corticales toleraron 160kg para el hidratado 10 minutos y 240kg para el hidratado por 60 minutos.

La primera muestra hidratada por 10 minutos toleró una carga de 220kg previo a presentar una fractura, la segunda 200kg y la tercera 300kg, como observación esta última muestra presentaba una cortical de mayor grosor a las previas. Se calculó como peso promedio en kilogramos de 240 de tolerancia a la carga.

La primera muestra hidratada por 60 minutos toleró una carga de 360kg, la misma cifra se repitió en la segunda y tercera muestra. Como promedio el resultado es de 360kg.

Se llega a la conclusión que disminuir el tiempo de hidratación a 10 minutos ocasiona una disminución en la tolerancia a una carga axial del 34%.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se demostró de manera objetiva que el injerto óseo liofilizado al estar bien hidratado soporta una mayor carga a compresión. En el segundo parámetro se demostró también de que sumergir el injerto por una hora.

Hay estudios contrastantes respecto a la fuerza del injerto liofilizado al ser rehidratado. Dingee en 2005 sometió injerto óseo liofilizado a fuerzas de tensión y flexión, encontrando un aumento en su tolerancia a estas fuerzas posterior a la rehidratación, en cambio Conrad refiere que el injerto a mayor hidratación presenta una menor tolerancia a estas fuerzas.

En este experimento demostramos que es imprescindible hidratar por 60 minutos el injerto previo a colchase en el paciente para que cumpla su función como osteconductor, de modo que su función de andamiaje se cumpla.

CONCLUSIONES

El tiempo de sumersión del injerto óseo liofilizado corticoesponjoso se ve directamente relacionado a la saturación de este con agua, al aplicar una carga a este injerto el que se encontraba mejor hidratado, o sea sumergido por mas tiempo toleró cargas mayores, por lo que estructuralmente será mejor su función de andamiaje.

LITERATURA CITADA

Andrade MG, Sa CN, Marchionni AM. 2008. Effects of freezing bone histological morphology. *Cell Tissue Bank*. 9(4):279-87.

Aponte-Tinao L, Ritacco L, Farfalli G, Ayerza M, Muscolo D. 2008. Computer-assisted 3D preoperative planning for allograft selection in orthopedic reconstructions. *American Association of Tissue Banks*

Arraiza N, Viguria PM, Navarro J, Ainciburu A. *Manual de Microscopia*.

Auer JA, Fackelman GE. 1999. Bone graft biology and autogenous grafting p.99

Auer JA, von Rechenberg B, Bohner M, Hoffman-Antenbrink M. 2012. Bone Grafts and Bone Replacements. Págs 1081-1094 *Equine Surgery* editorial Elsevier Estados Unidos

Bhatt RA y Rozental TD. 2012. Bone graft substitutes. *Hand Clinics* 28: 457 – 468.

Bassi A, Gough J, Zakikhani M y Downes S 2011 “Bone tissue regeneration” Págs. 93 – 110

Benzel E, Leon SP. 2001. Enhancing cervical spine fusion. Chapter 7. *Congress of Neurological Surgeons*

Bourque WT, Gross M, Hall BK. 1993. Expression of four growth factors during fracture repair. *International Journal of Developmental Biology*. 37: 573 – 579

Burchardt H. 1989. Biology of cortical bone graft incorporation. Editorial Ragazzoni, Berlin Alemania p. 23

- Burchardt H. 1983. "The biology of bone graft repair". *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 174, 28 – 42
- Caldwell PE y Shelton WR. 2005. *Orthopaedic Clinic of North America*. 36 (4):459-67
- Calvo R, Figueroa D, Díaz-Ledezma C, Vaisman A, Figueroa F. 2011. Bone allografts and functions of bone Banks. *Revista Médica de Chile*. 139(5):660 – 6
- Cook y Cook, 2009 "Bone graft substitutes and allografts for reconstruction of the foot and ankle" *Clin. Podiatr Med Surg* ; 26: 589 – 605
- Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP. 1993. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 290:279-84.
- Cornu O, Boquet J, Nonclercq O, Docquier PL, Van Tomme J, Delloye C, Banse X. 2011. Synergetic effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone. *Cell Tissue Bank*. 12(4):281-8.
- Cypher TJ, GrossmanJP. 1996. Biologic principles of bone graft healing. *Journal of Foot and Ankle Surgery* 35: 413 – 7
- Dallari D, Fini M, Stagni C, 2005 "In vivo study of the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cels, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination" *J Orthop Res* 2006;24:877 – 88

- Eagle MJ, Rooney P, Lomas R. 2005. Validation of radiation dose received by frozen unprocessed and processed bone during terminal sterilisation. *Cell Tissue Bank.* 6(3):221-30
- Farr J. 2001. Current concepts: fresh osteochondral shell allografts. *American Association of Tissue Banks*
- Grabowski G, Cornett CA. 2013. Bone graft and bone graft substitutes in spine surgery: current concepts and controversies. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons.* 21(1):51-60.
- Hartigan BJ y Cohen MS. 2005. Use of bone graft substitutes and bioactive materials in treatment of distal radius fractures. 21(3):449-54
- Heppenstal RB. 1983. Bone grafting. En McCollister-Evarts C, editorial *Surgery of Musculoskeletal System*, Nueva York: Churchill-Livingstone. 189.
- Küber N, Jürgen R, Kirchner T, Priessnitz B y Sebald W. 1993. Osteoinductive, morphologic and biomechanical properties of autolyzed antigen-extracted, allogeneic human bone. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 51:1346-1357.
- Laitinen M, Kivikari R, Hirn M. 2006. Lipid oxidation may reduce the quality of a fresh-frozen bone allograft. Is approved temperature too high? *Acta Orthopaedica.* 77(3): 418 – 21.
- Moore Wr, Graves SE, Bain GI. 2001. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ Journal of Surgery.* 71(6): 354 – 61.

- Marino JT y Ziran BH. 2009. Use of solid and cancellous autologous bone graft for fractures and nonunions. *Orthopedic clinic of north america*. 41:15-26
- Millis D, Martinez, SA. 2003. Text book of small animal surgery. Bone Grafts. P 1875
- Mundy GR. 1993. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodelling. *Journal of Bone and Mineral Research*, 8:S505
- Muscolo DL, Ayerza MA, Aponte-Tinao LA. 2000. Long-term results of allografts replacement after total calcanectomy. A report of two cases. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 82(1): 109 – 12.
- Nather A. 2002. Biology and biomechanics healing of deep frozen and freeze-dried cortical bone allografts. American Association of Tissue Banks.
- Raddin EL, Rose LF, Blaha JD. 1992. Practical Biomechanics for the Orthopedic Surgeon. Churchill Livingstone. 227 pp.
- Rigney PR. 2009. Implementation of nucleic acid testing (NAT) 2004.
- Rihn JA y Harner CD. 2003. The use of musculoskeletal allograft tissue in knee surgery. *Arthroscopy*; 19(Suppl 1):51-66
- Scavone LG, Mazzucchelli-Cosmo LA, Macedo NL, Ferreira AS, Sendyk WR. 2011. Fresh-frozen human bone allograft in vertical ridge augmentation: clinical and tomographic evaluation of bone formation and resorption. *Cell Tissue Bank* 13:577-586

- Schenk RK.1987. Mikroskopische Untersuchungen über die Gewebe- und Knochenreaktion: Proc Ceros Symp Bettlach, R. Mathys, 1:2
- Shibuya N y Jupiter D. 2015. Bone graft substitute allograft and xenograft. Clin Podiatr Med Surg, 32: 21 – 34
- Simpson D, Kakarala G, Hampson K, Steele N, Ashton B. 2007. Viable cells survive in fresh frozen human bone allografts. Acta Orthopaedica, 78(1):26-30
- Simpson DKG, Hampson K, Steele N, Ashton B. 2007. Viable cells survive in fresh frozen human bone allografts. Acta Orthopaedica, 78(1):26-30
- Urist MR. 1989. Introduction to update on allograft surgery
- Urist MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. Science. 150:893-9
- Ward WG, Gautreaux MD, Lippert DC 2008, Boles C. 2008. HLA sensitization and allograft bone graft incorporation. Clinical Orthopaedics and Related Research. 466:1837 – 48