

11674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LA REPARACIÓN ÓSEA EN TIBIAS
DE PERRO (*Canis familiaris*) CON OSTEOTOMIA

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MIGUEL ANGEL SERVIN TRUJILLO

TUTOR

DRA. MARIA DE LOURDES RODRÍGUEZ FRAGOSO

COMITÉ TUTORAL

DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS

DR. JORGE A. REYES ESPARZA



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.

DEDICO ESTE TRABAJO A:

MIS PADRES:

Por haberme dado los valores y las palabras necesarias para poder alcanzar siempre las metas que me he propuesto. Sus consejos siempre me acompañan ¡Vamos por más!

MIS HERMANOS

A fin de cuentas siempre juntos y apoyándonos, así nos enseñaron y así será. Gracias por estar conmigo en todo momento.

AZUCENA

Porque siempre me has dado el apoyo necesario para no caer y seguir adelante, pero sobre todo por haberme dado a los mejores hijos GRACIAS.

ALEX Y CRIS

Simplemente son lo máximo y pensar en ustedes siempre es motivo de querer ser mejor, hijos gracias por apoyarme siempre y darme los “besitos de juerzas” que tanta falta me hacen.

EQUIPO DE TRABAJO CRISTAL

Azu, Martha, Fer, Julito, Lupita, Vianney, Lino, David, Ayali, Esme, Iseliux y Eduardo Su ayuda siempre ha sido muy importante.

DRA. GARRIDO

Por tu apoyo incondicional en todo momento.

A MIS AMIGOS

Siempre pensé que tenía pocos pero hoy que quiero escribir su nombre me doy cuenta que estoy equivocado. Gracias por escucharme y ayudarme cuando es necesario.

A MIS AMIGOS ESPECIALES (Sr. Javier Espinosa, CP Carlos González)

No es hacer menos a nadie, simplemente los sabios consejos que me han dado y la experiencia que me han transmitido los hace ser así para mí.

AGRADEZCO A:

MI TUTORA

Dra. M^a Lourdes Rodríguez Fragoso

Porque gracias a su ayuda y consejo ahora estoy convencido que este trabajo es solo el principio.

MI COMITÉ TUTORAL

Dr. Jorge A. Reyes Esparza

Dr. Andrés Romero Rojas

Porque no solo me han sabido dar su consejo y apoyo, también su amistad.

ACADÉMICOS Y COLABORADORES

QFB Celedonio Gomez Ruiz

MVZ German I. Garrido Fariña

Por su importante colaboración en la realización de este trabajo, espero que sea el primero de una gran lista.

MC. Enrique Flores Gasca

Porque de una u otra manera gracias a usted comencé por este camino.

CONACYT

Por el otorgamiento de la beca que hizo posible realizar este trabajo.

AL Dr. Jose Luis Valenzuela (Gerente de la marca Hill's) Al Lic Jose Manuel Soldevila (Gerente de ventas de Manufacturas Solco)

Por las importantes donaciones que hicieron para la realización de este trabajo.

LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

INDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Histología.....	1
1.2. Propiedades mecánicas del hueso y fracturas.....	3
1.3 Estabilización de las fracturas.....	6
1.4 Reparación de las fracturas.....	8
1.5. Factores que modifican el mecanismo de reparación	15
1.6 Estrategias usadas con el fin de optimizar la reparación ósea.....	13
1.7 Participación de los Factores Celulares Solubles en los procesos de reparación.....	15
1.7.1. TGF Beta-1 y los procesos de reparación ósea.....	17
1.8. Matriz extracelular y metaloproteasas.....	19
1.8.1. Participación del uPA en los procesos de reparación.....	20
2. Justificación.....	22
3. Hipótesis.....	23
4. Objetivos.....	23
4.1. Objetivo general.....	23
4.2. Objetivos particulares.....	23
5. Material y método.....	24

5.1. Animales de experimentación.....	24
5.2. Formación de los grupos.....	25
5.3. Tratamiento de los grupos.....	25
5.3.1 Inducción de la reparación ósea posterior a osteotomía.....	25
5.3.2 Tratamiento de la osteotomía con injerto de hueso desmineralizado.....	25
5.3.3. Tratamiento de la osteotomía con Injerto + TGF β -1.....	28
5.4. Cuidados posquirúrgicos.....	29
5.5. Evaluación radiográfica.....	29
5.6. Evaluación clínica.....	30
5.7. Examen histológico.....	32
5.8. Evaluación inmunohistoquímica de uPA.....	33
5.9 Análisis estadístico.....	33
6.0 Resultados.....	34
6.1 Desarrollo de la técnica de osteotomía y proceso de reparación.....	34
6.2 Efecto del TGF β -1 sobre el proceso de reparación.....	35
6.3. Efecto del TGF β -1 sobre la evolución clínica.....	38
6.4. Análisis histológico del efecto del TGF β -1 sobre la reparación de la osteotomía.....	43

6.4.1 Efecto del TGF β -1 sobre la diferenciación histológica y la reparación ósea.....	43
6.4.2 Efecto del TGF β -1 sobre la cantidad de matriz extracelular en la reparación ósea.....	43
6.4.3 Efecto del TGF β -1 sobre la expresión inmunohistoquímica de la urocinasa.....	44
7. Discusión.....	46
8. Conclusiones.....	55
9. Expectativas.....	56
10. Bibliografía.....	57

FIGURAS

FIGURA 1. CONSTITUCIÓN DEL COMPONENTE ORGÁNICO DEL HUESO.....	1
FIGURA 2. CURVA FUERZA-DEFORMACIÓN.....	4
FIGURA 3. FUERZAS BÁSICAS QUE ACTÚAN SOBRE EL HUESO.....	5
FIGURA 4. PROCESO DE RESPUESTA HACIA LAS FRACTURAS.....	11
FIGURA 5. VÍAS HACIA EL PROCESO DE MODELACIÓN REMODELACIÓN.....	14
FIGURA 6. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF- β 1.....	19
FIGURA 7. ACTIVACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS MEDIADAS POR EL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO TIPO UROCINASA.....	20
FIGURA 8. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO DE LA OSTEOTOMÍA.....	26
FIGURA 9. CARACTERÍSTICAS Y COLOCACIÓN DEL INJERTO.....	28
FIGURA 10. OSTEOTOMIA Y PROCESO DE REPARACIÓN.....	34
FIGURA 11. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LA REPARACIÓN PERIÓSTICA.....	35
FIGURA 12. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LA REPARACIÓN DEL ESPACIO INTERFRAGMENTARIO.....	36
FIGURA13.EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE EL PROCESO DE REPARACIÓN(RX).....	37
FIGURA14.EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE EL GRADO DE CLAUDICACIÓN.....	39
FIGURA15. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LA TEMPERATURA CORPORAL.....	39

FIGURA 16. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE EL NÚMERO DE LEUCOCITOS.....	40
FIGURA17. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE EL NÚMERO DE ERITROCITOS.....	41
FIGURA18.EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LOS NIVELES DE HEMATOCRITO.....	41
FIGURA 19. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA.....	42
FIGURA 20. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA REPARACIÓ ÓSEA.....	44
FIGURA 21. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA PRESENCIA DE MATRIZ EXTRACELULAR EN LA REPARACIÓ ÓSEA.	45
FIGURA 22. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE UROCINASA.....	45
FIGURA23. PROCESOS DE REGENERACIÓN, REMODELACIÓN Y REPARACIÓN.....	47

TABLAS

TABLA I. IMPLANTES Y CAPACIDAD DE NEUTRALIZAR FUERZAS.....	7
TABLA II. CARACTERÍSTICAS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO.....	16
TABLA III VIDA MEDIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO.....	17
TABLA IV. VALORES ARBITRARIOS DE LA EVALUACIÓN RADIOGRÁFICA.....	30
TABLA V. VALORES ARBITRARIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CLAUDICACIÓN.....	32

RESUMEN

El factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF β -1), ha demostrado ser un importante regulador del continuo proceso de remodelación ósea. Se conoce además que tiene un efecto importante sobre los procesos de reparación ósea. El objetivo de nuestro trabajo fue; estudiar el efecto del uso de un injerto con TGF β -1 sobre la reparación ósea en la osteotomía inducida en la tibia de perro. Para conseguir nuestro objetivo, contamos con tres grupos de 4 perros cada uno, al grupo control solo se le hizo la osteotomía, al grupo injertado, se le aplicó un injerto de matriz ósea desmineralizada y a un tercer grupo se le aplicó un injerto de matriz ósea desmineralizada tratado con TGF β -1 (5ng/ml), con lo cual se consiguió la liberación del factor en el sitio de lesión.

Para poder estudiar el efecto del TGF β -1 sobre la reparación, evaluamos, mediante estudios radiográficos semanales, la respuesta del periostio y la presencia de material radiopaco en el espacio interfragmentario, con estas evaluaciones pudimos observar que el TGF β -1, adelantó una semana el proceso de reparación de la fractura y al término de las cinco semanas, este grupo demostró un avanzado estado de reparación, manifestándose con un cierre casi total del espacio interfragmentario. El estado clínico de los perros y la presencia de efectos sistémicos debidos a la aplicación local del TGF β -1, se evaluaron por medio del grado de claudicación, la medición de la temperatura, el hematocrito, el número de eritrocitos, el leucograma y la fosfatasa alcalina sérica (FAS). En estas evaluaciones no existió ninguna diferencia significativa que pudiera indicarnos la presencia de signología sistémica, los valores siempre se mantuvieron dentro de los rangos de referencia para la especie, edad y sexo de los sujetos de estudio. Las observaciones histológicas nos permitieron explicar el estado de la reparación ósea a la quinta semana, donde pudimos observar que el grupo tratado con TGF β -1 presentó una baja cantidad de cartílago hialino, una mayor cantidad de hueso trabecular y una menor cantidad de matriz extracelular. Con las pruebas de inmunohistoquímica, pudimos apreciar que a las cinco semanas el grupo que presentó una mayor cantidad de reacciones positivas fue el grupo al cual se le aplicó el injerto, mientras que en los grupos tratados con injerto y con injerto + TGF β -1, esta respuesta fue prácticamente nula.

Nuestros resultados demostraron que el TGF β -1, adelantó una semana el inicio de la respuesta de reparación, al hacer la evaluación del proceso de reparación en la quinta semana, observamos que: redujo la presencia de cartílago hialino, aumento la presencia de hueso trabecular, disminuyó de manera importante la cantidad de matriz ósea de nueva formación en el espacio interfragmentario y no presentó alteraciones en la claudicación, el número de eritrocitos, el leucograma y la FAS que evidenciaran respuestas adversas a la aplicación del TGF β -1. Por lo tanto pudimos concluir: que el TGF β -1 aceleró el proceso de reparación ósea y que su aplicación local no produjo efectos sistémicos.

Palabras clave: Factor de crecimiento transformante Beta 1 (TGF β -1), Regeneración ósea, injertos oseos.

ABSTRACT

The Transforming Growth Factor Beta -1 (TGF β -1) has proved to be an important regulator of the continuous process of osseous remodeling. It is known that it has an important effect on the process of osseous repairing. The objective of our work was to study the effect of a graft with TGF β -1 on the osseous repairing on the osteotomy induced in the dog. To reach our objective, we included three groups of 4 dogs: (a) the control group (osteotomy), (b) the grafted group (grafts of osseous matrix demineralized) and (c) TGF- β 1 (graft osseous matrix demineralized treated with TGF β -1)

In order to study the effect of TGF β -1 on the repairing, we evaluated through radiographic studies, the answer of the periosteum, the presence of material radiopaque in the interfragmentary space, and we also made an histological analysis in order to evaluate the different treatments on osseous repairing. To evaluate the proteolytic activity we made an the immunohistochemistry stain in order to evaluate the expression of urokinase. The clinical condition of the dogs and the presence of the systemic effects due to local application of the TGF β -1, they were evaluated by the grade of limping, the corporal temperature, the percent of hematocrit, eritrocytes count, leucocyte count and the Alkaline Phosphatase (ALP). We observed that TGF β -1, accelerated the process of repairing in the site of fracture by throughout the five weeks, at the end of the time, this group showed an advanced grade in the repairing process; it was observed an almost complete closing in the interfragmentary space. There was no found during the evaluation, the limping and there was not significant differences between the hematics valuations. These findings confirmed the absence of systemic sign, the values always kept within the range of the reference according with the species, age, and sex of the subjects in the study. The histological findings showed the state of the osseous repairing to the fifth week, we observed that the group treated with TGF β -1 presented a low amount of hyaline cartilage, a major amount of trabecular bone and a fewer amount of extra cellular matrix. In the immunohistochemical analysis we could appreciate that at the end of five weeks, the graft group showed a major number of positive cells, whereas in the control and TGF- β 1 the response was absent.

Our results showed that TGF β -1 modify the repairing process, shorting the time of bone repairation, we observed that TGF β -1 reduced the presence of hyaline cartilage, it increased the presence of trabecular bone, it decreased in an important way the amount of osseous matrix of the new formation in the interfragmentary space. TGF- β 1 does not produce changes in the limping, eritrocyte count, leucogram and in the ALP, besides there was not evidence of side effects as a consequence of TGF β -1 systemic use. In conclusion, TGF β -1 is able to modify the osseous repairing process and that its local application did not produce systemic effects.

Key words: Transforming Growth Factor beta 1(TGF β -1), osseous repairing, bone graft.

1 INTRODUCCIÓN

1.1. Histología

El tejido óseo desempeña diversas funciones. Sirve como estructura corporal, se articula por medio de tendones y ligamentos para poder dar dinámica al cuerpo, protege órganos importantes para el mantenimiento de la vida y almacena minerales que van a ayudar a mantener la homeostasis cuando sea necesario [1] El hueso es un tejido que se encuentra en un constante proceso de formación y absorción, esta formado en un 30% por una fracción orgánica, la cual esta constituida por células y matriz extracelular y por una fracción mineral que constituye el 70% restante [2]. La matriz extracelular de tipo orgánico esta conformada por un 95 % de colágeno tipo 1 y por un 5% de una mezcla de proteoglicanos tales como el condroitin sulfato y pequeñas cantidades de hialuronato, además de varias moléculas pequeñas relacionadas con el mecanismo de calcificación, por ejemplo la osteocalcina o BGP (Bone Gla Protein por sus siglas en inglés) que es la proteína mas importante del tipo no colagénico en el tejido óseo maduro, la osteonectina es una glucoproteina adhesiva del mismo tipo que la fibronectina y la condronectina. Existe además otra molécula que también es secretada por los osteoblastos, la osteopontina que posee propiedades similares a la fibronectina [3] (ver figura 1).

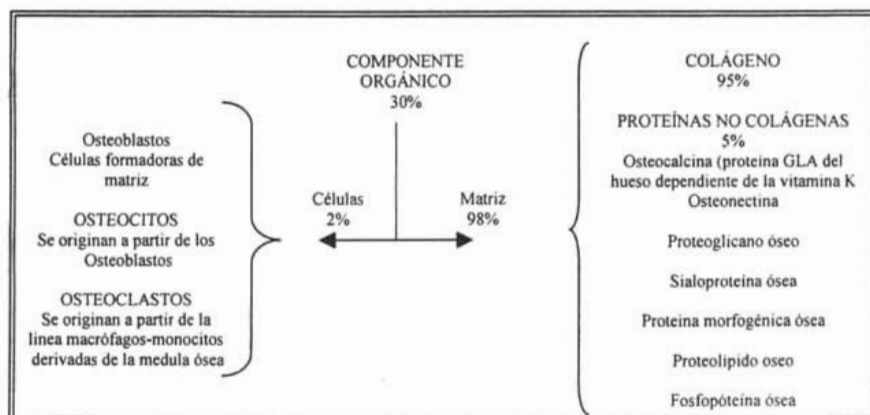


FIGURA 1. CONSTITUCIÓN DEL COMPONENTE ORGÁNICO DEL HUESO.

Las células que conforman la porción orgánica del hueso son; las células **osteoprogenitoras**, los **osteoblastos**, los **osteocitos** y los **osteoclastos**, los cuales se encuentran en un constante equilibrio cuando el individuo se encuentra saludable [4]. Las células osteoprogenitoras, son células madre (precursoras) mesenquimatosas pluripotenciales, situadas cerca de todas las superficies óseas; bajo la acción de estímulos adecuados son capaces de dividirse y formar una descendencia que al diferenciarse da lugar a los osteoblastos. La formación de los osteoblastos a partir de las células osteoprogenitoras es esencial para el crecimiento, la remodelación y la reparación óseas. Los osteoblastos se encuentran en la superficie del hueso y sintetizan, transportan y organizan muchas proteínas de la matriz. Ponen en marcha el proceso de la mineralización. Poseen receptores en su superficie, con los que captan muchas hormonas (hormona paratiroidea, vitamina D y estrógenos), citocinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular. Los osteoblastos rodeados de la matriz son conocidos como osteocitos [5].

Los osteocitos son las células osteoformadoras mas numerosas; están empotrados en la masa ósea, pero se comunican entre si y con las células de la superficie ósea a través de una intrincada red de túneles labrados en la matriz conocidos como canalículos. Las prolongaciones de los osteocitos que atraviesan esos canalículos y sus contactos mediante uniones de hendidura las permiten trasladar los sustratos y los potenciales de membrana celular. Sus abundantes prolongaciones y su abundante distribución por todo el tejido óseo convierten al osteocito en la célula principal de algunos procesos biológicos. Hay estudios que demuestran la importancia que puede tener esa red para regular, segundo a segundo, las fluctuaciones de los niveles séricos de calcio y fósforo mediante la modificación de la concentración de esos minerales en el compartimiento líquido extracelular. Además, los osteocitos son capaces de detectar las fuerzas mecánicas e incorporarlas a la actividad biológica incluida en la liberación de mediadores químicos por las vías de señales con la intervención del monofosfato de adenocina cíclico (AMP_c).

El osteoclasto es la célula encargada de la reabsorción ósea y procede de las células progenitoras hematopoyéticas que producen también los monocitos y los macrófagos.

Para que los osteoclastos se diferencien y maduren son esenciales algunas citocinas, IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor estimulante de las colonias de los granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) El osteoclasto maduro multinucleado se forma por fusión de unos precursores mononucleares circulantes y esta íntimamente unido a la superficie del hueso. Cuando los osteoclastos comienzan a funcionar, se unen a proteínas de adhesión de la matriz y labran en el hueso las lagunas de resorción de forma festoneada (lagunas de Howship) La parte del osteoclasto situada sobre la superficie de resorción contiene numerosas expansiones vellosas, conocidas como borde rizado, que sirve para aumentar la superficie de la membrana. El plasmalema que bordea esta región, esta especializado y cierra herméticamente el hueso para impedir que se escapen los productos de digestión ósea. Este espacio extracelular autónomo es análogo a un lisosoma secundario y el osteoclasto lo acidifica mediante una bomba de hidrógeno que solubiliza el mineral. El osteoclasto vierte también en este espacio muchas enzimas que sirven para descomponer las proteínas de la matriz en aminoácidos con esto liberar y activar diversos factores de crecimiento y enzimas que los osteoblastos ya habían depositado anteriormente y que estaban unidas a la matriz. De esta manera cuando el hueso se descompone en sus unidades elementales, se liberan las sustancias que inician su renovación [6].

1.2. Propiedades mecánicas del hueso y Fracturas

El hueso es un tejido que tiene la facultad de poder comprimirse, doblarse, elongarse o torcerse, sin embargo, cuando al hueso se le aplica una fuerza o una carga que exceda los límites de resistencia, se producirá una fractura. Existen 4 comportamientos básicos del hueso ante la aplicación de cargas; la **deformación elástica** se va a presentar cuando al aplicar una fuerza, el objeto sufre una deformación, pero recupera su forma original si esta cede; el **límite elástico aparente** se presenta cuando la fuerza que se ejerce es tal que al retirarla, el objeto no recobra sus dimensiones originales. La **deformación plástica** se va a dar cuando la aplicación de la fuerza es continua y el tejido sufre una deformación permanente y progresiva. Finalmente se menciona al **Punto de ruptura**, este se presenta si la fuerza aplicada sobrepasa el límite elástico aparente [7]. Cuando se alcanza este

punto, se produce una fractura, la cual se define como la pérdida de continuidad del tejido óseo ocasionada por un exceso de las fuerzas que sobre el se ejercen.

La biomecánica es simplemente la aplicación de los principios de ingeniería mecánica en sistemas biológicos, con el fin de conocer: 1) las características de un material vivo, tal como el hueso, 2) el impacto intrínseco y extrínseco de fuerzas fisiológicas y no fisiológicas sobre un sistema biológico y 3) la influencia de la tecnología moderna sobre los sistemas biológicos.(ver figura 2).

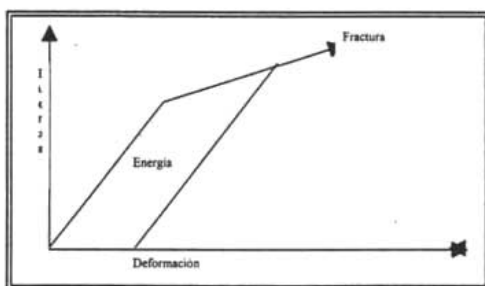


FIGURA 2. CURVA FUERZA-DEFORMACIÓN.

El entendimiento de las características mecánicas y estructurales del hueso normal, permite conocer como actúan las fuerzas ejercidas sobre el hueso, creando patrones predecibles de fracturas y cuales fracturas tienen predisposición anatómica. Conocer las fuerzas que causan las fracturas, permite a su vez conocer el tipo de principio mecánico adecuado para estabilizar la fractura durante el proceso de reparación permitiendo tomar la decisión adecuada cuando elegimos el tipo de implante que se debe usar para su estabilización [8]

La localización de la fractura en el hueso (diafisis, metáfisis o epífisis) y el patrón de la fractura (espiral, transversa, oblicua o conminuta) esta determinado por diversos factores. El tipo específico de carga (compresión, flexión, torción o tensión) a la que el hueso esta sujeto crea patrones de fractura característicos. Además las características del tipo de tejido óseo también influyen en el patrón de fractura que se presenta. Las características mecánicas del tejido óseo dependen de factores tales como 1) el tipo de

hueso (cortical o canceloso), 2) la densidad o porosidad aparente del hueso, 3) la velocidad con la que el hueso recibe la carga (rápido o lento), 4) la orientación de la micro estructura ósea en relación con la dirección de la carga 5) la edad del paciente y 6) el estado general de salud que presenta el paciente. Además del tamaño, la forma y la presencia de deformaciones naturales o patológicas que pudieran influenciar en la respuesta biomecánica [9].

Los patrones de fractura en el hueso usualmente son característicos de cargas simples o combinadas El cirujano generalmente puede especular sobre cual fue la fuerza o combinación de fuerzas predominantes que ocasionaron la fractura por medio de una placa radiográfica, además las radiografías permiten conocer la magnitud de la carga que fue aplicada sobre el hueso. Las fracturas generalmente resultan de fuerzas de gran magnitud aplicadas en forma rápida resultando en diversos patrones de fractura con múltiples fisuras y diversos daños a los tejidos adyacentes. Los tipos de fuerzas básicas que se puede ver actúan sobre el hueso son: tensión, compresión, flexión, rotación, deslizamiento angular y deslizamiento horizontal, además de las fuerzas mixtas [10] (Ver figura 3) .

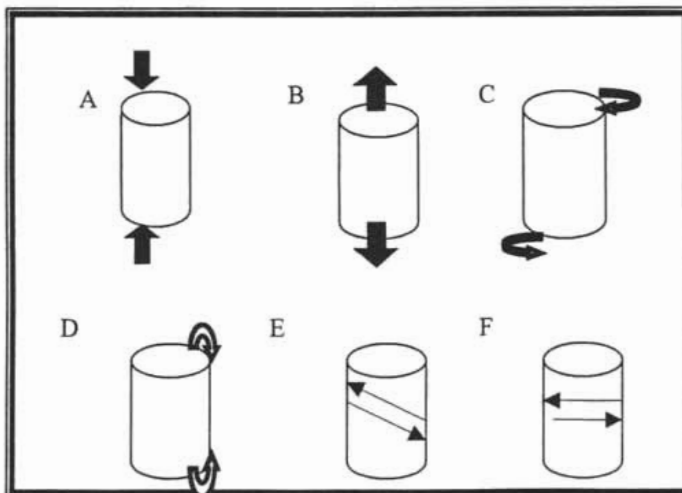


FIGURA 3. FUERZAS BÁSICAS QUE ACTÚAN SOBRE EL HUESO. A) Compresión, B) Tensión, C) Torsión, D) Flexión, E) Deslizamiento angular, y F) Deslizamiento horizontal.

1.3 Estabilización de las fracturas.

Para favorecer la reparación de un hueso después de la fractura existen diversos métodos de estabilización, entre los más utilizados podemos mencionar el uso de fijadores externos, tornillos, clavos intramedulares, placas de compresión interfragmentaria y cerclajes de alambre, todos los métodos descritos persiguen una meta, conseguir una estabilidad biomecánica que conduzca a una reparación ósea adecuada [11]. Una técnica de fijación adecuada debe neutralizar tanto de manera intrínseca como extrínseca la generación de las fuerzas existentes, lo que causará en consecuencia una buena reparación (ver tabla I). Una ineficiente elección de la técnica de neutralización dará como consecuencia la presencia de procesos de no unión, unión retardada, mala unión u osteomielitis, resultando en un incremento en la morbilidad de los pacientes, haciendo necesarias nuevas intervenciones aumentando los problemas del paciente y los costos para el propietario. Otros aspectos biomecánicos que deben ser considerados son: la localización de la fractura, el hueso involucrado, la edad del paciente, antecedentes de daño ortopédico, daño a tejidos periféricos, estado general de salud, temperamento del paciente, cuidados que tendrá el dueño de nuestro paciente, disponibilidad del equipo ortopédico adecuado, costo y experiencia del cirujano [12].

Tenemos entonces que la capacidad de un clavo intramedular único para contrarrestar las fuerzas de deslizamiento horizontales en una fractura transversa o la fuerza de deslizamiento angular en una fractura oblicua, depende del tamaño del clavo en relación a la cavidad medular. Si el clavo es de menor tamaño que la cavidad medular puede aparecer deslizamiento, resultando en un movimiento horizontal o en otros cambios de posición de los segmentos de la fractura. Si el diámetro del clavo es igual al de la cavidad medular, las fuerzas de deslizamiento se contrarrestan en forma eficaz. Sin embargo, dado que la mayor parte de los huesos no son cilindros perfectos, raramente el clavo llena la cavidad medular de ambos segmentos de la fractura. En consecuencia, se requiere fijación suplementaria o un medio alternativo de fijación para neutralizar las fuerzas de deslizamiento. La capacidad de un clavo intramedular para resistir las fuerzas

de flexión es directamente proporcional a su diámetro, así como la relación del diámetro del clavo al diámetro medular. Conforme el diámetro medular aumenta de tamaño, es difícil contrarrestar las fuerzas de flexión únicamente con un clavo intramedular. En este caso puede ser necesario añadir fijación suplementaria con un aparato de Kirschner para resistir la fuerza de flexión y / o la rotación. A excepción de las fracturas con dos fragmentos, los clavos intramedulares no mantienen la aposición de los fragmentos [13].

TABLA I IMPLANTES Y CAPACIDAD DE NEUTRALIZAR FUERZAS

IMPLANTE Vs FUERZA	FUERZA DE ROTACIÓN	FUERZA DE FLEXIÓN	FUERZA DE DESLIZAMIENTO	OPOSICIÓN DE FRAGMENTOS
CLAVO INTRAMEDULAR SIMPLE	NO	SI	NO	NO
CLAVO INTRAMEDULAR MULTIPLE	SI	SI	NO	NO
PLACA DE COMPRESIÓN DINÁMICA	SI	SI	SI	SI
FIJADOR ESQUELÉTICO	SI	SI	SI	SI
CERCAJES CON ALAMBRE DE ACERO	SI	NO	NO	SI
TORNILLO DE COMPRESIÓN	SI	NO	NO	NO

Otra opción es el uso de placas de osteosíntesis de acero inoxidable, las cuales si se aplican correctamente proporcionan la forma más estable de fijación de las fracturas. Son eficaces para neutralizar las fuerzas de rotación, deslizamiento y flexión, además de mantener la aposición de fragmentos. Las placas de osteosíntesis también aumentan la estabilidad del sitio de reparación de la fractura mediante una carga axial activa o

compresión de los fragmentos óseos. Al igual que otros dispositivos el éxito depende de la selección y la aplicación correcta de la placa y de la elección del tamaño adecuado [14]

Los tornillos y los cerclajes con alambre no son eficaces para neutralizar las principales fuerzas existentes en las fracturas, su función generalmente es mantener la aposición de los fragmentos para facilitar la aplicación del implante primario. Estas formas de aplicación auxiliar suelen usarse en fracturas oblicuas o para mantener la reducción de fragmentos. Estos dispositivos deben protegerse contra las fuerzas de deslizamiento por el implante primario, añadiendo un segundo dispositivo de fijación como un aparato de Kirschner. Si esto no es posible, deben utilizarse múltiples cerclajes con alambre de tamaño y resistencia suficientes para minimizar la posibilidad de ruptura. Los tornillos de cortical son especialmente propensos a fracasar donde hay fuerzas de deslizamiento y deben protegerse siempre [12]

El fijador de Kirschner puede ser usado como método de fijación primaria o secundaria, en cualquier caso este aparato es muy eficaz para neutralizar las fuerzas básicas presentes en las fracturas. Aplicado al lado de tensión del hueso, un fijador de Kirschner ayuda a contrarrestar las fuerzas de flexión y es eficaz como dispositivo antirrotacional. Además se puede aplicar a una fractura oblicua o conminuta como fijación secundaria [15]

1.4 Reparación de las fracturas

Comúnmente se utiliza el término cicatrización para identificar el proceso de unión de las fracturas, osteotomías, artrodesis y colocación de injertos; sin embargo, el término reparación debe ser mejor empleado pues el sitio de lesión se repara con un tejido idéntico al que existía originalmente.

Inmediatamente después de ser liberadas las fuerzas que están siendo aplicadas al hueso se presenta la fractura y comienza a presentarse la reparación del tejido. En el hueso se presentan dos tipos de eventos de reparación de las fracturas. La **reparación**

ósea primaria y la **reparación ósea secundaria**. En ambos casos se utiliza el término **reparación** debido a que el tejido que llenara el espacio que resulta de la fractura es igual al de origen [16].

La **reparación primaria** se da únicamente con la fijación interna rígida (aplicación correcta de placas de compresión dinámica) y resulta en la unión ósea por el crecimiento directo de los sistemas de Havers a través de las fracturas. Existe un callo interno mínimo o nulo. La lesión del suministro sanguíneo a las osteonas existentes cerca del sitio de fractura, estimula una intensa actividad en los sistemas haversianos del área. Los osteoblastos forman puntas de lanza en los extremos de los canales haversianos cerca del área de fractura y aumentan de tamaño como preparación a la formación de un nuevo sistema. Las puntas de lanza osteoblásticas (conos cortantes) avanzan seguidamente a una velocidad de 50 a 80 micras por día produciendo canales haversianos aumentados de tamaño que cruzan desde un fragmento al contrario. La reparación se produce cuando se desarrollan nuevas osteonas que cruzan el área de fractura para sustituir las antiguas que fueron privadas de su suministro sanguíneo local. Si existe un espacio entre los fragmentos de fractura o si la inmovilización no es rígida esta reparación no se produce [17].

La **reparación secundaria** es el tipo de reparación que normalmente se presenta cuando la fijación no es rígida o no existe una excelente aposición entre los fragmentos. Sin embargo, es el más común debido a la naturaleza de las lesiones. Durante la reparación secundaria se presentan tres estadios, los cuales pueden ser englobados en tres procesos descritos de manera independiente aunque realmente se sobreponen, estos procesos son: la fase **inflamatoria**, la fase de **reparación** y la fase de **remodelación** [18]. (ver figura 4)

a) La **fase inflamatoria** comienza inmediatamente después de la fractura y permanece durante dos o tres semanas apareciendo primero por el daño a los tejidos blandos que rodean el sitio de fractura [12]. En el hueso comienza a aparecer la muerte de los osteocitos hacia las puntas de los fragmentos, debido a esto comienza la liberación

de enzimas lisosomales lo cual dispara la destrucción de la matriz orgánica, ambos procesos darán paso a un severo proceso inflamatorio. La respuesta de fase aguda de la inflamación se da cuando las proteínas de fase aguda se encuentran en abundancia en el sitio de inflamación. Las interleucinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6) van a activar una cascada de enzimas proteolíticas resultando en coagulación y mayor inflamación. Las plaquetas liberan factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta TGF β -1 y factor de crecimiento epidérmico (EGF), todas ellas importantes durante el modelo de reparación. La formación del hematoma provee la primera fuente de células para la zona de lesión, entre ellas encontramos a los granulocitos, macrófagos, linfocitos y mastocitos [19].

b) **Fase de reparación**, en esta fase, el hematoma comienza a organizarse por la deposición de fibrina y plaquetas. Las células osteoprogenitoras comienzan a migrar al sitio de fractura a partir del endostio, cavidad medular y periostio. El endotelio puede servir como fuente de células osteoprogenitoras y pueden contener factores de crecimiento que estimulen el crecimiento celular. Junto con los fibroblastos, macrófagos y capilares, las células pluripotenciales también forman el callo óseo perióstico externo. La diferenciación del callo perióstico pasa por una rápida proliferación y transformación condrogénica probablemente formada a partir de células del hematoma y luego se diferencia en condroblastos, fibroblastos y osteoblastos. Estos cambios parece ser que se favorecen por la tensión de oxígeno. Comienza el depósito de colágeno y la aparición de hidroxiapatita en la matriz, con lo cual se estabiliza el espacio entre los fragmentos. Dicha estabilidad favorece el reestablecimiento del flujo sanguíneo en este espacio y se suplente el cartílago formando un callo fibrocartilaginoso. Este cartilago se sustituye por tejido óseo en un proceso similar al de osificación endocondral. Sin embargo el hueso aun no tiene su forma definitiva. [20]

c) **El proceso de remodelación** comienza cuando la fractura es rellenada por el callo, el cartílago se diferencia en hueso inmaduro, el cual se modifica en hueso laminar con una organización en sistemas haversianos. En esta etapa, los osteoclastos comienzan su actividad y los osteoblastos forman láminas óseas alrededor de los canales

capilares centrales. El proceso de lograr la forma original del hueso es lento y guiado por estímulos piezoeléctricos [21].

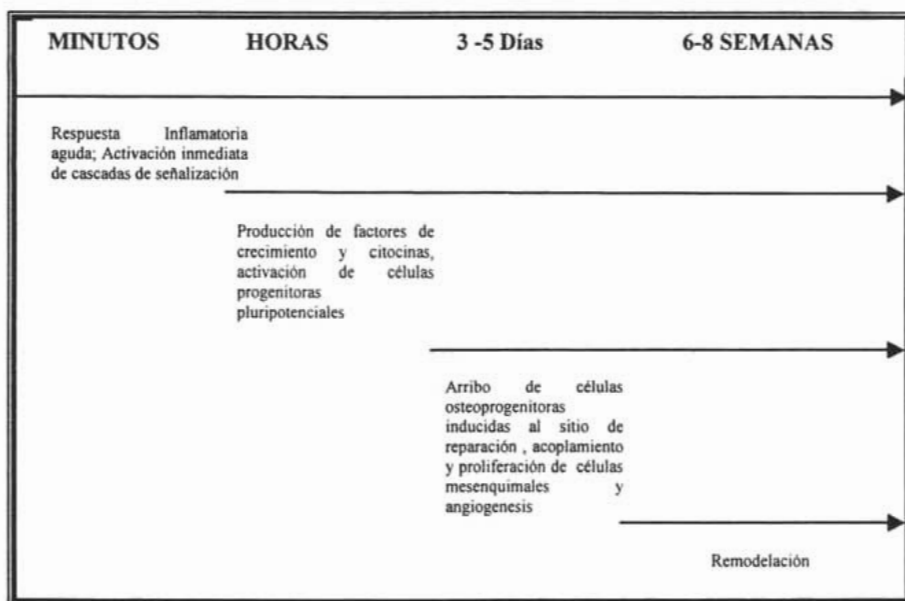


FIGURA 4. PROCESO DE RESPUESTA HACIA LAS FRACTURAS. Algunas respuestas se activan en minutos (respuesta inflamatoria), horas (activación de los factores de crecimiento), días (angiogénesis) semanas (remodelación).

1.5. Factores que modifican el mecanismo de reparación

El tratamiento de las fracturas puede ser con reducción abierta y fijación interna o de tipo conservador con reducción cerrada e inmovilización; sin embargo, este último tratamiento no siempre tiene una buena evolución, llegando a presentarse algunas complicaciones de las cuales las más graves son: la no-uni3n y el retardo de la consolidaci3n.

La reparaci3n retardada de las fracturas es un problema sumamente com3n, y de entre las causas m3s importantes encontramos la presencia de movimiento entre los fragmentos. Los movimientos de la fractura generalmente van a comprometer el

suministro adecuado de sangre, con ello vendrá una isquemia y una hipoxia de la zona de fractura, esto va a ocasionar una menor diferenciación celular, se formara un gran callo y se va a formar una gran cantidad de cartílago. La mala alineación de los fragmentos también requiere una excesiva formación de callo lo cual retardará la reparación y remodelación de la fractura. La separación de los fragmentos puede interferir con la actividad de las células osteogénicas lo cual resulta en la invasión de fibroblastos los cuales carecen de potencial osteogénico. Excesivos espacios entre los fragmentos pueden resultar en una unión fibrosa no funcional. Existe además la posibilidad de que tejidos no osteogénicos tales como grasa, músculo y tejido conectivo ocupen el espacio existente entre los fragmentos del hueso fracturado ocasionando con ello un retraso en la reparación o la no unión. Considerándose como no-unión en donde la fractura no ha consolidado y existen cambios radiológicos que indican que esta situación se continuará a menos que se produzca una modificación en la línea de tratamiento, los extremos pueden presentar esclerosis y estar ensanchados, la línea de fractura se ve claramente. La contaminación bacterial y la inflamación excesiva pueden interferir con la reparación de la fractura y derivar en un verdadero proceso de no unión. En todos los casos, el factor mas involucrado es la falta de irrigación y la principal consecuencia es la no unión. [22]

La no unión atrófica resulta de un excesivo espacio entre las puntas de los fragmentos o de la falta de aporte sanguíneo a la zona de lesión, esto da como resultado la interposición de otro tipo de tejido tal como el cartílago o tejido fibroso que puede físicamente inhibir el desarrollo de un callo funcional. Las no uniones infectadas pueden ocurrir cuando el aporte sanguíneo es reducido o deficiente o cuando el sitio de fractura sufre una contaminación. Esto ocurre generalmente en casos de fracturas conminutas, donde el daño a los tejidos adyacentes es mucho mayor y esto implica un mayor compromiso vascular de los tejidos blandos. Las diáfisis tienen más riesgos de infectarse que las metáfisis o epífisis. La osteomielitis no siempre resulta en procesos de no unión, ya que puede ocurrir una buena reparación en presencia de osteomielitis. La mejor oportunidad clínica para tratar las osteomielitis es la aparición de los signos radiográficos y esto de acuerdo al proceso de reparación comenzará alrededor de los 7 a 10 días [13].

Así como existen factores que retrasan la reparación de las fracturas, también existen factores que van a hacer que las fracturas tengan una adecuada reparación. Para poder alcanzar estas metas, debemos cuidar el manejo prequirúrgico y transquirúrgico de las fracturas. Por ejemplo, se debe respetar la formación del coágulo, ya que el coágulo funciona como un transportador de sustancias desencadenantes del crecimiento óseo y juega un rol físico importante y la fibrina del coágulo actúa como un soporte temporal enrejado por células mesenquimales y vasos sanguíneos.

Dos o tres días después las células mesenquimales del endosito y periostio proliferan dentro y fuera del coágulo. Este crecimiento no inicia sobre la fractura, inicia en el tejido sano, formando un callo fusiforme, idealmente las células pluripotenciales que invaden el coágulo se diferencian en osteoblastos y rápidamente se produce tejido óseo de reparación. La compresión de fragmentos ocasionará agilidad en el uso mecánico del hueso y con ello se logra suprimir la reabsorción y estimula la formación. El suministro adecuado de oxígeno se logra si existe una pronta revascularización en el sitio de la fractura y las células que por arrastre son llevadas al sitio de fractura con el resto de sustancias necesarias para la reparación [23].

Ya teniendo un marco general sobre el proceso normal de reparación de las fracturas, podemos englobar el proceso como se muestra en la figura 5.

1.6 Estrategias usadas con el fin de optimizar la reparación ósea

Con el fin de aumentar el número de éxitos en la reparación de las fracturas se han diseñado un sin fin de biomateriales y técnicas para su aplicación. El término biomateriales es usado para designar materiales ajenos al receptor generalmente de origen artificial, los cuales son implantados en organismos vivos con el fin de restaurar la morfología y/o función de los tejidos u órganos alterados por trauma, malformaciones o enfermedades degenerativas [24]. Bajo condiciones de trabajo, los biomateriales serán sometidos a ataques químicos por el ambiente biológico y a agresiones físicas por el ambiente mecánico del sitio de implantación. La corrosión y degradación de los

biomateriales pueden conducir a dos tipos de consecuencias: debilitación del material y reacciones tóxicas y alérgicas debido a las sustancias que son liberadas en el ambiente interno. Sin embargo, estas características también están tratando de ser aprovechadas en los procesos de reparación de fracturas [25].

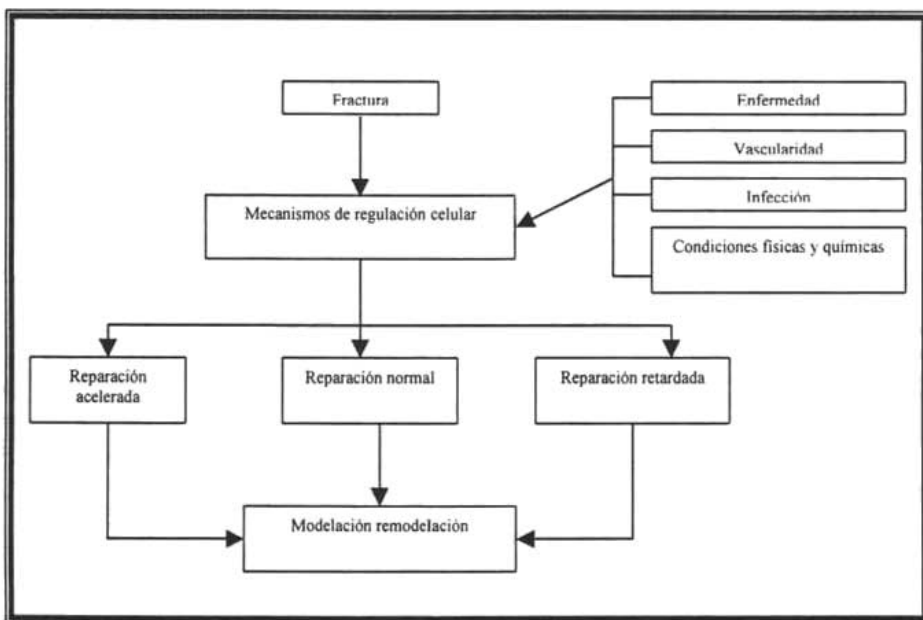


FIGURA 5. VÍAS HACIA EL PROCESO DE MODELACIÓN REMODELACIÓN.

Entre los materiales más usados tenemos al acero de uso quirúrgico, las aleaciones de cromo cobalto, titanio y sus aleaciones (Ti-Al-Va), el uso de polímeros es cada vez mas estudiado y tenemos entre ellos el polimetilmetacrilato (PMMA), el polietileno de ultra-alto peso molecular (PEUAPM), el Silastic y los polímeros biodegradables de entre los cuales sobresalen el ácido poliláctico (PLA), y los polímeros del ácido poliglicólico (PGA) [26].

Con el uso de injertos óseos en la práctica quirúrgica a partir de 1915, se ha logrado recopilar gran cantidad de información respecto a los principios que rigen su aplicación.

Primero se aplicaban con el fin de proporcionar estabilidad mecánica, pero a partir del uso de fijaciones metálicas, el injerto se ha considerado una fuente de osteocitos y un soporte para el crecimiento de nuevo hueso. Actualmente sabemos que existen diferentes tipos de injertos cada uno con características físicas, mecánicas e inmunológicas diferentes y entre estos tenemos a los autoinjertos, los homoinjertos o injertos alogénicos, los heteroinjertos y los isogénicos. Los injertos pueden ser frescos o conservados por diferentes mecanismos [27]. Recientemente, en la FES-C UNAM Flores y colaboradores, demostraron la integración de injertos de hueso laminar desmineralizados, constituyendo estos una interesante alternativa para el tratamiento de fracturas complicadas. Además se demostró la inexistencia de efectos adversos [28]

1.7. Participación de los Factores Celulares Solubles en los procesos de reparación.

Una gran limitación en las terapias tradicionales, invitan al uso de nuevas estrategias en el reemplazo de órganos [29]. El surgimiento de la ingeniería de tejidos, permite restaurar, mantener o modificar la estructura y función de los tejidos [30]. El uso de factores celulares solubles, principalmente los factores de crecimiento, incluidos en injertos e implantes ha ofrecido una estrategia más en el campo de la ingeniería de tejidos. Dentro de los factores celulares solubles, vamos a encontrar referidos a los factores de crecimiento y a las citocinas.

Los factores de crecimiento son péptidos que transmiten señales que modulan la actividad celular, estimulan e inhiben la proliferación, diferenciación, migración y expresión genética de las células [31]. Normalmente actúan de manera dependiente a su concentración. Usualmente existen como precursores activos o parcialmente activos que requieren una activación proteolítica y pueden necesitar de un vínculo con otras moléculas de la matriz extracelular para su activación o estabilización [32]. Dependiendo de la proximidad a los sitios de acción, los factores de crecimiento se pueden clasificar como de actividad endocrina (blanco celular a distancia), parácrina (blanco celular cercano), autócrina (la célula blanco es igual a la célula que secreta el factor de crecimiento), justácrina (la célula blanco es opuesta al complejo receptor/factor de crecimiento) o

intracrina (el complejo factor de crecimiento/receptor esta internalizado). Los principales factores de crecimiento que se han usado a la fecha y sus actividades, se encuentran resumidos en la tabla II [33].

TABLA II. CARACTERÍSTICAS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Factor	Fuente principal	Actividad primaria	Efectos sobre hueso
PDGF	Plaquetas, células endoteliales y placenta.	Promueve la proliferación de tejido conectivo, células de músculo liso y estriado	Mitógeno sobre cel. Óseas. Principalmente osteoblastos, incrementa el contenido de Ca en la matriz y la Fosfatasa Alcalina(FA)
EGF	Plaquetas, células endoteliales y placenta	Promueven la proliferación de células mesenquimales y epiteliales.	Incremento de masa ósea periostial y endostial. Aumenta actividad de Osteoblastos
TGF- α	Común en células transformadas	Importante en los procesos de cicatrización normal	
FGF	Gran rango de células. Proteína asociada con ECM	Promueve la proliferación de células: inhibe algunas células madre; induce el mesodermo en células de embrión	
NGF	Tejidos inervados por neuronas	Promueve el autocrucimiento y sobrevivencia de las neuronas.	
Eritropoyetina	Riñón	Promueve la diferenciación y proliferación de eritrocitos	
TGF β -1	Células TH1 activadas y células NK	Antiinflamatorio (suprime la producción de citocinas y la expresión del MHC clase II Promueve la curación de heridas, inhibe a los macrófagos y la proliferación de linfocitos)	Estimula la síntesis de colágena, disminuye la expresión de la FA, disminuye actividad proteolítica aumenta la producción de inhibidores de activadores de plasminógeno.
IGF-1	Hígado principalmente	Promueve la proliferación de varios tipos celulares	Incrementa el No. De células capaces de sintetizar matriz ósea. Leve efecto mitógeno, incrementa la producción de colágeno, inhibe su degradación.
IGF-II	Gran variedad de células	Promueve la proliferación de tipos de células principalmente de origen fetal	Igual a IGF-II

Tomada de [33] complementada con [* 34, ** 35]

Factor de crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento Transformante alfa (TGF α), Factor de Crecimiento Neuronal (NGF), Factor de Crecimiento Transformante beta uno (TGF β -1), Factor de Crecimiento Similar a la Insulina uno y dos (IGF-I ; IGF-II)

La tabla II nos muestra que algunos de los factores de crecimiento actúan sobre el tejido óseo fomentando por ejemplo: el efecto mitógeno y de diferenciación sobre osteoblastos y modifican la producción de matriz extracelular. Todo proceso normal de curación de heridas esta influenciado por factores de crecimiento. Sin embargo, en la práctica inducirlos con éxito es difícil. Los factores de crecimiento son sustancias altamente potentes aún en cantidades muy pequeñas y su vida media es muy corta, lo cual es entendible considerando sus propiedades (ver Tabla III.)

TABLA III VIDA MEDIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO.

Factor	Vida media
PDGF (<i>In vivo</i> , Humano) Inyección intrav *	2 Min.
BFGF (<i>In vivo</i> , rata)**	9 h
PDGF (<i>In vivo</i> , rata):**	12 h
TGF beta (<i>In vivo</i> , rata) **	22 h

Tomado de [*36, **37]

1.7.1. TGF Beta-1 y los procesos de reparación ósea.

Actualmente el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β -1, por sus siglas en ingles), es el mas estudiado en cuanto a su función, se sintetizó por vez primera a partir de virus del sarcoma murino y actualmente es sintetizado a partir de diversos tipos celulares, incluyendo linfocitos, macrófagos, fibroblastos, miocitos, condrocitos, células epiteliales, células de riñón, células de placenta y plaquetas, inclusive se ha aislado de algunas células tumorales [38].

Existen 5 isoformas del factor de crecimiento transformante; TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, TGF- β 5 además de un heterodímero, el TGF- β 1.2 el cual se ha identificado en plaquetas de porcinos [4] Todas las isoformas son sintetizadas como proteínas precursoras inactivas conteniendo 9 residuos de cisternas en el extremo C-terminal.

Los efectos de las isoformas están asociados a su disponibilidad, a la combinación de los tipos de receptores y a la vía de señalización intracelular que inducen. Todas las células normales y la gran mayoría de las células tumorales expresan receptores para el TGF- β 1. La forma activa del TGF- β 1 esta constituida por dímeros de 25 kDa, que en condiciones de reducción generan monómeros de 12.5 kDa. Entre los mamíferos, la secuencia de los aa es altamente conservada, difiriendo solo en 1 aa en los ratones [39]

Al igual que otras moléculas de señalización extracelular, el TGF- β 1 posee un umbral, es decir, una concentración a la cual una señal produce una respuesta celular específica [38]. Por lo tanto el TGF- β 1 se considera un factor multifuncional (con actividad pleiotrópica) [40]. Dicho de otra manera, dependiendo del tipo celular y de la concentración presente, se dará un efecto específico sobre la respuesta celular. En lo que respecta a la vía de señalización vemos lo siguiente: la fijación del ligando a los receptores de tipo I y II, que son serina / treonina cinasas, induce la formación de receptores multiméricos. Los receptores de tipo II fosforilan los receptores de tipo I en la región yuxtamembrana. Los receptores activador tipo 1 fosforilan específicamente los Smad regulados por el receptor (Smad-R), que luego se dimerizan con Co-Smad en el citosol. El complejo Smad-R-Co Smad, se trasloca hasta el núcleo, donde se fija a las secuencias reguladoras en combinación con factores de transcripción específicos que llevan a la transcripción de genes objetivo mas específicos para llevar a cabo sus funciones biológicas de diferenciación, control del crecimiento, apoptosis celular y síntesis de matriz extracelular, entre otras. [41]. (Ver Figura 6)

Entre las funciones del TGF- β 1 *in vivo*, se encuentran; un aumento en las funciones efectoras y de memoria de los linfocitos T CD4+ antígeno - específicos; estimula la secreción de IgA; inhibe la proliferación de linfocitos, células endoteliales, hepatocitos, queratinocitos y ciertas líneas celulares tumorales; inhibe la secreción de IgG e IgM; suprime la hematopoyesis dependiente de IL-3, la megacariopoyesis y la esteroidogénesis en las células adrenocorticales e inhibe la diferenciación de adipocitos y miocitos. Además se ha demostrado que inhibe la inmunosupresión en el transplante de órganos e injertos

de piel y en el contexto de la activación de subpoblaciones de linfocitos T. Los efectos del TGF- β 1 en el tejido óseo, son principalmente el estímulo sobre la síntesis de colágeno y la inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina, conduce a la formación de componentes extracelulares de la matriz y suprime la actividad proteolítica mediante la reducción de la síntesis de proteinasas y el incremento de la expresión de inhibidores [42]

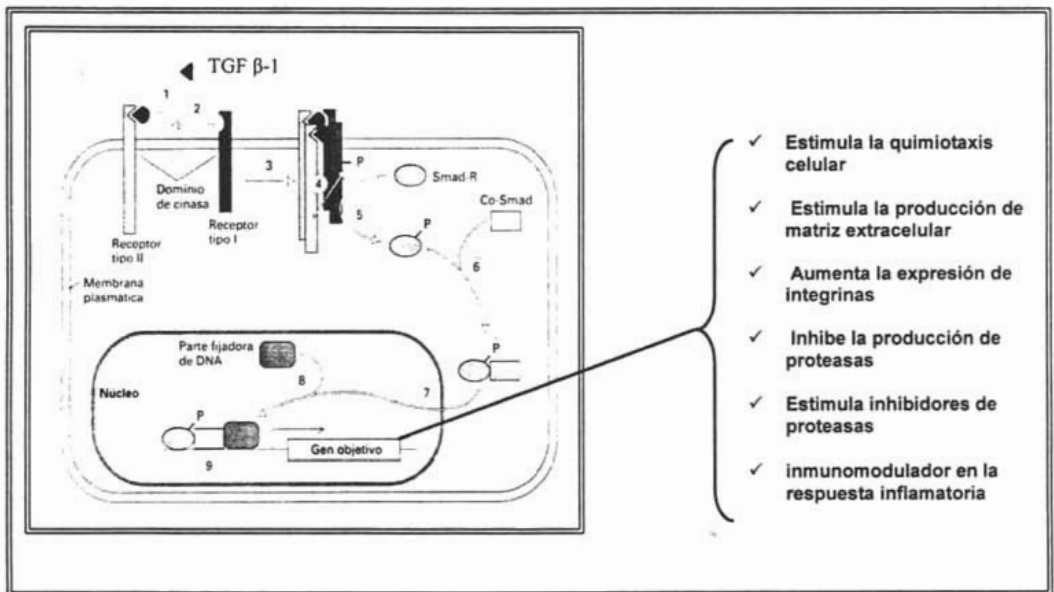


FIGURA 6. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF-B1

1.8. Matriz extracelular y metaloproteasas.

Durante varias décadas se ha asumido que la activación del plasminógeno juega un papel muy importante en la invasión tumoral y la metástasis [43]. Sin embargo, actualmente se sabe que este sistema no solo está involucrado en procesos de migración e invasión de células cancerosas, sino también en otros procesos de invasión celular, tal es el caso de la angiogénesis [44], cicatrización o reparación de heridas, la migración durante la implantación de trofoblastos y la involución de la glándula mamaria y la reparación ósea [45]. La acción del sistema activador de plasminógeno es muy variada y

compleja y aún se considera enigmática, no solo se limita a la degradación de la matriz extracelular [46], sino también al envío de señales para la activación celular. La función básica de este sistema es convertir al plasminógeno, un zimógeno inactivo, en una proteinasa activa, la plasmina. La plasmina es capaz de catalizar la degradación de proteínas en membranas basales y matriz extracelular; de esta manera es como se puede facilitar la invasión celular.

1.8.1. Participación del uPA en los procesos de reparación.

Existen dos tipos de activadores de plasminógeno, el tipo urocinasa o activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA, por sus siglas en inglés, Urocinasa) y el de tipo tisular o activador de plasminógeno tipo tisular (tPA por sus siglas en inglés), 2 inhibidores de los activadores de plasminógeno, el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) y el 2 (PAI-2) y se conoce un receptor para uPA (uPAR) el cual está anclado a la membrana.

La serina proteinasa uPA también tiene un precursor, el pro-uPA, el cual va a dar origen a dos cadenas de uPA, esta conversión puede ser catalizada por plasmina o por alguna otra proteasa como la catepsina [47] (Ver Figura 7)

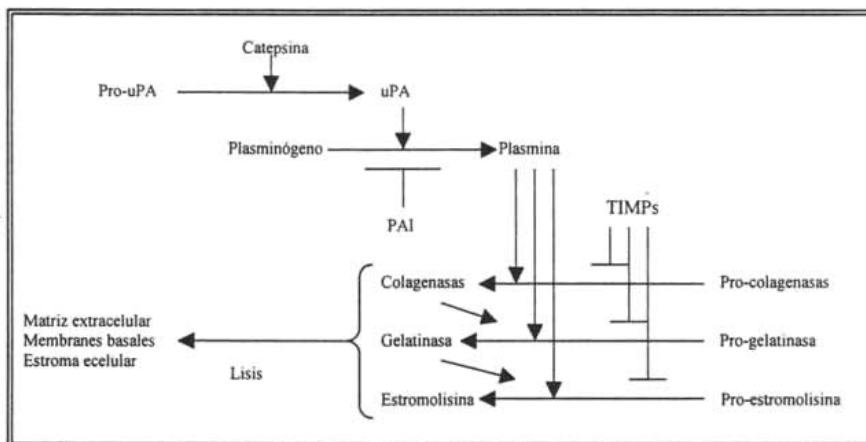


FIGURA 7. ACTIVACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS MEDIADAS POR EL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO TIPO UROCINASA. uPA = Urokinasa del activador de plasminógeno; PAI = Inhibidor del activador de plasminógeno; TIMPs = inhibidor tisular de las metaloproteasas.

Estudios recientes indican que no solo los factores solubles sino también la interacción matriz-célula y célula-célula son claves en la expresión génica del sistema plasminógeno plasmina [46]

La reabsorción ósea involucra la remoción tanto de los constituyentes orgánicos como inorgánicos del hueso, la disolución de los minerales se presenta gracias a un medio ambiente ácido creado bajo el borde de los osteoclastos. Sin embargo, los mecanismos proteolíticos responsables de la degradación de la matriz orgánica del hueso son poco claros y se sabe pueden involucrar proteinasas lisosomales, metaloproteinasas y algunas serina proteinasas. Entre las enzimas incluidas, la atención se ha enfocado a la cascada proteolítica activada por el sistema plasminógeno/plasmina la cual ha sido implicada en el continuo proceso de formación-degradación ósea. Es posible sugerir la participación de los activadores de plasminógeno y sus inhibidores tanto en osteoclastos [48] como en osteoblastos [49] durante el proceso de reabsorción, tal como sucede en cultivos celulares después del tratamiento con hormonas involucradas en la reabsorción ósea [50]

La presencia del uPA, el tPA y su inhibidor PAI-1 en células óseas sugiere un rol importante en uno o varios aspectos de la reabsorción ósea tal como la formación de osteoclastos, la disolución de los minerales y la degradación de la matriz orgánica [51]

2. JUSTIFICACIÓN

Una de las causas frecuentes de consulta en la práctica de la clínica veterinaria son las fracturas en el perro ocasionadas por accidentes automovilísticos, caídas y maltratos. Dichos eventos son en muchas ocasiones de consecuencias fatales, sin embargo, si la muerte no ocurre, es común encontrar fracturas en el esqueleto apendicular. Las fracturas del esqueleto apendicular del perro muy frecuentemente presentan complicaciones durante o después del proceso de reparación. Estas complicaciones suceden comúnmente cuando se presenta una gran pérdida de tejido óseo o cuando existe una mala estabilización, debido a un método inadecuado. El carácter impulsivo de nuestros pacientes y/o la falta de atención de los propietarios también juegan un papel determinante en el resultado final del proceso de reparación.

Existe también la necesidad de reestablecer la función del miembro a la mayor brevedad y de evitar procesos quirúrgicos repetidos, lo cual aumenta las molestias para el paciente y los costos para el propietario. Con la finalidad de tener éxito en el tratamiento de fracturas de resolución complicada o de corregir procesos de retraso en la reparación o procesos de no-unión y también con el fin de optimizar o en ciertos casos acelerar el proceso normal de reparación se han ideado diversas técnicas que involucran el empleo de muy variados tipos de implantes y la aplicación de injertos y factores de crecimiento además del uso de estímulos con electricidad, ondas electromagnéticas y rayos láser obteniendo resultados muy variados.

El propósito del presente trabajo es mostrar una nueva propuesta para la aplicación local del TGF β -1, Factor de crecimiento con efectos comprobados sobre la osteogénesis, por medio de un injerto que a mostrado tener una buena integración y no presentar la manifestación de efectos secundarios. La obtención del injerto, su conservación, la facilidad de la técnica de aplicación y sus relativamente bajos costos lo hacen ser una buena propuesta en el tratamiento de las fracturas.

3. HIPÓTESIS

“El uso de un injerto como mecanismo de soporte y liberación de TGF- β 1 reducirá el tiempo de reparación de la osteotomía inducida en la tibia de perro”.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del uso de un injerto con TGF- β 1 sobre la reparación ósea en la osteotomía inducida en la tibia de perro.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar radiográficamente la consolidación de la fractura.
- Evaluar mediante la estimación de leucocitos, eritrocitos, hematocrito, fosfatasa alcalina y temperatura, la evolución clínica de los perros fracturados y los efectos sistémicos del TGF β -1 aplicado localmente.
- Evaluar la remodelación tisular y matriz extracelular durante el proceso de reparación ósea.
- Evaluar la expresión de urocinasa por inmunohistoquímica.

5. MATERIAL Y MÉTODO.

El presente trabajo se desarrollo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México. En la realización del presente trabajo se contó con el apoyo de los departamentos de la Unidad de Enseñanza Quirúrgica y Policlínica, y del Departamento de Ciencias Biológicas de la FES-Cuautitlán , la Universidad del Estado de Morelos y del Instituto Nacional de Cancerología.

5.1. Animales de experimentación

Para este estudio, se utilizaron 12 perros machos, con una edad entre 2 y 3 años con peso aproximado de 20 a 30 Kg., los cuales al examen clínico fueron diagnosticados como clínicamente sanos. Los perros fueron solicitados y obtenidos por donación.

Los perros al ser recibidos en las instalaciones de la Facultad se bañaron con jabón a base de decametrina y se desparasitaron con ivermectina 300µg/Kg. Fueron sometidos a observación durante 15 días con el fin de delimitar la población objetivo. Los perros fueron mantenidos en un ambiente de confort apegados al manejo recomendado por el reglamento de protección animal que rige en el Distrito Federal.

Los perros fueron incluidos en el estudio de acuerdo a los siguientes criterios:

- a) Criterios de inclusión: perros machos, entre 20 y 30 Kg, con una edad promedio de 2 a 3 años, conducta apacible, clínicamente sanos.
- b) Criterios de eliminación: Perros agresivos, castrados o con problemas en sus órganos genitales, con signos de enfermedad o de secreciones de cualquier tipo y se eliminaron también aquellos que presentaron lesiones osteoarticulares al tomar las radiografías.

Ninguno de los animales tuvo que ser eliminado del estudio.

Durante toda la estancia, los animales fueron alimentados con una fórmula comercial balanceada de mantenimiento para perros, cubriendo con las raciones las necesidades energéticas de los animales.

5.2. Formación de los grupos

Los animales incluidos en el estudio fueron seleccionados en forma aleatoria e incluidos en uno de los siguientes grupos:

I) Grupo control: al cual únicamente se le realizó la osteotomía permitiendo la reparación natural de la misma.

II) Grupo Injerto: se les practico la osteotomía y se les colocó un injerto de hueso laminar desmineralizado

III) Grupo TGF β -1: a este grupo se le realizó la osteotomía y se le aplico un injerto de hueso laminar desmineralizado tratado con TGF β -1 (5 ng/ml)

5.3. Tratamiento de los grupos

5.3.1 inducción de la reparación ósea posterior a osteotomía.

Previo baño y ayuno de 12 horas se tomo una radiografía basal, (tiempo 0) y se procedió a realizar la técnica quirúrgica descrita por Flores y col.[28] El procedimiento quirúrgico se realizó de la siguiente manera:

Prevía asepsia de lo zona quirúrgica se colgó el miembro pelviano izquierdo, se colocó el fijador de Kirschner tipo II con clavos de Steinman de 1/8 y se hizo la barra de fijación lateral con acrílico dental (polimetilmetacrilato), esto con el objetivo

de mantener la longitud del miembro al realizar la osteotomía. (Figura 8.1) Se realizó una incisión hacia el tercio medio de la tibia en su cara medial, se realizó la cuidadosa disección de los músculos, una vez que se encontró visible la tibia, se hizo una desperiostización de la zona que se selecciono para la osteotomía.(Figura 8.2). Se procedió a realizar las perforaciones distales y proximales con una broca de 1/8 y luego se efectuó una perforación central con una broca de 1/4, con esta maniobra, se logró la fragmentación del espacio existente entre las filas de perforaciones distal y proximal, para después proceder a quitar las astillas con unas pinzas de Ronger. (Figura 8,3-5). Posteriormente se eliminó una porción de tamaño similar en la fibula con el fin de evitar que esta interfiriera en el proceso de reparación de la tibia, finalmente se hizo la reparación por planos y se formó la barra medial del fijador. Se tomó una radiografía de control posquirúrgico [20]. Se hizo el seguimiento clínico y radiográfico semanal durante 5 semanas.

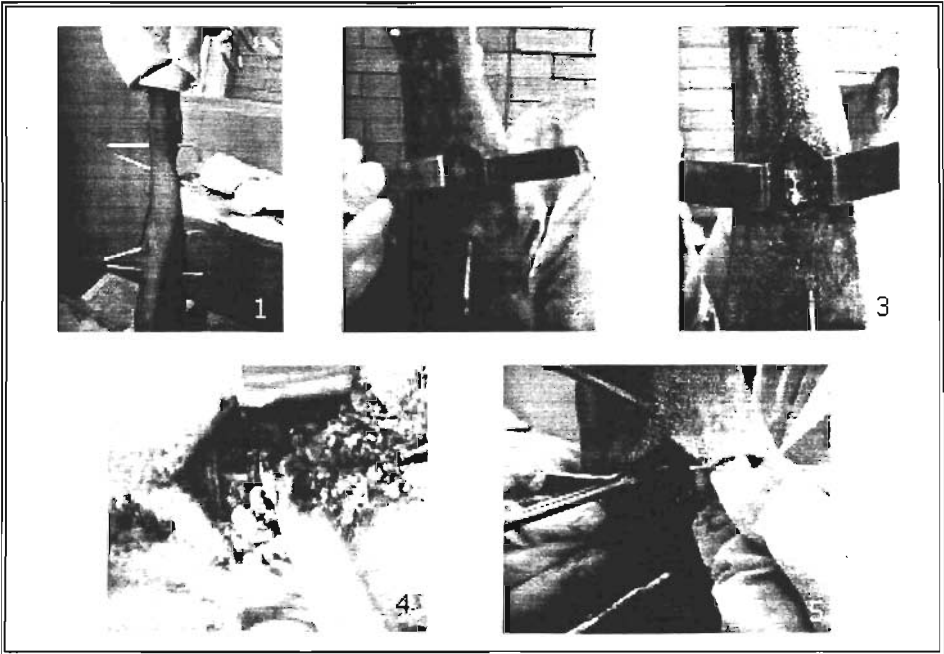


FIGURA 8. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO DE LA OSTEOTOMÍA

5.3.2 Tratamiento de la osteotomía con injerto de hueso desmineralizado

Una vez que se realizó la osteotomía bajo la misma técnica descrita para el grupo osteotomía, se colocó el injerto de tal forma que rodeara la zona de osteotomía, dejando por lo menos 0.5 cm. hacia cada porción de hueso (Figura 9). Posteriormente se colocó un par de puntos que abarcaran el injerto y la fácia de alguno de los músculos adyacentes con el fin de evitar su migración. Para dicha fijación se utilizó sutura reabsorbible de ácido poliglicólico calibre 3-0.

Los injertos fueron obtenidos a partir de escápulas de cadáveres de perros que al momento del sacrificio se mostraban clínicamente sanos. Una vez obtenidas las escápulas mediante técnicas quirúrgicas adecuadas se limpiaron bien de todo residuo de músculos y se lavaron con abundante agua destilada, se dejaron secar dos días a la intemperie y luego se sumergieron en la solución de Van Ebner con el fin de eliminar la matriz ósea mineral. La solución de Van Ebner se preparó de la siguiente manera:

En un frasco de vidrio de cuatro litros, se mezclaron los siguientes compuestos:

Ácido clorhídrico al 36%	30 ml.
Cloruro de sodio	350 g
Agua destilada cbp	2000 ml.

En esta solución se incluyeron las escápulas lavadas y secas. Diariamente se les agregaron 10 ml. de ácido clorhídrico con el fin de mantener la acidez por debajo de 1. Transcurridos 10 días los injertos se lavaron con agua destilada y luego se mantuvieron en agua desionizada, conservándolos en una temperatura promedio

de 2 a 4 ° C, hasta el momento de su uso [52]. Se hizo el seguimiento clínico y radiográfico semanal durante 5 semanas.

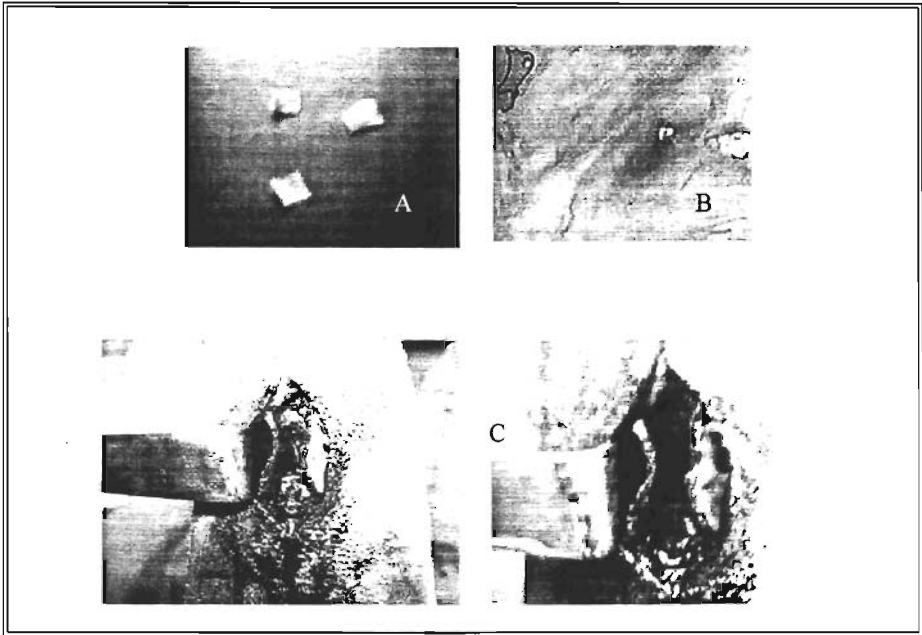


FIGURA 9. CARACTERÍSTICAS Y COLOCACIÓN DEL INJERTO. Aspecto macroscópico (A) y microscópico (B) del injerto. Colocación del injerto en el espacio interfragmentario (C).

5.3.3. Tratamiento de la osteotomía con Injerto + TGF β -1

La técnica quirúrgica que se empleó en este grupo fue similar a la del grupo Injertado, pero a diferencia de esta, el injerto que se colocó en el sitio de osteotomía fue tratado de la manera siguiente:

Los injertos que fueron utilizados en el grupo injerto + TGF β -1 fueron tratados un día antes de ser usados. Los injertos se sometieron a un proceso de deshidratación por microondas cuidando de no quemarlos, una vez que perdieron aproximadamente el 60% de su peso inicial, se sacaron del microondas se dejaron

enfriar, se colocaron en una solución estéril conteniendo TGF β -1 (5 ng./L) y se mantuvieron en esta solución en refrigeración hasta el momento de ser usados. Se hizo el seguimiento clínico y radiográfico semanal durante 5 semanas.

5.4. Cuidados posquirúrgicos.

A los perros tratados quirúrgicamente, se les aplicó por vía intramuscular penicilina estreptomicina a una dosis de 22,000 UI cada 24 H. durante 7 días y se realizó la limpieza de la interfase clavo-piel, la alimentación y la limpieza de las jaulas se realizó en forma habitual durante el proceso de adaptación.

A todos los animales se les tomaron placas radiográficas y fueron muestreados semanalmente, cumplidas 5 semanas posteriores a la cirugía, se procedió al sacrificio de los animales. El sacrificio se realizó mediante la administración de pentobarbital sódico en una dosis tres veces mayor a la recomendada y en un solo bolo IV (Aprox 100 mg/Kg).

5.5. Evaluación radiográfica.

Con el fin realizar la evaluación radiográfica, se requirió tomar placas radiográficas de los miembros intervenidos en posición medio-lateral y cráneo-caudal. Las placas fueron tomadas conservando las constantes de radiación en cada perro a lo largo de todo el periodo del trabajo. Para tal fin se utilizó un equipo de rayos X marca universal de 150Kv. 300 mili amperes.

Las respuestas que se evaluaron fueron la periostica y la respuesta del espacio interfragmentario. Para la evaluación de las placas se hizo una escala con unidades de evaluación arbitrarias con el fin de poder dar una calificación a las diferentes respuestas observadas. Las placas fueron revisadas por tres personas distintas, las cuales hicieron la observación sin conocer el grupo del cual procedía cada perro. La escala de valores utilizada se especifica en la tabla IV.

TABLA IV. VALORES ARBITRARIOS DE LA EVALUACIÓN RADIOGRÁFICA.

CRITERIO	VALOR ASIGNADO
No hay respuesta	0
Respuesta pobre < 50% del hueso	1
Respuesta regular > del 50% del hueso	2
Respuesta abundante >del 80% del hueso	3

5.6. Evaluación clínica.

La evaluación clínica nos permitió hacer un monitoreo del estado de salud general del individuo en experimentación, así mismo ver si alguno de los parámetros era alterado por los procedimientos empleados. Se tomaron muestras de sangre venosa (3 ml) por punción directa de la vena yugular, esto se hizo semanalmente. Las muestras fueron colectadas en tubos con sal tripotásica de EDTA (Tubos con tapón violeta marca Vacutainer). A estas muestras se les hizo un conteo de leucocitos, eritrocitos, hematocrito, y determinación de fosfatasa alcalina.

- a) Leucocitos: Son las unidades móviles del sistema protector del organismo. Los leucocitos pueden tener variaciones en la respuesta a causas infecciosas, hipertermia infecciosa o artificial y por choque traumático, dentro del síndrome postoperatorio. Dado que utilizamos un procedimiento quirúrgico había la posibilidad de infección minutos o días después de la cirugía. En casos de cirugías asépticas se puede presentar neutrofilia, pero nunca se presenta desviación a la izquierda. Se expresan en No. de leucocitos por mm^3 .
- b) Eritrocitos: Un número por debajo de los límites de referencia, puede ser indicativo de anemia sin importar la causa primaria.

- c) Hematocrito: Este valor representa la proporción de glóbulos rojos a plasma en la sangre circulante, puede ser indicativo de anemias y estado de hidratación y se expresa en volúmenes por ciento.

- d) Fosfatasa alcalina (FAS): Procede principalmente de los huesos y también en parte del hígado, Aumenta normalmente en los periodos de crecimiento y reparación ósea, Los límites de referencia suelen ser variados y muy amplios dependiendo del laboratorio y del método de medición.

Así mismo se realizó la evaluación clínica mediante la evaluación de:

- e) Temperatura: Un aumento nos puede indicar una alteración causada por sustancias tóxicas que afecten los centros reguladores de la temperatura, por ejemplo algunas interleucinas (IL-1), procesos infecciosos, quirúrgicos y posquirúrgicos [53]

- f) Claudicación: Manifiesta el grado de dolor al usar la extremidad, el cual puede estar relacionado con la estabilidad de la lesión y con la presencia del proceso inflamatorio.

La evaluación clínica con respecto a la claudicación se realizó cada tercer día y esta se basó en realizar la observación del paciente en estado de estática y de dinámica observando el grado de claudicación que presenta. La escala de valores utilizada se especifica en la tabla V.

TABLA V. VALORES ARBITRARIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CLAUDICACIÓN.

GRADO DE APOYO	UNIDADES ARBITRARIAS
Apoyo normal	0
Apoyo en estática y ligero en dinámica	1
Apoyo solo en estática	2
Apoyo en estática solo para mantener equilibrio	3
Ausencia total de apoyo	4

5.7. Examen histológico

Para hacer el examen histopatológico, se procedió a tomar muestras de las zonas injertadas, mediante una disección cuidadosa, se retiró el fragmento de tibia que tenía el injerto incluyendo aproximadamente 1 cm. de tejido "sano", se lavó con agua destilada y se incluyó en una solución de formalina al 3.6% en la cual permanecieron durante 24 horas. Luego de 24 horas se pasaron las muestras a una solución ácida que contenía un 2% de ácido nítrico. El diluyente del ácido era una solución de formalina al 1.2 %. La muestra permaneció ahí durante una semana, pasado ese tiempo se realizó un corte longitudinal y se volvieron a depositar en una solución ácida pero esta vez con una concentración de ácido nítrico al 5% con el mismo diluyente. La muestra permaneció durante 2 semanas. La solución se renovó cada 7 días. Con esto logramos que las muestras tuvieran la consistencia adecuada para poder hacer los cortes.

Los tejidos una vez descalcificados, fueron sometidos a un proceso de deshidratación gradual, aclarados en monómero de estireno e incluidos en parafina.

Para realizar el examen histológico se obtuvieron cortes de cada una de las muestras incluidas en parafina realizando un distinto tipo de tinción a cada una de ellas;

a) Hematoxilina y eosina (H&E). Con esta tinción, los núcleos y el cartilago se tiñen de azul morado, el protoplasma y sustancias intercelulares de naranja a rojo. Se pudo evaluar la morfología celular y diferenciar los tipos de tejidos presentes en cada corte.

b) Azul de alciano. A través de esta técnica se teñirán de azul-verde claro los glucosaminoglicanos ácidos y los núcleos de azul intenso o rojo oscuro. con esto se, conoció también la antigüedad de las glucoproteínas que constituyen la matriz extra celular de las muestras.[54]

5.8. Evaluación inmunohistoquímica de uPA

Las muestras obtenidas a partir de los bloques de parafina (corte de entre 4-5 micras) fueron sometidas a la técnica de inmunohistoquímica con el fin de buscar la presencia de la urocinasa en las muestras. Para ello se uso un anticuerpo vs. uPA que fuera adecuado para muestras incluidas en parafina. Únicamente se interpretaron los resultados como positivo o negativo, de acuerdo a la reacción Ag-Ac, la cual se hace evidente con una ligera coloración café ocre [55].

5.9 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se hizo por medio del análisis de varianza y la prueba de Kruskal-Wallis con una significancia ($p < 0.05$). Este análisis se llevó a cabo con el programa SYSTAT versión 10.2 [56]

6.0 RESULTADOS.

6.1 DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE OSTEOTOMIA Y PROCESO DE REPARACIÓN.

Para la realización de la osteotomía, se hizo un abordaje medial y se cortó el hueso a la mitad del tercio medio, tratando de que la separación entre los fragmentos quedara de un centímetro.

En la figura 10 A, se puede notar el espacio entre los fragmentos del hueso, a este grupo se le realizó solamente la osteotomía y se procedió al cierre de la incisión por capas. En la figura 10 B se observa la placa radiográfica en la cual apreciamos la colocación final del fijador de Kirschner y la adecuada separación entre los fragmentos (flecha). Observamos también que la fibula fue cortada con el fin de evitar que interfiriera con el proceso natural de reparación. En la figura 10 C podemos observar el proceso de reparación natural a las 5 semanas, observando la formación del callo de periostio (P) y la formación del callo interno (I) ocupando la totalidad del espacio fracturado. En la figura 10 D se puede ver la presencia de la matriz extracelular preexistente (MP) y la matriz extracelular de nueva formación (MNF), advirtiendo que la mas abundante es la matriz de nueva formación (teñida de color azul).

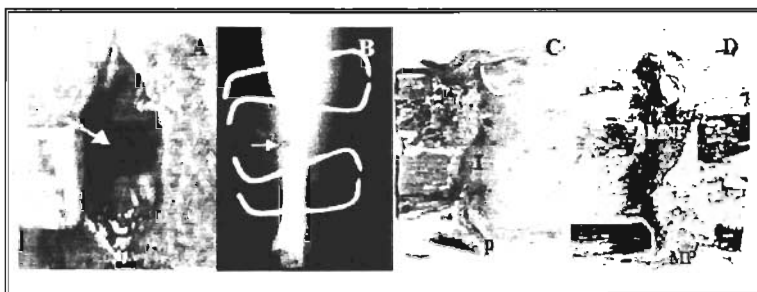


FIGURA 10. OSTEOTOMIA Y PROCESO DE REPARACIÓN. En los cuadros A y B se muestra la apariencia macroscópica y radiográfica de la osteotomía, y en los cuadros C y D se puede apreciar por histología, el proceso normal de reparación (Tinciones de H&E 4X y Azul de Alciano 4X).

6.2 EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LA RESPUESTA DE REPARACIÓN.

Este efecto lo apreciamos de dos formas, evaluando el grado de respuesta perióstica y el grado de respuesta en el espacio interfragmentario. El efecto del TGF β -1 y los otros tratamientos se evaluó haciendo el análisis de las placas radiográficas utilizando una escala arbitraria de acuerdo a la tabla descrita en la sección de Material y Método.

a) Efecto del TGF β -1 sobre la respuesta perióstica.

En la figura 11 observamos que la respuesta perióstica comienza a partir de la tercera semana en el grupo osteotomía, mientras que en el grupo injertado y en el tratado la respuesta comienza desde la segunda semana. En las placas radiográficas (ver figura 13), vemos que se presenta un considerable aumento de la respuesta perióstica en los tres grupos al término de la tercera semana. Podemos observar que hay un incremento de 4 veces de la respuesta perióstica en el grupo osteotomía e injertado. Por otro lado, el grupo TGF β -1 presentó un aumento de seis veces. En la cuarta semana, todos los grupos aumentaron la respuesta perióstica 1.5 veces con respecto a la tercera semana. Para la quinta semana no se aprecia aumento en el grado de respuesta perióstica en ninguno de los grupos (Ver figura 13); sin embargo, se nota la mayor presencia de respuesta perióstica en el grupo tratado con TGF β -1. No hay diferencia significativa.

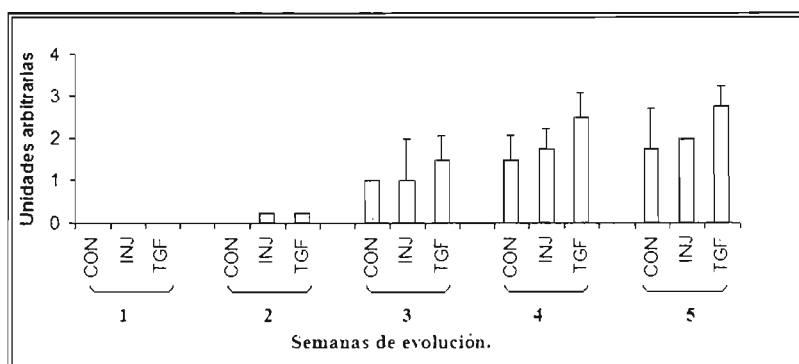


FIGURA 11. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LA REPARACIÓN PERIÓSTICA. Los grupos incluidos fueron: CON (osteotomía) sin tratamiento; INJ (injerto), se matriz ósea desmineralizada; TGF β -1, se aplico injerto de matriz ósea desmineralizada tratada con 5 ng/ml de TGF β -1. Todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado.

b) Efecto del TGF β -1 sobre la reacción en el espacio interfragmentario.

En la figura 12, se muestra la evaluación de la respuesta en el espacio interfragmentario y podemos observar que en los grupos tratados con injerto y con TGF β -1, la respuesta en el espacio comienza una semana después que la respuesta perióstica. A partir de la tercer semana se observa que la respuesta es mayor en el grupo tratado con TGF β -1 (ver también figura 13 -sem 1 y 2-). En la semana cuatro podemos observar que el grupo tratado con TGF β -1 duplicó la respuesta que presentó inicialmente; el grupo osteotomía aumenta casi al doble con relación a la semana anterior y el grupo injertado casi no muestra un aumento en la respuesta. En esta cuarta semana, se observa una diferencia estadísticamente significativa del grupo tratado con TGF β -1 con respecto al grupo injertado ($p < 0.05$). En la quinta semana el grupo injertado duplicó la respuesta en el espacio interfragmentario, no se observan cambios en el grupo osteotomía (Figura 13, semanas 3-5). Para el grupo con TGF β -1 hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparado con los otros dos grupos en esta misma semana.

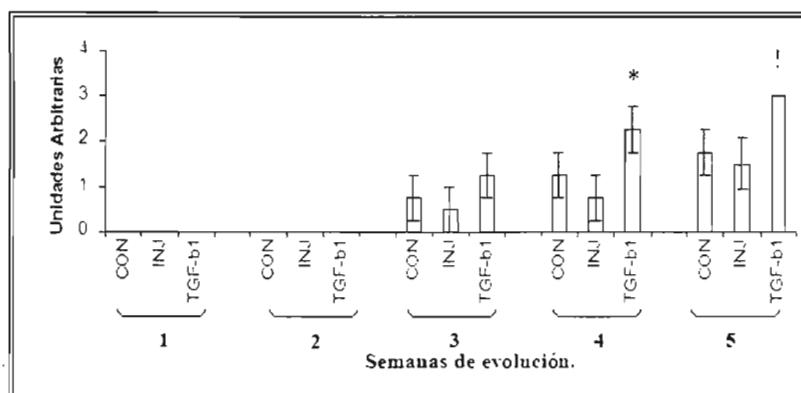


FIGURA 12. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LA REPARACIÓN DEL ESPACIO INTERFRAGMENTARIO. Los grupos incluidos fueron: CON (osteotomía), sin tratamiento; INJ (injerto), se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada; TGF β -1, se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada tratado con 5 ng/ml de TGF β -1. La evaluación de los animales se hizo semanalmente, como se especificó en la sección de Material y Métodos. Todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado.

* $p < 0.05$ con respecto al grupo injertado.

! $p < 0.05$ con respecto a los otros dos grupos.

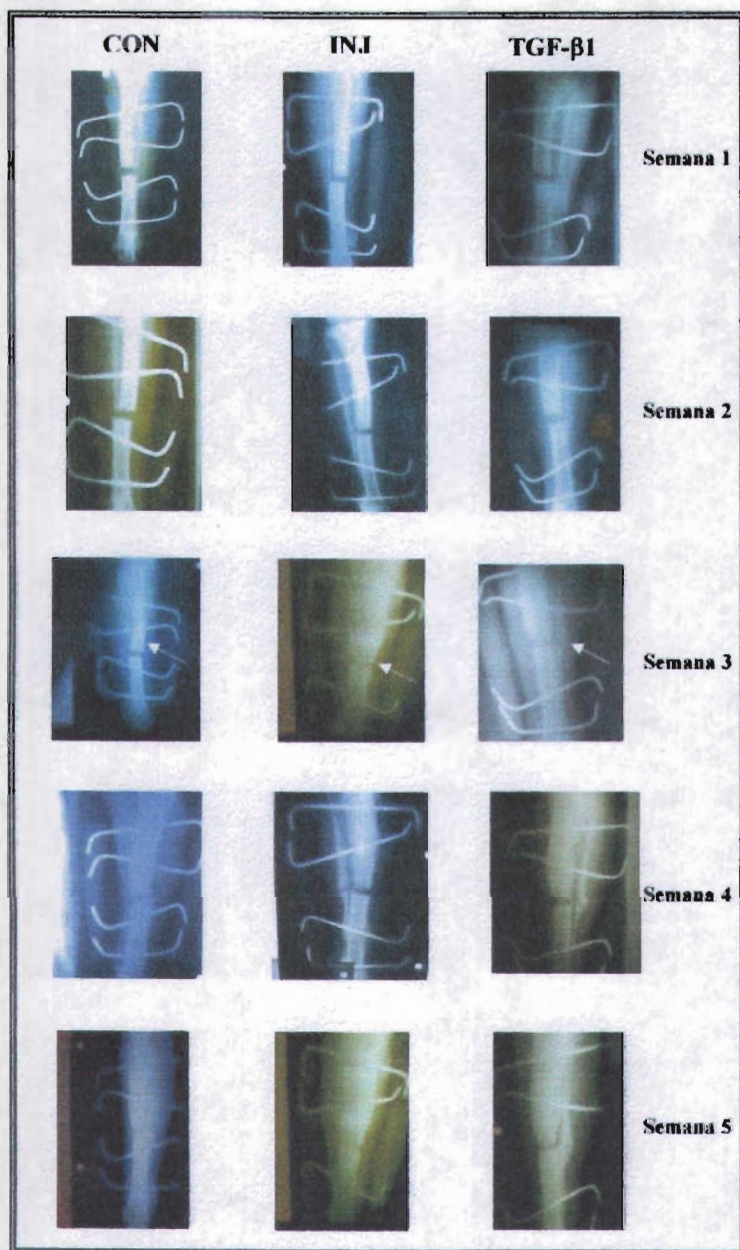


FIGURA 13. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE EL PROCESO DE REPARACIÓN. Placas radiográficas mostrando la evolución de los animales durante las 5 semanas. Los grupos incluidos fueron: CON (osteotomía) sin tratamiento; INI (injerto), se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada; TGF β -1, se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada tratado con 5 μ g/ml de TGF β -1. Todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado.

6.3. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA.

Dentro de los parámetros clínicos en los cuales podemos encontrar una respuesta por efecto de la presencia del TGF β -1, evaluamos la temperatura rectal, el número de leucocitos presentes en la sangre periférica, el número de eritrocitos y la presencia de fosfatasa alcalina en plasma.

a) Efecto del TGF β -1 sobre la claudicación

Como se mencionó en la parte correspondiente a material y método, el grado de claudicación o apoyo en el miembro afectado, se evaluó partiendo de un grado de apoyo normal (0) a un grado de no apoyo absoluto (4). En la figura 14 observamos que el grado de claudicación no varió entre los diferentes grupos en todas las semanas. Se observa que el grupo tratado con TGF β -1 presentó un menor grado de claudicación en las primeras dos semanas, sin embargo en las siguientes semanas, la claudicación de los animales aumentó y en la última semana fue similar en los tres grupos.

b) Efecto del TGF β -1 sobre la temperatura.

En la figura 15, observamos que en ninguna de las semanas los perros presentaron cambios significativos en la temperatura. Aunque en general se aprecia un ligero descenso en la temperatura rectal de los animales tratados con TGF β -1, no resulta de importancia ya que en todo momento se mantiene dentro de los límites de referencia para la especie, el sexo y la edad.(38.5-39.5 °C).

c) Efecto del TGF β -1 sobre el número de leucocitos en sangre periférica.

En la figura 16 podemos observar que el número de leucocitos comienza a tener un aumento durante la segunda y tercera semana, este aumento se mantiene durante la cuarta semana, mostrando un comportamiento muy similar entre los tres grupos. Para la quinta semana se observa como el número de leucocitos comienza nuevamente a descender. Las diferencias estadísticas no son significativas en ningún caso, manteniéndose siempre el número de leucocitos dentro de los límites de referencia usados para la evaluación clínica.

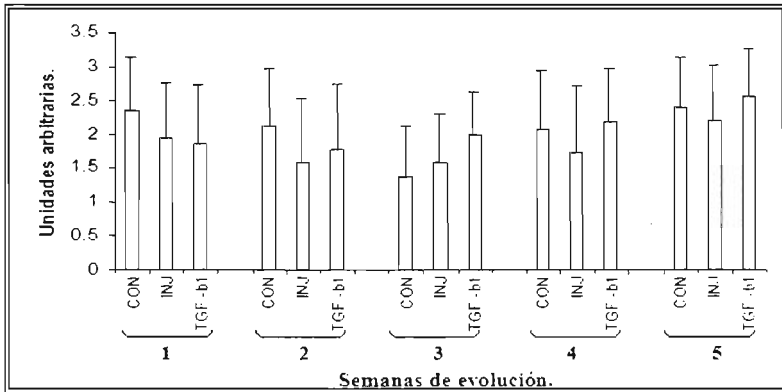


FIGURA 14 . EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE EL GRADO DE CLAUDICACIÓN. Los grupos incluidos fueron: CON (osteotomía), sin tratamiento; INJ (injerto), se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada; TGF β -1, se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada tratado con 5 ng/ml de TGF β -1. La evaluación de los animales se hizo semanalmente, como se especificó en la sección de Material y Métodos. Todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado. No hay diferencia significativa.

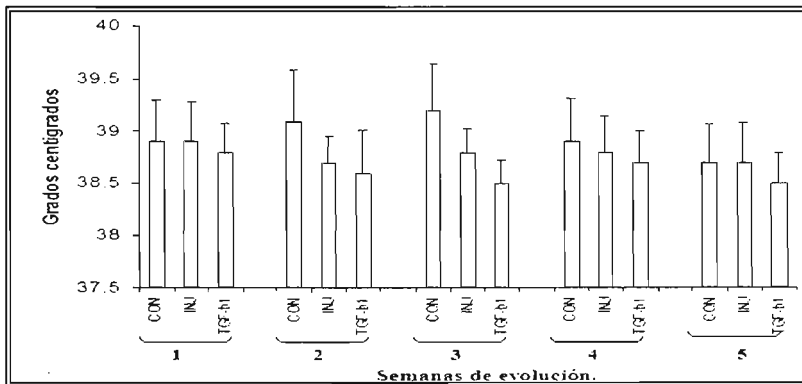


FIGURA 15 . EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LA TEMPERATURA CORPORAL. Los grupos incluidos fueron: CON (osteotomía), sin tratamiento; INJ (injerto), se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada; TGF β -1, se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada tratado con 5 ng/ml de TGF β -1. La evaluación de los animales se hizo semanalmente, como se especificó en la sección de Material y Métodos. Todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado. No hay diferencia significativa.

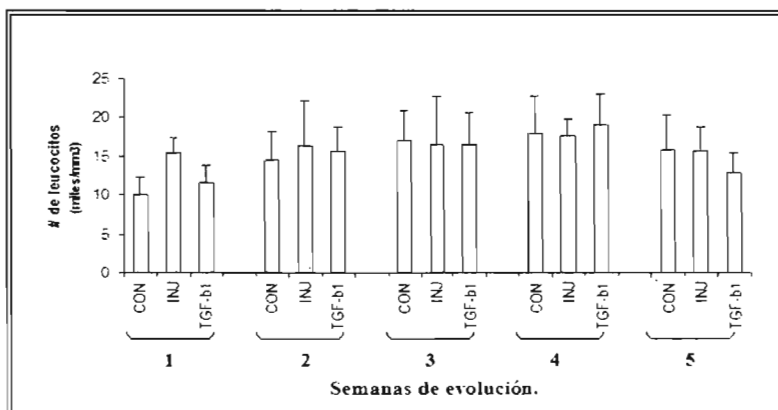


FIGURA 16 . EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE EL NÚMERO DE LEUCOCITOS. Los grupos incluidos fueron: CON (osteotomía), sin tratamiento; INJ (injerto), se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada; TGF β -1, se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada tratado con 5 ng/ml de TGF β -1. La evaluación de los animales se hizo semanalmente, como se especificó en la sección de Material y Métodos. Todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado. No hay diferencia significativa.

d) Efecto del TGF β -1 Sobre el número de eritrocitos.

En la figura 17 observamos que el número de eritrocitos se modifica entre los grupos a lo largo de la evolución de la reparación. Observamos que si bien los niveles de eritrocitos se mantuvieron constantes a lo largo de las 5 semanas, hubo una disminución de los niveles de eritrocitos en el grupo injertado en la semana 3, el cual fue estadísticamente significativo con respecto al grupo solo con osteotomía $p < 0.05$. Por otro lado observamos que en el grupo con TGF β -1 hubo una disminución de los niveles de eritrocitos en la semana 2, 3 y 4, la cual fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control, $p < 0.05$, pero no con respecto al grupo con injerto. Cabe mencionar que el número de eritrocitos del grupo tratado con TGF β -1 si bien mostró reducción y diferencias con los otros grupos, los niveles estuvieron dentro del rango normal.

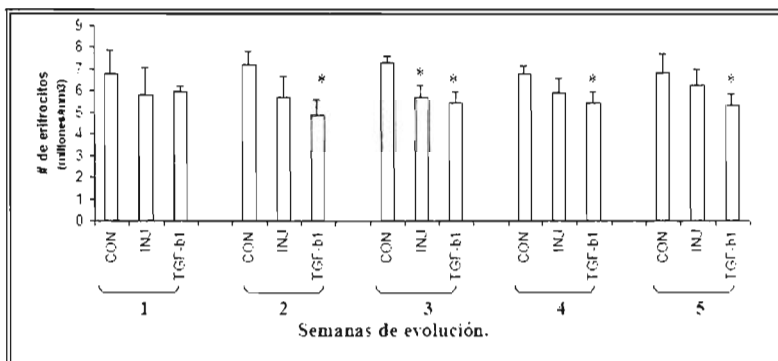


FIGURA 17. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE EL NÚMERO DE ERITROCITOS. La evaluación se hizo semanalmente. Los grupos incluidos fueron: CON (osteotomía), sin tratamiento; INJ (injerto), se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada; TGF β -1, se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada tratado con 5 ng/ml de TGF β -1. La evaluación de los animales se hizo semanalmente, como se especificó en la sección de Material y Métodos. Todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado.

* $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

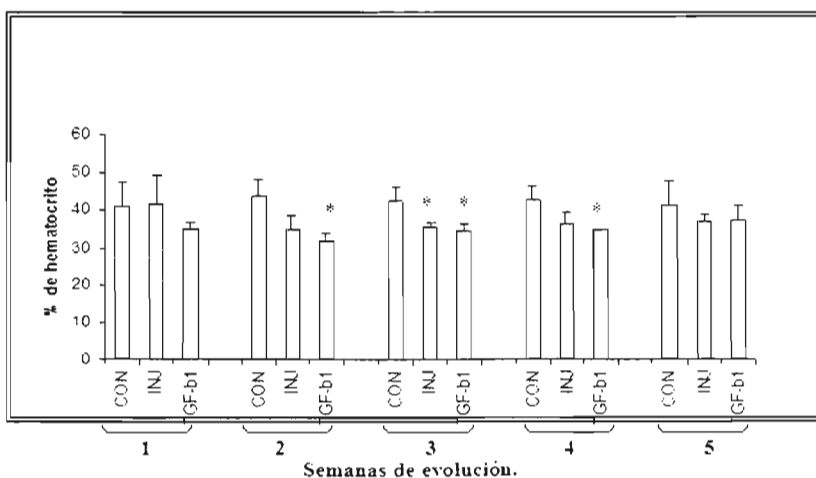


FIGURA 18. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LOS NIVELES DE HEMATOCRITO. Los grupos incluidos fueron: CON (osteotomía), sin tratamiento; INJ (injerto), se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada; TGF β -1, se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada tratado con 5 ng/ml de TGF β -1. La evaluación de los animales se hizo semanalmente, como se especificó en la sección de Material y Métodos. Todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado.

* $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

e) Efecto del TGF β -1 sobre los niveles de hematocrito.

Al evaluar los valores de hematocrito en los sujetos de experimentación encontramos que los valores tendieron a mantenerse constantes a lo largo de las 5 semanas de seguimiento. Sin embargo, si fue posible observar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Hubo una reducción de los niveles de hematocrito en el grupo tratado con TGF β -1 en las semanas 2, 3 y 4, comparado con el grupo control, $p < 0.05$, ver figura 18.

f) Efecto del TGF β -1 sobre los niveles de fosfatasa alcalina sérica (FAS).

En la figura 19 se puede advertir que en la semana 2, 3 y 4 tienden a incrementarse los niveles de la fosfatasa alcalina en todos los grupos. En la semana 5 hay una tendencia a disminuir los niveles de esta enzima en todos los grupos. Es importante señalar que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de tratamiento en todas las semanas. Durante las cinco semanas, la concentración de FAS, se mantuvo dentro de los límites de referencia reportados.

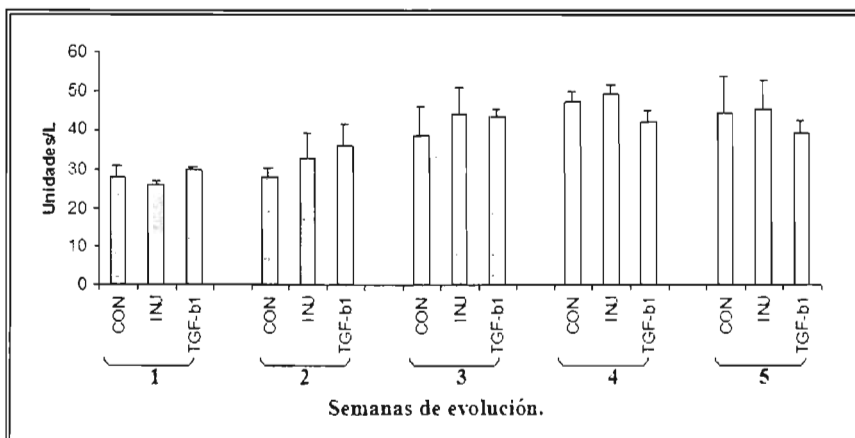


FIGURA 19. EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA. Los grupos incluidos fueron: CON (osteotomía), sin tratamiento; INJ (injerto), se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada; TGF β -1, se aplicó injerto de matriz ósea desmineralizada tratado con 5 ng/ml de TGF β -1. La evaluación de los animales se hizo semanalmente, como se especificó en la sección de Material y Métodos. Todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado. No hay diferencia significativa.

6.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL EFECTO DEL TGF β -1 SOBRE LA REPARACIÓN DE LA OSTEOTOMÍA.

6.4.1 Efecto del TGF β -1 sobre la diferenciación histológica y la reparación ósea.

En la figura 20 observamos que en el grupo al cual solamente se le realizó la osteotomía presenta focos de cartilago hialino (CH). La zona de callo interno (CI) es mucho mas evidente que en los grupos tratados con injerto y con TGF β -1. El callo perióstico (CP) muestra una disminución del grosor y es mas uniforme en el grupo control que en los grupos con injerto y TGF β -1. El grupo injertado presenta regularmente, en la zona del espacio interfragmentario, una forma de reloj de arena que es ocupada por fibrocartilago (CF) Esto significa que el callo perióstico penetra hacia el callo del espacio interfragmentario. En el grupo al que se aplicó el injerto tratado con TGF β -1 se le aprecia una reparación más uniforme y con cantidades muy pequeñas de cartilago hialino en el espacio interfragmentario y una distribución mas uniforme de hueso trabecular (HT) lo que indica la presencia de un tipo de hueso con mas madurez.

6.4.2 Efecto del TGF β -1 sobre la cantidad de matriz extracelular en la reparación ósea.

En la figura 21 se aprecia que el grupo osteotomía presenta una mayor cantidad de matriz extracelular de nueva formación (MENF), lo cual indica que aun no existe una marcada diferenciación ni proliferación celular, en comparación con los grupos tratados. En este grupo también se hace evidente un límite entre la matriz extracelular preexistente (MEP) y el hueso trabecular (HT). En el grupo injerto, se hace evidente una cantidad de matriz extracelular de nueva formación mucho menor que en el grupo osteotomía. La reducción en la cantidad de matriz indica que esta matriz esta siendo sustituida por tejido perióstico, el cual esta penetrando hacia el espacio interfragmentario. En el grupo TGF β -1, se aprecia un callo perióstico distribuido en los bordes externos de las cortezas óseas, la matriz de nueva formación que ocupa el espacio perióstico se observa en mucho menor cantidad, lo

cual indica una mejor reparación de la fractura. La distribución del hueso trabecular de nueva formación se aprecia homogéneamente distribuida.

6.4.3 Efecto del TGF β -1 sobre la expresión inmunohistoquímica de la urocinasa.

En la figura el grupo osteotomía observamos dentro de un grupo de células una célula con reacción positiva en la zona trabecular. En el grupo injertado observamos un mayor número de células con reacción positiva en la zona de hueso trabecular. Las células en su mayoría son células grandes con múltiples núcleos y se encuentran localizadas en los bordes de las trabeculas de hueso estas células corresponden a los osteoclastos. En los cuadros de la figura correspondientes al grupo TGF β -1, observamos células con características y localización muy similar a la descrita para el grupo injertado a nivel de hueso trabecular, además de algunas células positivas en la periferia de algunos vasos sanguíneos, que por su forma parecen ser células mesenquimales que podrían diferenciarse en osteoblastos.

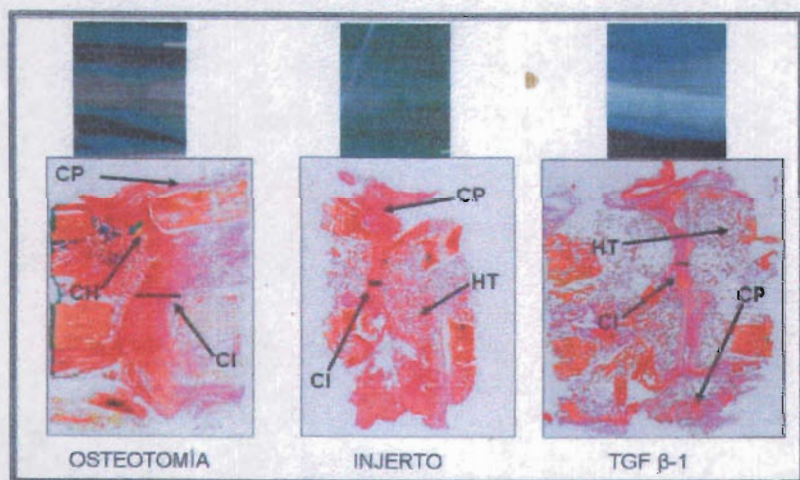


FIGURA 20. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA REPARACIÓN ÓSEA. Las muestras obtenidas después de 5 semanas de tratamiento fueron descalcificadas, se incluyeron en parafina y fueron teñidas con H&E (4X). CP- Callo perióstico, HT- Hueso trabecular, CI- Callo interno, CH- Cartilago Hialino

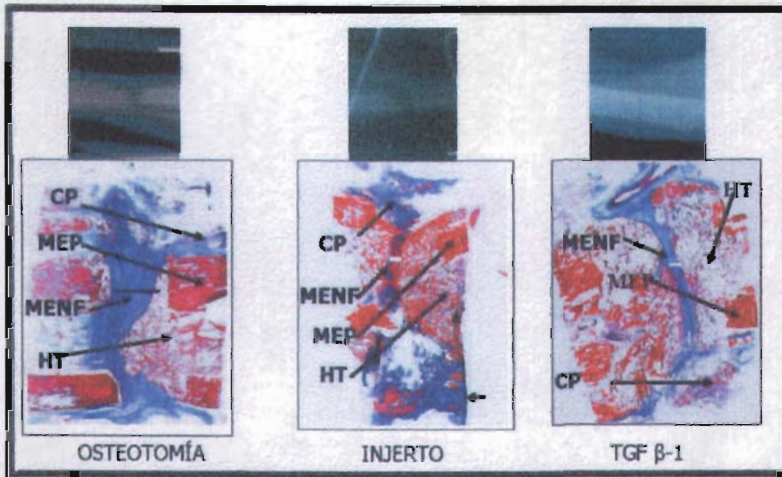


FIGURA 21. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA PRESENCIA DE MATRIZ EXTRACELULAR EN LA REPARACIÓN ÓSEA. Las muestras obtenidas después de 5 semanas de tratamiento se descalcificaron, se incluyeron en parafina y fueron teñidas con H&E.(4X). CP- Callo perióstico, HT- Hueso trabecular, MEP- Matriz extracelular perióstica, MENF- Matriz extracelular de nueva formación.

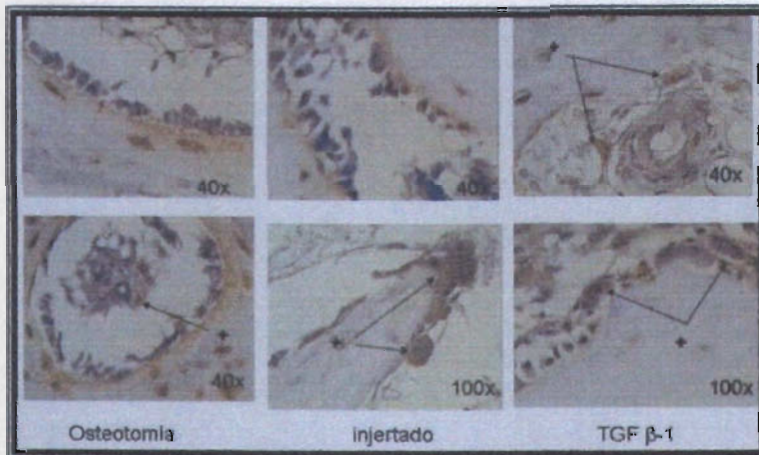


FIGURA 22. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE UROKINASA. Las muestras obtenidas después de 5 semanas de tratamiento se descalcificaron y se incluyeron en parafina, se cortaron y se realizó la prueba de inmunohistoquímica por peroxidasa. La reacción antígeno anticuerpo se expresa con una coloración ocre. Las flechas indican células expresando uPA.

7. DISCUSIÓN

Cuando aplicamos una carga al hueso, se puede causar deformación o cambios en la forma del hueso. Fuerzas de baja magnitud pueden causar pequeñas cambios en la forma del hueso pero no son cambios permanentes, cargas moderadas si pueden causar una deformación y si son aplicadas en forma suficiente, pueden sobrepasarse los límites de resistencia del hueso y causar su ruptura (fractura). [57]

Cuando sucede la fractura, el primer evento que ocurre es la activación de la cascada de coagulación y la formación del coágulo, poco tiempo después va darse una respuesta inflamatoria aguda que resulta en un edema y en la liberación de citocinas y factores de crecimiento. Finalmente se da una respuesta de reparación temporal por colágeno, lo cual forma un tejido de granulación. Después se presenta una remodelación de la matriz extracelular, la angiogénesis y la formación de nuevo tejido (hueso de neoformación) [58].

De estos eventos resulta importante resaltar que al presentarse la pérdida de continuidad del tejido óseo, se van a liberar citocinas, factores de crecimiento y hormonas, las cuales van a inducir la migración de células mesenquimales y la proliferación y diferenciación de células formadoras de hueso. (Ver figura 22) [59]. De lo anterior se desprende la importancia de los factores de crecimiento.

En lo que respecta a la función de los factores de crecimiento en el tejido óseo, encontramos que en 1965, Urist y col. marcaron la pauta en su estudio de estos como inductores de la formación de hueso. Mediante un modelo en ratas, ellos observaron que después de la colocación intramuscular de un aloinjerto de matriz ósea desmineralizada había formación de cartílago y hueso. Estas evidencias los llevaron a hipotetizar la presencia de una proteína a la que llamaron proteína morfogénica ósea (BMP, por sus siglas en inglés) la cual era capaz de inducir el

crecimiento de cartílago y hueso. La hipótesis de Urist y col. sugiere que la BMP se libera de agregados moleculares de proteínas no colagénicas tanto en procesos de reemplazo normal de hueso como en respuesta a su implantación.[60]. A partir de ese momento y hasta la fecha se han descubierto y probado diversos tipos de factores con resultados muy variables sobre la producción de hueso, además, se han probado una gran variedad de materiales como transportadores esperando que sean capaces de liberar los factores en forma continua. Entre los materiales que han reportado mejores resultados podemos encontrar diversos implantes compuestos de coral tratados con BMP y polimeros biodegradables como el ácido poliláctico o el ácido poliglicólico. [61]

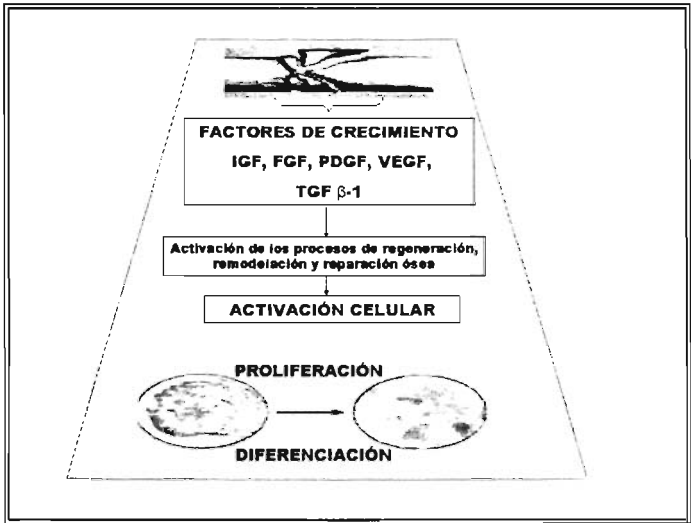


FIGURA 23. PROCESOS DE REGENERACIÓN, REMODELACIÓN Y REPARACIÓN.

Los factores de crecimiento transformante (TGFs) son un grupo heterogéneo de factores que influyen el crecimiento y la diferenciación. El factor de crecimiento transformante (TGF β-1) es conocido como un regulador de diferentes tipos celulares, entre ellos a las células mesenquimales, condrocitos,

osteoblastos y osteoclastos, los cuales están directamente involucrados en la remodelación de las fracturas.[62]

Nosotros utilizamos un modelo en el cual empleamos un injerto de matriz ósea desmineralizada como vehiculo para llevar el TGF β -1 al sitio de lesión y ahí ser liberado, con esta técnica nosotros no requerimos la aplicación sistémica o la inyección directa al sitio de lesión. El injerto que aplicamos demostró ser integrado sin complicaciones, por lo que resulta atractivo su uso.

Para estudiar el efecto del TGF β -1 en nuestro modelo experimental, hicimos la evaluación radiográfica del paciente para estudiar la influencia del TGF β -1 sobre el proceso de reparación. Encontramos que la presencia de este factor de crecimiento si afecta la respuesta perióstica. Observamos que la respuesta perióstica comienza una semana antes en los grupos tratados con TGF β -1 y con injerto que en el grupo control. En las semanas posteriores todos los grupos presentan un aumento gradual en la respuesta perióstica. El grupo tratado con el TGF β -1 presenta siempre, una respuesta mayor que los otros dos grupos, esto nos hace pensar que la respuesta celular corresponde a una mejor respuesta de reparación en el sitio de fractura, lo cual clínicamente se verá como una rápida recuperación en la funcionalidad del miembro.

En lo que respecta a la presencia radiológica de tejido de reparación en el espacio interfragmentario, observamos que en todos los grupos la respuesta comienza a partir de la tercera semana, es decir una semana después que en la respuesta perióstica. En las semanas 4 y 5 observamos que la respuesta del grupo tratado con TGF β -1, es significativamente mayor. La presencia de material radiopaco en el espacio interfragmentario nos indica una respuesta de reparación, es decir la producción de material óseo de nueva formación. De acuerdo a nuestros resultados la presencia de la respuesta en el espacio interfragmentario es mucho mayor en el grupo tratado con TGF β -1 que en los grupos no tratados. Nuestros resultados coinciden con los resultados obtenidos en otros trabajos experimentales

donde se ha demostrado que el uso de TGF β -1 influye de manera positiva sobre los procesos de reparación ósea; por ejemplo, Schmidmaier demostró en un modelo con ratas que el TGF β -1 es capaz de acelerar la producción de hueso maduro[63]. Otro estudio hecho con 103 pacientes muestra que la deficiencia en la cantidad de TGF β -1 en sangre tiene una correlación importante con las fracturas que muestran una reparación demorada (más lenta en comparación a los pacientes que tenían cantidades mayores de TGF β -1 [64].

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto del TGF β -1 sobre la claudicación durante el proceso de reparación ósea muestran un ligero descenso en el grado de claudicación durante la segunda semana, en la tercera semana, se aprecia un ligero aumento en el grado de claudicación; para la tercera y cuarta semana, se va a apreciar que el aumento en el grado de claudicación continua apreciándose de manera notable si se compara con la semana 2. El aumento en el grado de claudicación podría no ser atribuido directamente al proceso de reparación, ya que a partir de la tercera y cuarta semana se va a presentar un aflojamiento de los clavos que forman el fijador esquelético. El aflojamiento se debe a la presencia de necrosis en la interfase clavo / hueso. El proceso de necrosis en la interfase clavo/hueso, resulta del calentamiento excesivo del hueso durante la aplicación del clavo. El proceso de aflojamiento va a causar cierta inestabilidad del sitio de lesión, lo cual se puede ver reflejado en la presencia de dolor, fenómeno que se hace evidente por la falta de apoyo del miembro afectado. Estadísticamente no existe una diferencia significativa entre el grado de claudicación entre los diferentes grupos y las diferentes semanas. Además observamos que los perros pueden responder de manera diferente al mismo estímulo doloroso.

Para evaluar el efecto de la aplicación local del TGF β -1 a nivel sistémico, se realizó la evaluación de la temperatura, el hematocrito, el conteo de eritrocitos y el conteo de glóbulos blancos.

La temperatura corporal de los animales, no presentó cambios estadísticamente significativos en ninguno de los grupos. La temperatura podría indicarnos la presencia de una reacción de tipo infeccioso durante el periodo inmediato a la cirugía o bien nos daría el indicio de un efecto consecutivo a la aplicación de algún compuesto pirógeno. Se ha demostrado que tras la aplicación de sustancias como las citocinas (IL-1) y el interferón se puede presentar un aumento de la temperatura, entre una gran variedad de efectos adversos [65]. En nuestros resultados, observamos que todos los perros presentaron siempre temperaturas dentro de los límites de referencia, es decir entre los 38.5- 39.5 °C , lo cual indica que no hubo presencia de procesos infecciosos ni respuesta negativa a la aplicación local del TGF β -1.

Existen reportes que demuestran que la aplicación sistémica de TGF β -1 esta relacionada con una disminución del hematocrito y del número de eritrocitos debido a una mielosupresión [66]. Nosotros cuantificamos el número de eritrocitos para evaluar el efecto del TGF β -1 sobre el número de eritrocitos y los valores de hematocrito. Los eritrocitos no presentaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos. Sin embargo, se aprecia un ligero descenso en el número de eritrocitos de los grupos injertado y TGF β -1 a partir de la segunda semana. Los valores encontrados en todos los grupos estuvieron dentro de los límites de referencia reportados como normales. El hematocrito presentó un comportamiento muy similar al reportado para los eritrocitos. Sin embargo, los valores encontrados estuvieron dentro de los límites de referencia reportados para la especie. Estos resultados nos indican que el TGF β -1, no produjo el efecto de mielosupresión en nuestro modelo estudiado.

Se han descrito efectos generales tras la aplicación sistémica del TGF β -1 tales como el aumento de temperatura [67]. Los resultados de las pruebas que se hicieron en sangre, la medición de la temperatura corporal y la claudicación, no muestran efectos sistémicos como consecuencia de la aplicación local del TGF β -1. Nuestros resultados concuerdan con los resultados de Schmidmaier, quien reporta

la ausencia de efectos sistémicos tras la aplicación local del TGF β -1 [68]. De los animales utilizados en este estudio ninguno mostró signos de infección local o sistémica durante el tiempo de observación.

La fosfatasa alcalina sérica (FAS), esta constituida por un grupo de isoenzimas producida por las células de varios órganos: hígado, hueso, intestino, riñón y placenta. Normalmente el incremento en la actividad plasmática se debe a las isoenzimas que derivan de hígado y hueso, tanto de la actividad metabólica normal como de procesos patológicos, pues las que derivan de los otros órganos, tienen una vida media muy corta comparada con la de estos dos tejidos. La isoenzima ósea es inducida por la actividad osteoblastica, y por ello, la actividad de la FAS, normalmente es mayor en animales jóvenes en crecimiento y en aquellos desórdenes en los que tiene lugar un crecimiento o remodelación del hueso. [69] El efecto del TGF β -1 sobre la actividad de la FAS es controversial, pues generalmente se reporta que tiene un efecto inhibitor. En nuestro trabajo encontramos un comportamiento similar al descrito por Firschein y Urist, quienes reportan un aumento de la FAS a partir del 6° día de la colocación del injerto de matriz ósea desmineralizada y luego un descenso de su actividad después del día 20 [70].

Durante el proceso normal de reparación ósea encontramos que el hematoma comienza a organizarse por la deposición de fibrina y plaquetas. Las células osteoprogenitoras comienzan a migrar al sitio de fractura a partir del endostio, cavidad medular y periostio. El endotelio puede servir como fuente de células osteoprogenitoras y pueden contener factores de crecimiento que estimulen el crecimiento celular. El callo óseo perióstico externo es formado también por los fibroblastos, macrófagos y las células pluripotenciales [26]. En esta etapa podemos observar la presencia de un callo externo y en el espacio que existe entre los fragmentos se puede presentar crecimiento del hueso trabecular además de la osificación endocondral.

En el análisis histológico de nuestro grupo control, se observaron múltiples núcleos de cartílago hialino y una penetración típica del periostio hacia el sitio de fractura. Se encuentra una gran cantidad de matriz extracelular de nueva formación ocupando el espacio existente entre los fragmentos de la fractura. Se aprecia también la formación de hueso trabecular, dicha imagen corresponde al proceso normal de reparación.

En el grupo al que solo se aplicó el injerto de matriz ósea desmineralizada, se llegó a apreciar la presencia de vasos sanguíneos dentro del injerto, lo cual implica que si existió una buena integración de éste al sitio de lesión. El espacio observado entre los fragmentos óseos se muestra reducido en comparación al del grupo control, y la aparición de hueso trabecular de nueva formación es mas evidente que en el grupo control. En las zonas donde esta entrando el periostio hacia el espacio interfragmentario, observamos la presencia de cartílago hialino y fibrocartílago, lo cual va a favorecer, primero, la estabilidad mecánica de la lesión y con esto se van a favorecer los estímulos piezoeléctricos que darán una mejor y más pronta recuperación del espacio lesionado.

Al hacer el análisis histológico del grupo tratado con TGF β -1, observamos que el espacio interfragmentario se nota muy homogéneo y reducido; la cantidad de cartílago hialino existente entre la matriz extracelular de nueva formación no es muy abundante. No se muestra una invasión severa del tejido perióstico hacia el espacio interfragmentario pero si se hace evidente una ocupación uniforme del hueso trabecular de nueva formación; esto nos hace concluir que la reparación ósea se aceleró y por esta razón en esta semana ya está en una etapa avanzada. Para que se de la sustitución del cartílago por el tejido óseo, se requiere de una irrigación adecuada, se sabe que el TGF β -1, tiene un efecto importante de estimulación sobre la angiogénesis[71] La presencia abundante de cartílago hialino, es un fenómeno normal que se da en situaciones de inestabilidad mecánica, lo cual generalmente constituye una causa de retraso en la reparación de las fracturas, ya que después se tiene que dar la sustitución del cartílago hialino por hueso [3].Es importante remarcar

esto, ya que si tenemos una gran presencia de cartílago puede significar que hay una inestabilidad o bien una carente red vascular que provea del oxígeno y nutrientes necesarios para la sustitución del tejido cartilaginoso por el tejido óseo.

Se conoce que el TGF β -1, tiene una función determinante en la remodelación ósea por su regulación sobre el sistema uPA-plasmina. [72] Dentro de las enzimas proteolíticas, se encuentra el sistema activador de plasminógeno, el cual va a convertir el plasminógeno en plasmina. Este sistema es parte de una cascada proteolítica que junto con otros sistemas enzimáticos va a participar en la degradación de la matriz extracelular durante los procesos de remodelación tisular, tanto en condiciones normales como en situaciones patológicas. [73]

La presencia del uPA, el tPA y su inhibidor PAI-1 en células óseas sugiere un rol importante en uno o varios aspectos de la reabsorción ósea. Se sabe que la síntesis de los activadores de plasminógeno y sus inhibidores, se realiza a través de osteoclastos y células mesenquimales; además se sabe que intervienen en la disolución de los minerales y la degradación de la matriz orgánica [51]

En la evaluación inmunohistoquímica de uPA pudimos observar la escasa presencia de células inmunopositivas, tanto en el grupo control como en el grupo tratado con TGF β -1. En el grupo control, observamos una abundante cantidad de matriz ósea de nueva formación, lo cual puede estar relacionado a una falta de degradación de esta matriz. Por lo anterior, podemos pensar que en este grupo hubo baja actividad de urocinasa (uPA). En el grupo que vemos un evidente número de células inmunopositivas fue en el grupo injertado. La cantidad de matriz de nueva formación es menor, lo que hace suponer que la urocinasa esta en plena actividad. En el grupo tratado con TGF β -1 observamos una menor cantidad de células inmunopositivas y una mucho menor cantidad de matriz extracelular. Esto quiere decir que en la quinta semana de la reparación ósea, en este grupo tratado con TGF β -1, no hubo actividad proteolítica de uPA, pero esta actividad debió haber estado presente semanas antes y es por eso que se encontró una menor cantidad de matriz

ósea. Al parecer TGF β -1 induce la actividad proteolítica en una fase inicial con el fin de remover la cantidad de matriz ósea de nueva formación, en la cual podemos observar una mínima cantidad de matriz extracelular de nueva formación. En nuestros resultados observamos la presencia de hueso trabecular lo cual habla de una etapa avanzada en el proceso de reparación. Esta actividad proteolítica corresponde a la interpretación radiográfica, donde observamos que en el grupo tratado con el TGF β -1 se aprecia un espacio interfragmentario con mayor cantidad de tejido radiopaco.

En resumen, el grupo tratado con el TGF β -1 presentó una aceleración en el proceso normal de reparación ósea, evidenciada tanto radiográfica como histológicamente. El TGF β -1 produjo un aumento en la cantidad de hueso trabecular y una disminución de la cantidad de matriz extracelular de nueva formación a las cinco semanas. El uso del injerto tratado con TGF β -1 no produjo efectos secundarios sistémicos al ser aplicado localmente. Con este trabajo, nosotros proponemos una nueva forma de tratamiento para las fracturas con pérdida ósea, en el tratamiento de procesos de no unión, o bien para el tratamiento de unión demorada, que es más accesible desde el punto de vista técnico y económico.

8. CONCLUSIONES

- ✓ El TGF β -1, adelantó una semana el inicio del proceso de reparación ósea.
- ✓ El TGF β -1, mostró radiográficamente, una mejor consolidación de la fractura a la quinta semana
- ✓ El TGF β -1, demostró a la quinta semana una disminución en la presencia de cartílago hialino.
- ✓ El TGF β -1, aumentó la cantidad de hueso trabecular de nueva formación.
- ✓ El TGF β -1, disminuyó la cantidad de matriz extracelular de nueva formación en el espacio interfragmentario.
- ✓ De acuerdo a los resultados observados en el número de eritrocitos, hematocrito, leucograma y temperatura, observamos que el TGF β -1, no mostró efectos sistémicos tras su aplicación local.

9. EXPECTATIVAS

Con el fin de comprender mejor el efecto del TGF β -1, sobre el proceso de reparación de las fracturas nosotros proponemos:

- ✓ Hacer evaluaciones histológicas e inmunohistoquímicas mas tempranas del proceso de reparación en este modelo.
- ✓ Cuantificar la cantidad de colágeno presente en los distintos procesos de reparación.
- ✓ Cuantificar la actividad enzimática de la urocinasa.
- ✓ Hacer ensayos con dosis diferentes de TGF β -1 a las utilizadas en este estudio (5ng/ml).

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Stone CA. Molecular Approach to bone regeneration. British Journal of Plastic Surgery 1997
2. Ross MH: Histología, texto y atlas a color 2° Edición Ed Panamericana
3. Cormack DH. Ham's Histology. 9th Ed. Harper & Row publishers Inc. 1987.
4. Finn G. Histología (sobre bases moleculares) 3° ed. Panamericana 2000.
5. Jungueira and Carjeiro Histología y sus métodos de estudio. Histología básica 5° ed. Masson, 2000
6. Kiersienbaum AL. Histology and cell biology and introduction to pathology. Mosby, 2002
7. Carter DR, Speugler D.M. ; Biomechanics of fracture in summer: bone in clinical orthopaedics W.B Saunders, Philadelphia 1980
8. Robert M. Biomechanics of bone and fractures. In veterinary clinics of northamerica. Small animal practice. Vol.29 No.5 September 1999.W.B. Saunders company
9. Schwartz PD: Fracture biomechanics of the apendicular esqueleton: fracture etiology and assessment. In bograb MJ (Ed) Mechanisms of surgical disease in small animals. Philadelphia, Lea & Febiger, 1991
10. Radin E. Simon SR. Biomecánica práctica en ortopedia. Limusa 1989.
11. Nordin M: Biomechanical of Whole bones and bon tissue. In basic biomechanics of the skeletal system, Philadelphia, Lea & Febirguer, 1980.
12. Liska WD: Cesclajes para reparar las fracturas de huesos largos. In Sllater DH (ed): Texto de cirugía para los pequeños animals. Vol II. Masson S.A. 1989.
13. Ron S. Radiography of orthopedic trauma and fracture repair. In veterinary clinics of northamerica. Small animal practice. Vol.29 No.5 September 1999.W.B. Saunders company.

14. DeYoung DJ. Métodos de fijación interna. In Sllater DH (ed): Texto de cirugía para los pequeños animals. Vol II. Masson S.A. 1989
15. Birchard.SJ. Manual clínico de pequeñas especies. 1° ed. McGraw Hill Interamericana .1996.
16. Schenk RK: Histopathology of bone remodeling and bone repair. In Lin OCC, Chao EYS eds): perspectives on biomaterials. Amsterdam, Elsevier Science, 1986
17. Rahn BA, GallinaroP, Baltensperberger A, et Al; Primary bone healing. An experimental study in the rabbit. J Bone Joint Surg Am 53: 783 1971.
18. Creuss RL, Dumont J: Fracture healing. Can J Surg 14: 403 1975
19. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR , et al: Formationof bone and xartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. Clin Orthop 151: 294, 1980.
20. Lane JM, Boskey Al, Li WKP, et al: A temporal study of collagen, proteoglycans, lipids and mineral constitutens in a model of endochondral osseous repair. Metabolic Bone Disease Related Research. 1:319,1979
21. Bassett CAL: Biophysical principles affecting bone estructure, in Bourne GH (ed): Biochemistry and physiology of bone, ed 2. New York, academic press 1971, 341
22. Heppenstal RB: Delayed union , non-union and pseudoartrosis. In fracture, treatment and healing. Philadelphia, WR Saunders, 1980.
23. Denny HR: Fundamentos de ortopedia canina. Acribia. 1992
24. Cañas AE Biomateriales, estudio preliminar del uso de poli-pin HTDVFN Tesis para obtener el titulo de ortopedia y traumatología UNAM 1998
25. Muster D. Biomaterials for hard. Tissue repair and reconstructions. In biomaterials degradation. Elsevier Sience Publisgers 1991.
26. Vert M, Christel P, Garreau H, Audion M, Chanavaz M, Chabot F. Totally bioreabsorbable composites systems for internal fixation of bone fractures. In: Chiellini E, Giusti P. Polimers in medicine II; Biomedical and Pharmaceutical Aplications1986: 263-275.

27. Fred H. Bone graft surgery. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1996 324:5-11
28. Flores E, Reyes J, Rodríguez L. Integración de hueso desmineralizado en tibias de perro con osteotomías, *AMMVEPE* 2003(14) 4; 123-125.
29. Putnam AH, Mooney DJ. Tissue engineering using synthetic extra cellular matrices. *Nature Med* 1996;2:824-6.
30. Skalak R, Fox CF. Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng* 1991;19:529-40
31. McKay JA, Leigh I. In *Growth factors: a practical Approach*. Oxford: IRL press; 1993
32. Mimni ME. Polypeptide growth factors: Targeted delivery systems: *Biomaterials* 1997; 18:1201-12025
33. Seung JL. Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Medical Journal* 2000; 42-6:704-719.
34. Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteotomies, and fixation. *Acta Orthop Scan Suppl* 1998; 283:385-394.
35. Mundy G, Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1996 ; 323: 24-28
36. Coerper, S. und G.B. Köveker: Stimulation der Wundheilung durch thrombozytäre Wachstumsfaktoren. In: K.M. Sedlarik: *Wundheilung*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 1993;291 – 297
37. Sprugel, K.H., J.M. McPherson, A.W. Clowes und R. Ross: Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers. *Am. J. Pathol.* 1987;129, 601 – 613
38. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. *Biología celular y molecular*. 4° Ed. Panamericana 2002 1003-1012
39. Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor B. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1032: 79-87
40. Peralta O, Lagunas A, Madrid V. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud pública mexicana* 2001; 43: 340-351.

41. Massague J. The transforming growth factor-family *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6:597-641
42. Sporn MB, Roberts AB, A major advance in the use of growth factors to enhance wound healing. *J Clin Invest* 1993;92:2565-2566
43. Dano K, Andreasen P.A., Grondahl-hansen J, Kristensen P., Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv Cancer Res* 1985, 44,139-266
44. Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M. and Devorak A.M. (1995) vascular permeability factor vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am.J. Pathol.* 146:129-1039
45. Daci E, Udagawa N, Martin T.J, Bouillon R, Carmeliet G. The role of the plasminogen system in bone resorption in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* 1999 14;6:946
46. Nagase H, Woessner F. Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274-31: 21491-21494
47. Andreasen P.A., George B, Lund L .R and Dano K. Diversity in catalytic properties of single-chain and two-chain tissue type plasminogen activator. *Fibrinolysis* 5; 207-215.
48. Grills BL, Gallagher JA, Allan EH, Yumita S, Martin TJ: Identification of plasminogen activator in osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 1990;5:499-505,
49. Allan EH, Zeheb R, Gelehrter TD, Heaton JH, Fukumoto S, Yee JA, Martin TJ: Transforming growth factor beta inhibits plasminogen activator (PA) activity and stimulates production of urokinase-type PA, PA inhibitor-1 mRNA, and protein in rat osteoblast-like cells. *J Cell Physiol.* 1991. 149: 34-43.
50. Hamilton JA, Lingelbach S, Partridge NC, Martin TJ: Regulation of plasminogen activator production by bone-resorbing hormones in normal and malignant osteoblasts. *Endocrinology.* 116:2186-2191, 1985.
51. Roodman T.D., Smits H, Quax PH, Vander P+. Bone matrix degradation by the plasminogen activation system possible mechanism of bone destruction in arthritis. *British Journal of Rheumatology* 1997; 36: 9-15.

52. Stevenson Sh: bone grafting, in textbook of small animal surgery. Ed. by Sllater, DWB. Saunders Co. Philadelphia, 1985
53. Guyton A. Tratado de fisiología médica. 9° Ed. McWraw-Hill Interamericana. 1997
54. Estrada E. manual de técnicas de histología 1° Ed. AGT editor S. A. 1982.
55. Bancroft J. Stevens A . Theory and practice of histological techniques. 3Th Edition Churchill Livingtone 1990
56. Daniel W. Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud. 4° ed. Limusa Willey 2002
57. Nordin M. Frankel UH. Biomechanics of bone. In Biomechanics of tissues and estructuras of the musculoskeletal system, ed 2° Phyladelphia, Leab Febiger 1981.
58. Stadelman WK Digegenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of cronic cutaneous wounds. Am J Surg 1998 ; 176 Suppl 2A: 26s-38s.
59. Braddock M, HoustonP, Campbell C, Aschcroft. Born again bone; tissue engineering for bone repair. News physiol Sci.2001;16:208-213.
60. Urist MR . Bone formation by autoinduction. Science 1965 ; 160: 893-894.
61. Hollinger J.O. Leong K. Poly(alpha-hidroxi acids): Carriers for bone morphogenetic proteins. Biomaterials 1996;17: 187.
62. JoiceM Roberts A:B Sporn M.,Bolander ME. Transforming growth factor beta and initiation of condrogenesis and osteogenesis in the rat femur. J Cell Biol 1990; 110: 2195-2207.
63. Schmidmaier G, Wildemann B, Heeger J, Gäbelein T, Flyubjerg A. Bail HJ, Rashke M. Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin like growth factor-1 and transforming growth factor- beta 1. Bone 2002; 31(1):165-172.
64. Zimmermann G, Henle P, Kusswetter M, Moghaddam A, Wentzensen A, Richter W, Weiss S. TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. Bone.2005;31
65. Tizard I. Inmunología veterinaria 5° ed. McGraw-Hill interamericana 1998.

66. Hannoks MJ, Oliver L, Gabrilove JL, Wilson EI. Regulation of proteolytic activity in human bone marrow stromal cells by basic fibroblast growth factor, interleukin-1, and transforming growth factor beta. *Blood*. 1992; 79(5):1178-1184
67. Wilton P. Treatment with recombinant human insulin-like growth factor 1 of children with growth hormone receptor deficiency (Laron syndrome). *Acta Paediatr* 1992; 383(suppl): 137-142.
68. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Fuchs T, Stemberger A, Flyvbjerg A, Haas NP, Raschke M. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone*. 2001 Apr; 28(4):341-50.
69. Bush B. M Interpretación de los análisis de laboratorio para clínicos de pequeños animales. Ediciones S. 1999.
70. Firschein HE, Urist MR. Enzyme induction, accumulation of collagen, and calcification in implants of bone matrix. *Clin Orthop* 1972; 84; 263-275.
71. Pepper MS, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in microvascular endothelial cells by a chondrocyte-derived transforming growth factor-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1991. 176(2); 633-638
72. Onodera S, Suzuki K, Fujinaga M, Nishihira J. Growth factor-induced expression of macrophage migration inhibitory factor in osteoblast: relevance to the plasminogen activator system. *Semin Thromb Hemost*. 1999; 25(6):563-568.
73. Saksela O, Rifkin DB. Cell-associated plasminogen action, regulation and physiological function. *Ann Rev Cell Biol* 1988; 4: 93-126